



HAL
open science

Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines péri-hospitalières considérées dans un continuum hydrologique

Ayad Qasim Mahdi Almakki

► **To cite this version:**

Ayad Qasim Mahdi Almakki. Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines péri-hospitalières considérées dans un continuum hydrologique. Bactériologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONT002 . tel-01684701

HAL Id: tel-01684701

<https://theses.hal.science/tel-01684701v1>

Submitted on 15 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par UNIVERSITE MONTPELLIER

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA

Et de l'unité de recherche

« Pathogènes Hydriques Santé Environnements »

Laboratoire HydroSciences Montpellier, UMR 5569

Spécialité : Ecologie de la Santé

Présentée par Ayad Qasim Mahdi ALMAKKI

***Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines
péri-hospitalières considérées dans un continuum
hydrologique***

Soutenue le 03 Mai 2017 devant le jury composé de

Pr Marie-George TOURNOUD, Université Montpellier	Président
Dr Dominique HERVIO-HEATH, Ifremer, Plouzané	Rapporteur
Dr Didier BLAHA, Université Lyon 1	Rapporteur
Pr Estelle JUMAS-BILAK, Université Montpellier	Directeur de thèse
Dr Patricia LICZNAR-FAJARDO, Université Montpellier	Co-encadrant de thèse



Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes directrices de thèse, Mesdames Estelle JUMAS-BILAK et Patricia LICZNAR-FAJARDO, de m'avoir accueilli dans leur équipe et de m'avoir fait confiance. Je vous remercie de m'avoir aidé en me fournissant des conseils tout au long de mon travail de laboratoire et pour rédiger la thèse afin que nous puissions obtenir les meilleurs résultats dans cette thèse.

Je souhaite également remercier Monsieur Didier BLAHA et Madame Dominique HERVIO HEATH d'avoir accepté de juger mon travail et de participer à mon jury de thèse en qualité de rapporteur. Je suis très honoré de votre présence aujourd'hui.

Je tiens également à exprimer mes plus sincères remerciements à Madame Marie-George TOURNOUD, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et me faire l'honneur de sa présence en tant que membre du jury.

Je remercie le Gouvernement irakien-Ministère de l'enseignement supérieur, recherche scientifique et Campus France pour avoir financé mon travail de thèse.

Je suis également très reconnaissant à Hélène MARCHANDIN, qui a été constamment disponible pour donner des conseils et des commentaires sur mes recherches.

Je tiens également à remercier Fabien AUJOULAT d'avoir bien voulu me fournir des conseils et des commentaires pendant toute la durée de mon travail.

Je remercie chaleureusement Mylène TOUBIANA pour son aide pour les analyses statistiques.

Je suis également reconnaissant à Alix PANTEL du Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes, qui a effectué le test (Check-MDR CT103R microarray).

Je remercie tout le monde à HSM (HydroSciences Montpellier), en particulier Marina HERY, Sophie DELPOUX, Claire RODIER, Christelle BATIOT-GUILHE, Véronique De MONTETY, Véronique LEONARDI, Christian SALLES, Frédéric HERNANDEZ, Jean-Luc SEIDEL, Jean-Louis PERRIN, ...qui ont réalisé la mesure des paramètres physico-chimiques et ont participé à mes études.

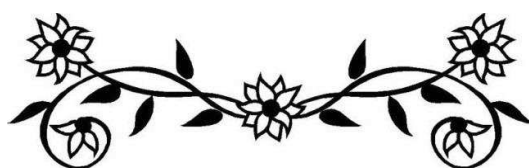
Je voudrais également remercier l'équipe du Laboratoire d'Hygiène Hospitalière de l'Hôpital Sant Eloi et Laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Arnaud de Villeneuve pour avoir fourni les moyens nécessaires aux identifications par MALDI-TOF.

Je tiens également à remercier mes collègues et amis de l'Équipe Pathogènes Hydriques Santé Environnements (Unité de Bactériologie, UFR Pharmacie), pour leur gentillesse, leur soutien et leur aide : Sara, Chloé, Emilie, Fati, Stéfi, Agnès, Isa, Patrick, Myriam, Régine, Alexandra, Célia, et tous les ceux qui ont travaillé avec moi.

Pour les personnes qui nous ont quittées, Thomas & Ghislaine, vous avez été très gentils avec moi, vous me manquez tellement et j'espère que vos âmes reposent paisiblement.

Merci également à ceux que je 'ai pas cité mais qui m'ont accompagné pendant ces années de thèse.

Enfin, je dois exprimer ma profonde gratitude à ma femme et à mes fils, qui ont littéralement traversé le globe avec moi pour venir en France. Sans leur amour constant, leur soutien et leur compréhension, je n'aurais jamais terminé cette thèse.



RESUME-ABSTRACT

Abstract

Aquatic ecosystems subjected to anthropic pressures are places of rapid evolution of microbial communities. They are likely hotspots for emergence of infectious disease agents resistant to antibiotics. The city of Montpellier is located in a small watershed that undergoes brutal rainfall episodes and strong demographic pressures. A hospital is located in a runoff area including two small urban rivers originating from karstic groundwater few kilometers upstream. The aim of the study is to explore bacterial communities in urban rivers flowing near hospital settings in order to evaluate the influence of runoffs on antibiotics resistance in the bacterial communities. Bacterial communities are also described in upstream karstic aquifers.

An introductory section presents the methods available for studying antimicrobial resistance in environment and then reviews comprehensively bibliography on antibiotics resistance in urban runoffs. This part supports the experimental strategies. The method developed herein, called community Inhibitory Concentration (c-IC) determination is combined to taxonomic richness description to provide a tool that gives a rapid snapshot of resistant bacterial communities in aquatic environments. A strategy derived from c-IC approach allows the exploration of bacterial resistance in the urban hydrologic system near the hospital and in karstic aquifers. The collected microbiological data has been completed by hydrological, hydrogeological, climatic and physico-chemical data.

The impact of very low concentration of antibiotics on the bacterial community structure in various water bodies was demonstrated and appeared as an indicator of the vulnerability of ecosystems to antimicrobial pressures. The taxonomic repertory of the urban river communities was described and its dynamics was compared to environmental conditions. Hospital vicinity significantly increase the prevalence of resistant bacteria compared to a similar urban area remote from hospital. Diverse clinically relevant cephalosporins and carbapenems resistant bacteria have been isolated. Surprisingly, a NDM-producing *Escherichia coli*, which is a highly resistant and emerging pathogen was reported for the first time in a French River. The clone was detected in two independent sampling showing its persistence. The *bla*_{NDM-5} gene and its surrounding sequences were described on a transferable IncX3 plasmid, indicating possible genetic transfer to other bacteria. The antimicrobial resistance in karst groundwater varied in time and space and was hardly compared with that described in related rivers.

In urban settings, water quality and infectious risk is generally assessed on sewers and wastewater treatment plants effluents. This study shows that runoff waters in urbanized area contribute to the emergence and dissemination of antimicrobial resistance. Considering the worrisome epidemiology of infectious diseases, it urges to decipher all environmental reservoirs for resistant bacteria in order to complete knowledges about the epidemiological cycle of antimicrobial resistance and try to break or slow down it.

Keywords: Resistant bacterial communities, Resistant bacterial pathogens, Urban river and runoff, Hospital, Karstic groundwater, Carbapenemase-producing enterobacteria

Résumé

Les écosystèmes aquatiques soumis à des pressions anthropiques sont des lieux d'évolution rapide des communautés microbiennes. Cet environnement participe certainement à l'émergence d'agents infectieux résistants aux antibiotiques. La ville de Montpellier est située dans un petit bassin versant qui subit d'une part des épisodes de pluies brutales et d'autre part de fortes pressions démographiques. Le principal hôpital est situé dans une zone de ruissellement comprenant deux petites rivières urbaines provenant d'eaux souterraines karstiques à quelques kilomètres en amont.

L'objectif de cette étude est d'explorer les communautés bactériennes dans les rivières urbaines qui coulent près du centre hospitalier afin d'évaluer l'influence des ruissellements sur la résistance aux antibiotiques dans les communautés bactériennes. Les communautés bactériennes sont également décrites dans les aquifères karstiques en amont.

Une section introductive présente les méthodes disponibles pour l'étude de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement et une revue de la littérature expose les données actuelles sur la résistance aux antibiotiques dans l'eau de ruissellement urbain. Cette partie justifie les stratégies expérimentales. La méthode développée ici, appelée détermination de la concentration inhibitrice à l'échelle de la communauté bactérienne (c-IC, pour *community inhibitory concentration*), est combinée à une description de la richesse taxonomique pour donner une description instantanée des communautés bactériennes résistantes dans les environnements aquatiques. Une stratégie dérivée de l'approche c-IC permet d'explorer la résistance bactérienne dans le système hydrologique urbain près de l'hôpital et dans les aquifères karstiques. Les données microbiologiques recueillies sont complétées par des données hydrologiques, hydrogéologiques, climatiques et physico-chimiques.

L'impact de très faibles concentrations d'antibiotiques sur la structure de la communauté bactérienne dans divers environnements hydriques a été démontré et apparaît comme un indicateur de la vulnérabilité des écosystèmes face aux pressions antimicrobiennes. Le répertoire taxonomique des communautés fluviales urbaines a été décrit et sa dynamique a été confrontée aux conditions environnementales. Le voisinage des hôpitaux augmente significativement la prévalence des bactéries résistantes par rapport à une zone urbaine similaire éloignée de l'hôpital. Des bactéries d'intérêt médical résistantes aux céphalosporines et aux carbapénèmes ont été isolées. De façon surprenante, un *Escherichia coli* producteur de NDM-5, pathogène émergent hautement résistant, a été signalé pour la première fois dans une rivière française. Le clone a été détecté dans deux échantillons indépendants montrant sa persistance. Le gène *bla*_{NDM-5} et son environnement génétique ont été décrits sur un plasmide IncX3 transférable, indiquant un transfert génétique horizontal possible. La résistance aux antimicrobiens dans l'eau souterraine karstique a varié dans le temps et dans l'espace et est difficilement comparable à celle décrite dans les rivières associées.

En milieu urbain, la qualité de l'eau et le risque infectieux sont généralement évalués sur les eaux usées et les effluents des stations d'épuration. Cette étude montre que les eaux de ruissellement dans des zones urbanisées contribuent à l'émergence et à la dissémination de la résistance aux antimicrobiens. Compte tenu de l'épidémiologie inquiétante des maladies infectieuses, cette étude invite à explorer les potentiels réservoirs environnementaux de bactéries résistantes afin de compléter les connaissances sur le cycle épidémiologique de la résistance aux antimicrobiens et essayer de l'interrompre ou de le ralentir.

Mots clés : Communautés de bactéries résistantes, Pathogènes bactériens résistants, Rivières et ruissellements urbains, Hôpital, Eaux souterraines karstiques, entérobactéries productrices de carbapénémase

TABLE DES MATIERES

<i>Liste des abréviations</i>	4
<i>Liste des tableaux</i>	6
<i>Liste des figures</i>	7
A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE : L'ANTIBIORESISTANCE EN MILIEU HYDRIQUE	11
1. GENERALITES SUR L'ANTIBIORESISTANCE	14
1.1 Exemple des β -lactamines.....	16
1.2 Exemple des fluoroquinolones	21
1.3 Effets des antibiotiques sur la croissance bactérienne et définitions de la (des) résistance(s)	23
2. METHODES D'ETUDE DE L'ANTIBIORESISTANCE DANS L'ENVIRONNEMENT	26
2.1. Détection de l'antibiorésistance dans l'environnement	26
2.1.1 Détection de bactéries résistantes aux antibiotiques (ARBs) par culture	26
2.1.2 Détection des gènes de résistance (ARGs) aux ATBs par approches moléculaires	27
2.2. Etude de l'antibiorésistance sur isolats bactériens	28
2.2.1 Détermination de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques par détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	28
2.2.2 Détermination de la sensibilité bactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé.....	29
2.2.3 Etude des gènes de résistance sur souches isolées.....	29
2.2.4 Avantages et limites des méthodes basées sur l'étude d'isolats bactériens.....	31
2.3 Les approches « omiques » de l'antibiorésistance à l'échelle des communautés bactériennes... ..	32
2.3.1 Approches taxonomiques des communautés résistantes.....	32
2.3.2 Approche métagénomique globale des communautés et de l'antibiorésistance	38
2.3.3 Avantages et limites des approches moléculaires « omiques »	40
2.4 Conclusions.....	42
3. IMPACT DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR L'ANTIBIORESISTANCE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EN MILIEU HYDRIQUE	43
3.1 Aspects généraux	43
3.2. Revue de littérature sur l'antibiorésistance dans les eaux de ruissellement en milieu urbanisé .	47
B. PARTIE EXPERIMENTALE	77

1. MISE AU POINT ET EVALUATION D'UNE METHODE MIXTE D'EXPLORATION DE L'ANTIBIORESISTANCE ENVIRONNEMENTALE	80
2. ETUDE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ANTIBIORESISTANTES DANS DES RIVIERES EN ZONE URBAINE PERI-HOSPITALIERE	111
2.1 Introduction	111
2.2 Stratégie de l'étude	113
2.2.1 Sites d'échantillonnage	113
2.2.2 Choix des ATBs et des résistances étudiés	118
2.2.3 Logigramme de l'étude	120
2.3. Materials and Methods	121
2.3.1. Sample collection	121
2.3.2. Physico-chemical Analysis	121
2.3.3. Quantification of fecal indicators bacteria (FIB)	121
2.3.4. Preparation of a bacterial community suspension	122
2.3.5. Cultivation-based approach to study antimicrobial resistance of bacterial communities	122
2.3.6. Selection of resistant human pathogenic bacteria	122
2.3.7. Resistant bacterial community analysis	123
2.3.8. Bacterial identification	124
2.3.9. Disk diffusion assay and resistance phenotype	125
2.3.10. Screening for resistance genes	125
2.3.11. Statistical analysis, clusterisation and partition	126
2.4 Physico-chemical variations among sampling sites and dates	128
2.5 Dynamics of bacteria in urban rivers	129
2.5.1 Dynamics of fecal indicator bacteria (FIB) contamination	129
2.5.2 Abundance of the cultivable bacterial community	130
2.6 Dynamics of resistant bacteria in urban rivers	133
2.6.1 Abundance and spatial dynamics of resistant communities	133
2.6.2 Temporal and seasonal dynamics of the resistant communities	135
2.6.3. Correlation among the rate of ATBs resistant bacteria, fecal indicator bacteria and environmental parameters	140
2.7. Metataxonomy of the river community and river resistant community	142
2.8. Occurrence of pathogenic bacteria resistant to third generation cephalosporin and carbapenem in urban river: qualitative and quantitative assessment	154
2.8.1. Occurrence of resistant bacteria follow-up during one year	154
2.8.2. Identification of resistant bacteria follow-up during one year	158
2.8.3. Study of resistant bacteria of clinical interest	163
2.9. NDM-5-producing- <i>Escherichia coli</i> in an urban river in Montpellier, France	166
2.10. Discussion	169

<i>Appendix : poster communications</i>	174
3. ÉTUDE DE L'ANTIBIORESISTANCE ET DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DANS L'AQUIFERE KARSTIQUE DU LEZ.....	178
3.1. <i>Contexte de l'étude</i>	178
3.2. <i>Introduction</i>	183
3.3. <i>Materiel and methods</i>	185
3.3.1. Study sites and sample collection	185
3.3.2. Physico-chemical Analysis	186
3.3.3. Indicator of fecal contamination	187
3.3.4. Total bacterial community analysis by Automated Ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA).....	187
3.3.5. Cultivation-based approach to study antimicrobial resistance of bacterial communities	187
3.3.6. Resistant cultivable bacterial community analysis	188
3.3.7. Statistical analysis on ARISA profiles	189
3.4 <i>Results</i>	189
3.4.1 Geochemical characterization of water	189
3.4.2. E. coli numeration (FIB, fecal indicator bacteria)	190
3.4.3. Spatial and temporal dynamics of total community	190
3.4.4. Spatial and temporal dynamics of the cultivable community	192
3.4.5. Spatial dynamics of antimicrobial resistance in cultivable community.....	194
3.4.6. Temporal dynamics of antimicrobial resistance level of cultivable community.....	196
3.5. <i>Discussion</i>	198
<i>Appendix : poster communications</i>	203

C- DISCUSSION GENERALE – CONCLUSION.....211

CONCLUSION	217
BIBLIOGRAPHIE.....	218

Liste des abréviations

ADCP	Accoustic Doppler Current profiler
AMX	Amoxicillin
APS	Ammonium Persulfate
ARBs	Antibiotic Resistant Bacteria
ARGs	Antibiotic Resistance Genes
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ATBs	Antibiotiques <u>ou</u> antibiotics
AWC	Adjusted Wallace Coefficient
BHRe	Bactéries Hautement Résistantes émergentes
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLSE	β -Lactamases à Spectre Etendu <u>ou</u> Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)
BRAs	Bactéries Résistantes aux Antibiotiques
CARB	CARBapenem
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CA-SFM	Committee of the Antibiogram of the French Society of Microbiology
CAZ	Ceftazidime
Cet	Cetrimide agar
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
c-IC	Community-Inhibitory Concentration
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice <u>ou</u> Minimum Inhibitory Concentration (CMI)
CMS	Concentration Minimale de Selection <u>ou</u> Minimum Selective Concentration (MCS)
CPE	Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae
CPM	Concentration Préventive de l'apparition de Mutants
CTX	Cefotaxime
CTX-M	CefoTaximase-Munich
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DI	Diversity Index
DOC	Dissolved Oxygen Concentration
Drig	Drigalski agar
EC	Electrical conductivity
ECOFF	Epidemiological Cut-OFF
EGMs	Eléments Génétiques Mobiles <u>ou</u> Mobile Genetic Elements (MGEs)
EPC	Entérobactéries Productrices de Carbapénémases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAPL	Font d'Aurette Après Lapeyronie
FAVL	Font d'Aurette Avant Lapeyronie
FIB	Fecal Indicators Bacteria
HSM	HydroSciences Montpellier
IMP	Imipenem
IPA	Indice des Précipitations Antérieures <u>ou</u> API Anterior Precipitation Index
IAS	Infections Associées aux Soins
KPC	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase
MA	Marine Agar
Mac	MacConkey agar
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass spectrometry
MBL	Metallo- β -Lactamase
MDR	MultiDrug Resistant
MHA	Mueller-Hinton agar
MLST	Multilocus sequence typing
NDM	New Delhi Metallo- β -lactamase
NGS	Next Generation Sequencing

OFL	Ofloxacin
OHM	Observatoire hommes-milieux
OPPPs	Opportunistic Premise Plumbing Pathogens
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
OTUs	Operational Taxonomic Units
OXA-48	OXAacillinase
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PBP	Penicillin Binding Proteins
PCA	Principal Component Analysis
PCB	PolyChlorBiphenyl
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PFOS	PerFluoro-Octane Sulphonate
PLP	Protéines de Liaison Pénicilline
QRDR	Quinolone Resistance-Determining Region
QAC	Quaternary Ammonium Compounds
RDPII	Ribosomal Database Project
RESCon	Resistance readiness condition
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SHV	SulfHydryl Variable
SPM	Suspended Particulate Matter
STEP	Station d'épuration
SXT	SulfamethoXazole/ Trimethoprim
TAE	Tris/acetate/EDTA
TEM	TEMoneira
TEMED	TetraMethylEthyleneDiamine
TET	TETracycline
TGH	Transfert Génétique Horizontal <u>ou</u> Horizontal gene transfer (HGT)
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TSA	Trypticase Soy Agar
TTGE	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
VAPL	Verdanson Après Lapeyronie
VAVL	Verdanson Avant Lapeyronie
VIM	Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase
UFCs	Unité Formant colonie <u>ou</u> Colony Forming units (CFU)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic
WWTPs	WasteWater Treatment Plants

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des β -lactaminases

Tableau 2 : Données prévisionnelles d'évolution de la population de l'agglomération de Montpellier

Tableau 3 : IPA des dates de prélèvements

Table 4: Environmental parameter in 4 the studied sites.

Table 5: OTUs identified at the four sampling sites and presented according to their family and their prevalence.

Table 6: Numbers and names of the strains according to the sampling sites and the dates, identified by MALDI-TOF MS and/or 16S rRNA gene and isolated from Drigalski agar with ceftazidime (4 mg/L) media.

Table 7: Numbers and names of the strains according to the sampling sites and the dates, identified by MALDI-TOF MS and/or 16S rRNA gene and isolated from MacConkey agar with cefotaxime (4 mg/L) media.

Table 8: Numbers and names of the strains according to the sampling sites and the dates, identified by MALDI-TOF MS and/or 16S rRNA gene and isolated from Cetrimide agar media supplemented with ceftazidime (4 mg/L).

Table 9: Numbers and names of the strains according to the sampling sites and the dates, identified by MALDI-TOF MS and/or 16S rRNA gene and isolated from chromID® CARBA media

Table 10: Numbers and names of the strains according to the sampling sites and the dates, identified by MALDI-TOF MS and/or 16S rRNA gene and isolated from chromID® OXA-48 media.

Table 11: Antibioresistance profiles of the 20 *P. aeruginosa* strains.

Table 12: Chemical composition of water samples collected during the 4 campaigns

Liste des figures

Fig.1 : Principales familles d'antibiotiques et mécanismes de résistance associés.

Fig.2 : Mécanismes développés par les bactéries pour résister aux β -lactamines.

Fig.3 : Frise chronologique montrant que l'utilisation de nouvelles β -lactamines est rapidement suivie de l'apparition de résistances.

Fig.4 : Relevé mensuel d'épisodes d'infections causées par une entérobactérie productrice de carbapénémase (EPC), en France, entre 2004 et 2014.

Fig.5 : Les grands axes de circulation des EPC depuis 1996.

Fig.6 : Mécanismes de résistance des bactéries aux quinolones.

Fig.7 : Représentation de la contribution de mécanismes de résistance sur le niveau de résistance aux fluoroquinolones.

Fig.8 : Effet de l'antibiotique en fonction de la concentration administrée.

Fig.9 : Principe général d'analyse d'ADN par puces à ADN.

Fig.10 : Structure du gène de l'ARNr 16S.

Fig.11 : La technique principale de la méthode MALDI-TOF.

Fig.12 : principe de la technique d'analyse par TTGE.

Fig.13 : Analyses métagénomiques par NGS (new generation sequencing).

Fig.14 : Métagénomique fonctionnelle appliquée à l'antibiorésistance .

Fig.15 : Seuils de détection des approches métagénomiques en fonction de la technologie de séquençage et comparaison aux approches par culture ciblée.

Fig.16 : Provenance des xénobiotiques et effets de l'exposition sur les bactéries hydriques.

Fig.17 : Effet d'un stress antibiotique sur les réarrangements génétiques d'un intégron.

Fig.18 : Mécanismes de transfert génétique horizontal chez les bactéries.

Fig.19 : Croissance démographique annuelle entre 2006 et 2011 dans Montpellier Méditerranée Métropole et aux alentours.

Fig.20 : Profil de précipitations enregistrées à la station météorologique de Montpellier-Fréjorgues pendant la période de prélèvements.

Fig.21 : Présentation des sites d'échantillonnages.

Fig.22 : Hyétogramme et débit journalier du Lez couvrant la période d'échantillonnage.

Fig.23 : Evolution sur 10 ans (2005-2015) de la consommation par molécule en ville, en établissement de santé et en santé animale en France.

Fig.24 : Logigramme du protocole expérimental.

Fig.25 : Abundance of fecal indicator bacteria (FIB) in the 4 sampling sites.

Fig.26 : Distribution of total cultivable bacterial communities in the Font d'Aurelle and Verdanson rivers.

Fig.27 : Seasonal variation of total communities in the study area.

Fig.28 : Mean resistance percentages (%) of bacterial communities isolated from Font d'Aurelle and Verdanson Rivers to 5 antibiotics at different concentration during period of 12 months.

Fig.29 : Annual dynamics of resistance percentages in bacterial communities isolated from the 4 sampling sites.

Fig.30 : The mean resistance percentages (%) from water samples from Font d'Aurelle and Verdanson rivers during cold season (Autumn/Winter) and warm season (Spring/Summer) for 5 antibiotics.

Fig.31 : Principal component analysis (PCA) of the most significant water variables and fecal indicator bacterial Community shaping the resistant microbial community composition in the two urban rivers .

Fig.32 : Diversity representation by of OTUs of total and AMX-resistant communities at 0.0312 and 8 mg/L during 12 months period of study.

Fig.33 : Distribution of bacterial families of the cultivable community according to sampling sites.

Fig.34 : UPGMA clusterisation of Verdanson River community profiles defined to the genus level and compared to sampling sites, to AMX concentration, to diversity index (crude number of OTUs) and to months/seasons.

Fig.35 : UPGMA clusterisation of Font d'Aurelle River community profiles defined to the genus level and compared to sampling sites, to AMX concentration, to diversity index (crude number of OTUs) and to months/seasons.

Fig.36 : Annual dynamics of family diversity of AMX resistant cultivable communities in Verdanson River.

Fig.37 : Annual dynamics of families diversity of AMX resistant cultivable communities in Font d'Aurelle River.

Fig.38 : UPGMA clusterisation of cultivable communities growing without ATB and compared to the resistance rate observed for the same communities against the 5 ATBs at the concentration of critical clinical breakpoints.

Fig.39 : Percentage of bacteria resistant to CAZ among gram-negative bacteria growing onto drigalski medium.

Fig.40 : Percentage of bacteria resistant to CTX among gram-negative bacteria growing onto MacConkey (McC) medium.

Fig.41 : Concentration of bacteria growing on cetrimide medium and on cetrimide supplemented with CAZ.

Fig.42 : Carbapenem resistant community isolated from Font d'Aurelle and Verdanson rivers grown on CARBA/OXA media during 12 months.

Fig.43 : Système de pompage à la source du Lez.

Fig.44 : Schéma de l'aquifère du Lez.

Fig.45 : Présentation des sites de prélèvement.

Fig.46 : Sampling design according to hydrogeological conditions.

Fig.47 : Quantification of *E. coli* according to sites and sampling campaigns

Fig.48 : Bacterial community structure analysis for the April 2014 campaign (middle flow conditions).

Fig.49 : Bacterial community structure analysis during an intense flood event, October 2014 campaign.

Fig.50 : Bacterial P5 borehole community structure analysis depending on hydrological conditions.

Fig.51 : Quantification of total cultivable bacteria according to the sites and the sampling campaigns in CFU/mL.

Fig.52 : Repertory of bacterial families in the 4 sampling sites.

Fig.53 : Temporal dynamics of Lez spring communities.

Fig.54 : Relative abundance of bacterial families in water samples from the Lez spring, Gour Noir borehole, P12 borehole and P5 borehole according to the selecting antibiotic and the antibiotic concentrations in mg/L.

Fig.55 : Concentration of antibiotics inhibiting the growth of 50 % (c-IC50) of the bacterial community.

Nos travaux de thèse ont consisté en l'exploration et la caractérisation des communautés bactériennes résistantes aux antibiotiques (ATB) dans le bassin versant du fleuve côtier le Lez qui accueille la zone urbaine de Montpellier, France. Nous avons particulièrement étudié la zone karstique source en amont de la ville et les cours d'eau urbains qui coulent à proximité de l'hôpital de Montpellier. La région de Montpellier est un territoire qui présente : 1) des épisodes climatiques brutaux modifiant les niches des micro-organismes, 2) une forte démographie, 3) un hôpital de 2700 lits situé en ville et dans une zone de débordement, 4) une interface rapprochée entre les niches « technologiques » (ville, hôpital, etc.), les eaux douces, les eaux saumâtres et la mer. Ces conditions sont des facteurs de déséquilibre brutaux pouvant favoriser l'émergence de pathogènes et leur résistance. Ce système particulier soutient notre projet de thèse. De plus, nous avons à disposition les données d'épidémiologie des IAS et d'épidémiologie de la résistance au niveau régional.

Ce travail de thèse se structure en plusieurs parties. Dans la première partie, une synthèse bibliographique expose des données générales sur l'antibiorésistance et les indicateurs du risque infectieux d'origine hydrique avant de cibler la problématique de l'antibiorésistance environnementale dans les contextes des eaux de ruissellement urbain et des eaux souterraines d'aquifères karstiques.

La partie expérimentale prend appui sur la validation d'une méthode permettant d'évaluer les effets d'antibiotiques sur l'abondance et la richesse de communautés bactériennes cultivables provenant d'eau de surface. Les résultats s'articulent autour de :

- l'étude de la dynamique des communautés bactériennes résistantes dans une rivière urbaine ;
- la diversité et la caractérisation de bactéries résistantes (ARBs pour *antibiotic resistant bacteria*) pathogènes, porteuses notamment de résistances à problématique émergente, bactéries provenant de cette même rivière urbaine ;
- l'étude de l'antibiorésistance, la composition et de la dynamique des communautés bactériennes dans les eaux souterraines d'un aquifère karstique.

Enfin, les résultats sont discutés et les apports de ces travaux dans l'avancée des connaissances sur de l'antibiorésistance en milieu hydrique sont exposés.

**A. Synthèse bibliographique :
l'antibiorésistance en milieu hydrique**

Depuis la découverte de la pénicilline, soit depuis presque 90 ans de recherche et de développement d'antibiotiques et après des années d'utilisation massive de ces antibiotiques, force est de constater que les grands succès thérapeutiques ont été enrayés par l'émergence de bactéries pathogènes toujours plus résistantes. Il est clairement démontré que la résistance clinique aux antibiotiques est la conséquence de l'utilisation inappropriée d'antibiotiques en médecine humaine, médecine vétérinaire et en agriculture.

En France, comme dans de nombreux pays développés à haut niveau d'hygiène collective, les infections bactériennes à plus forte morbi-mortalité sont aujourd'hui les infections associées aux soins (IAS). Mais dans ce contexte, l'hôpital n'est plus à considérer comme un système clos hébergeant des pathogènes particuliers mais plutôt comme un amplificateur révélateur du risque infectieux général qui, pour la population générale, réside essentiellement dans l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. La communauté scientifique se mobilise aujourd'hui face à cette problématique mondiale, priorité de l'OMS (OMS, 2016). Pourtant, trop souvent, la résistance décrite chez l'homme est dissociée de l'antibiorésistance observée dans les communautés microbiennes et les résistomes d'écosystèmes naturels proches de l'homme, ce qui donne une vision partielle des mécanismes d'émergence, de persistance et de transmission des bactéries pathogènes résistantes et leur impact sur la santé humaine.

Les écosystèmes aquatiques sont des intégrateurs qui reçoivent les apports extérieurs des bassins versants exposés à la fois aux contaminants chimiques issus de l'industrie, de l'agriculture et de la médecine, et aux communautés microbiennes du sol, des plantes, des animaux et de l'homme. L'eau et les écosystèmes aquatiques sont impliqués dans la dispersion et le transfert des contaminants chimiques et des micro-organismes résistants mais forment aussi une matrice d'interaction permettant le contact de micro-organismes de diverses origines et les échanges de gènes (Baquero et al., 2008). L'évaluation du rôle de réservoir d'antibiorésistance des écosystèmes aquatiques naturels et anthropisés est une étape indispensable pour argumenter le rôle de l'antibiorésistance environnementale dans l'émergence de bactéries pathogènes résistantes, l'exposition humaine et les conséquences en santé humaine (Allen et al., 2010). Il est à souligner qu'environ un quart des IAS impliquent des bactéries multirésistantes d'origine environnementale à réservoir hydrique telle que *Pseudomonas aeruginosa* et que selon l'institut de veille sanitaire, la forme multirésistante de cette espèce bactérienne a été impliquée en 2012 dans au moins 6000 décès dans la population française hospitalisée ou non (Colomb-Cotinat et al., 2015).

Les données sur les communautés microbiennes et les résistomes (Gaze et al., 2013) de la plupart des écosystèmes aquatiques proches de l'homme sont parcellaires. Or, soumis à des pressions anthropiques, le fonctionnement des écosystèmes et la dynamique des micro-organismes

qui les composent peuvent être modifiés. Le déséquilibre de ces écosystèmes anthropisés crée des conditions favorisant l'évolution rapide des communautés microbiennes pouvant conduire à l'émergence d'agents pathogènes résistants présentant des risques pour les sociétés humaines, en particulier en termes d'épidémie. Ainsi, outre les paramètres classiques de mesure de la qualité de l'eau, l'évaluation du niveau de résistance des communautés bactériennes sont des paramètres pertinents à étudier.

Cette synthèse bibliographique développe des aspects généraux sur l'antibiorésistance, sur la diversité des mécanismes de résistance aux antibiotiques, sur les principales méthodes disponibles pour l'étude des communautés bactériennes résistantes ainsi que sur les différents indicateurs utilisés pour évaluer le risque infectieux d'origine hydrique. Ces données générales serviront de base à une synthèse approfondie sur l'antibiorésistance dans les eaux de ruissellement en milieu urbain.

1. Généralités sur l'antibiorésistance

Du grec *anti* « contre » et *bios* « la vie », les antibiotiques ont été définis pour la première fois en 1909, par Paul Erlich (1854-1915), sans qu'on les nomme encore antibiotiques : « *Pour être utilisable pour le traitement des maladies infectieuses, une substance doit être dotée de toxicité sélective, c'est à dire qu'elle doit inhiber ou détruire le microorganisme parasite, tout en restant inoffensive pour les cellules hôtes* ». La découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, puis de nombreux autres antibiotiques dans les décennies suivantes (Zakeri and Lu, 2013), ont conduit à une nouvelle définition, proposée en 1943 par Selman Waksman : « *substance chimique produite par des micro-organismes capable d'inhiber le développement ou de détruire les bactéries* ». L'essor de la chimie va conduire à la définition actuelle proposée par Raymond Turpin et Henry Velu (1957) « *composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse [...] dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certaines cellules des êtres pluricellulaires* ». L'utilisation du mot « antibiotiques » est aujourd'hui limitée aux substances à activité antibactériennes.

L'OMS a donné une définition de la résistance bactérienne, basée sur des notions cliniques « un germe est dit résistant quand la concentration d'antibiotique qu'il est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration qu'il est possible d'atteindre *in vivo* » mais aussi épidémiologiques « une souche microbienne ou une bactérie sont aussi dites résistantes quand elles supportent une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce ou des individus de la même culture » (Chabbert, 1982; Courvalin and Philippon, 1989).

Du fait de leur structure et propriétés chimiques, de leur mode d'action et des caractéristiques des bactéries, les antibiotiques ont un certain spectre d'action, c'est-à-dire un panel de bactéries sur lesquelles ledit antibiotique pourra exercer une activité inhibitrice (**bactériostatique**) ou destructrice (**bactéricide**).

A titre d'exemple, par rapport aux bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe qui constitue une barrière supplémentaire à la pénétration des antibiotiques (Delcour, 2009). Les composés de poids moléculaire inférieur à 600 Da peuvent traverser cette membrane externe, à travers les porines, alors que les composés de poids moléculaire de plus de 1000 Da peuvent traverser la paroi des bactéries à Gram positif (O'Shea and Moser, 2008). Cette

résistance intrinsèque, c'est-à-dire naturelle est une caractéristique propre d'une espèce, genre ou groupe de bactéries, est toujours transmise à la descendance et entre dans la détermination du spectre d'action des antibiotiques. En opposition, la **résistance acquise** est un phénotype qui ne va concerner que certains individus bactériens au sein d'une espèce. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert génétique horizontal. Toutefois, en absence de pression de sélection, le trait de résistance peut être perdu.

A travers les exemples de grandes familles d'antibiotiques, les principaux mécanismes de résistance sont présentés ci-dessous :

- résistance par inactivation ou modification de l'antibiotique ;
- modification de la cible réduisant les capacités de liaison de l'antibiotique à sa cible ;
- modifications métaboliques contournant l'effet de l'antibiotique ;
- réduction de l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique (réduction de la perméabilité et/ou augmentation de l'efflux actif (**Fig. 1**).

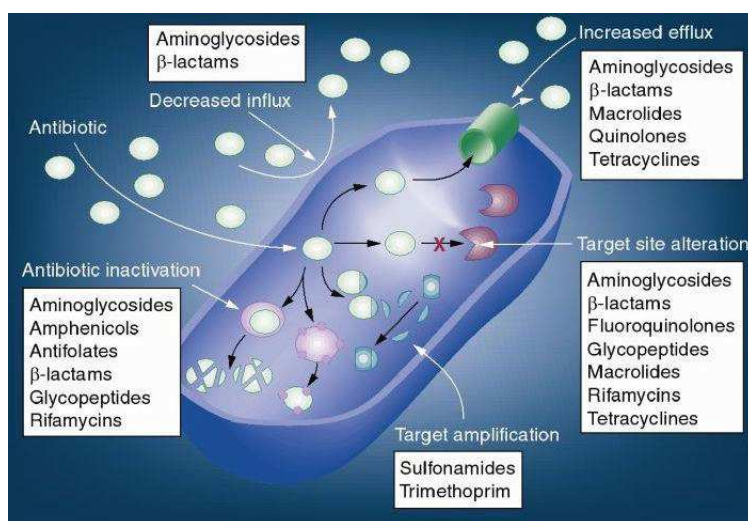


Fig. 1 : Principales familles d'antibiotiques et mécanismes de résistance associés ; figure de (Schmieder and Edwards, 2012).

1.1 Exemple des β -lactamines

Les β -lactamines constituent une importante famille d'antibiotiques, représentant 60% (en poids) des antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire depuis les 60 dernières années (Saini and Bansal, 2012). La plupart des β -lactamines utilisées aujourd'hui sont des dérivés d'hémi-synthèse de molécules naturellement produites par des microorganismes : *Penicillium notatum* et *Penicillium chrysogenum* pour la pénicilline, *Cephalosporium acremonium* pour les céphalosporines (Elander, 2003) ou encore *Streptomyces cattleya* pour les carbapénèmes (Kahan et al., 1983).

Les β -lactamines agissent en se liant aux protéines de liaison pénicilline (PLP) ou *penicillin binding proteins* (PBP). Ces protéines sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, constituant essentiel de la paroi de la plupart des bactéries. L'inactivation de ces enzymes par liaison covalente avec les β -lactamines se traduit par une inhibition de la synthèse du peptidoglycane, entraînant un arrêt de la division bactérienne et la mort de la bactérie (Ghuysen, 1991).

Les 3 mécanismes de résistance aux β -lactamines (**Fig. 2**) sont basées sur :

- une réduction de l'accès à la cible :
 - par entrée limitée des β -lactamines par modification des porines, notamment par expression de la porine OprD ;
 - par efflux augmenté : plusieurs mécanismes d'efflux ayant été décrits ;
- une réduction de l'affinité des PLPs notamment observées chez les bactéries à Gram positifs comme les PLP2a ou PLP2c codées respectivement par les gènes *mecA* et *mecC* chez *Staphylococcus aureus* ;
- une hydrolyse de l'antibiotique par des β -lactamases, mécanisme majeur chez les bactéries à Gram négatif, qui va être détaillé ci-dessous.

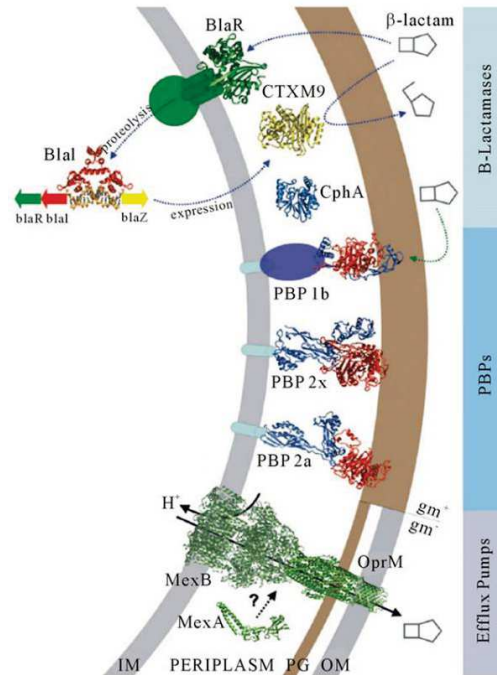


Fig. 2 : Mécanismes développés par les bactéries pour résister aux β -lactamines ; figure modifiée d'après (Wilke et al., 2005) gm +/- = Gram-positif/négatif ; IM = membrane interne (inner membrane) ; OM = membrane externe (outer membrane), PG = peptidoglycane ; CTXM9 et CphA = exemple de B-lactamases ; MexA,B–OprM = exemple de pompe à efflux chez les bactéries gm⁻ ; PBP1b, 2x, 2a = PBP modifiées ou additionnelles, de faible affinité pour les pénicillines.

De nombreuses bactéries à Gram négatif possèdent des gènes chromosomiques codant les β -lactamases et produisent naturellement à faible dose des β -lactamases, très certainement en réponse à la présence de β -lactamines naturelles dans l'environnement. L'expression des gènes des β -lactamases est fortement régulée. La surexpression des β -lactamases peut être induite par les β -lactamines par dérégulation de gènes organisés en opéron. Par exemple, BlaR est une protéine à domaines sensor transmembranaire. Elle transmet le signal de fixation d'une β -lactamine qui induit la protéolyse du répresseur BlaI et l'expression dérégulée de la β -lactamase. D'autre part, des gènes de β -lactamases à haut niveau constitutif d'expression sont souvent retrouvés sur des plasmides ou divers éléments génétiques mobiles et diffusent dans les communautés et populations bactériennes soumises à forte pression de sélection antibiotique. Ces résistances plasmidiques sont les plus redoutables en termes d'émergence et de diffusion de la résistance. Leur impact clinique et épidémiologique est majeur.

Les β -lactamases sont nombreuses et diverses et 2 classifications, l'une structurale (classification d'Ambler, (Ambler, 1980), l'autre fonctionnelle (classification de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush et al., 1995) ont été proposées (**Tableau 1**).

Tableau 1 : classification des β -lactaminases ; Tableau de (Saini and Bansal, 2012)

Ambler class	Bush-Jacoby Medeiros group	Active site	Enzyme type	Host organisms	Substrates
A	2b, 2be, 2br, 2c, 2e, 2f	Serine	Broad-spectrum β -lactamases (TEM, SHV) ESBL (TEM, SHV, CTX-M) Carbapenemases (KPC, GES, SME)	Enterobacteriaceae and nonfermenters	Ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins All β -lactams
B	3	Zinc-binding thiol group	Carbapenemases (VIM, IMP)	Enterobacteriaceae and nonfermenters	All β -lactams
C	1	Serine	AmpC cephamycinases (AmpC) AmpC cephamycinases (CMY, DHA, MOX FOX, ACC)	<i>Enterobacter</i> species <i>Citrobacter</i> species	Cephameycins, 3rd-generation cephalosporins
D	2d	Serine	Broad-spectrum β -lactamases (OXA) ESBL (OXA) Carbapenemases (OXA)	Enterobacteriaceae Enterobacteriaceae and nonfermenters	Cephameycins, 3rd-generation cephalosporins Oxacillin, ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins All β -lactams

Au fur et à mesure de l'utilisation de nouvelles molécules de cette famille, des mécanismes de résistance ont émergé (**Fig. 3**). L'histoire de l'émergence et de la dissémination de la résistance *via* les β -lactamases plasmidiques chez les bactéries à Gram négatif peut se décomposer en 4 vagues successives. La première vague comprend l'émergence de pénicillinases de spectre étroit appelées TEM-1/2 (TEMoneira, nom du patient) et SHV-1 (pour SulfHydryl Variable) dès 1962 lorsque l'ampicilline fût utilisée pour traiter les infections à Gram négatif (**Fig. 3**). Ces résistances conduisirent à la mise sur le marché de nouveaux médicaments associant l'amoxicilline et un inhibiteur des β -lactamases, l'acide clavulanique, mais aussi de céphalosporines non hydrolysées par les pénicillinases de spectre étroit. La surconsommation de ces céphalosporines conduisit à une deuxième vague d'émergence dans les années 1980 avec l'apparition des BLSE (β -lactamases à spectre étendu), conférant une résistance aux céphalosporines de 3^e génération (Jacoby and Medeiros, 1991) (**Fig. 3**). Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSE détectées dérivait par mutation génique des gènes des β -lactamases à spectre étroit TEM-1/2 et de SHV-1. Les années 1990 virent l'émergence et la propagation d'un nouveau type de BLSE appelées CTX-M (CefoTaXimase-Munich) (Tzouveleki et al., 2000). Ces enzymes CTX-M ont très rapidement diffusé au sein de la famille des entérobactéries et à l'échelle de la planète (Qi et al., 2010). Parmi les β -lactamines, les carbapénèmes (imipénème mis sur le marché en 1985) résistaient encore à l'hydrolyse par les BLSE γ compris CTX-M mais dès 1993, l'apparition et la propagation de carbapénémases correspondra à la quatrième vague d'émergence de β -lactamases (**Fig. 3**) (Queenan and Bush, 2007). Les carbapénémases confèrent la résistance à toutes les β -lactamines et sont souvent associées à des résistances à d'autres classes du fait de co-sélection d'éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance (ARGs pour antibiotic resistance genes) à plusieurs classes d'antibiotiques. L'émergence de carbapénémases représente un problème actuel majeur de santé publique puisque les carbapénèmes sont souvent

utilisés en traitement de dernière ligne dans les infections graves causées par des bactéries à Gram négatif résistantes aux autres antibiotiques.

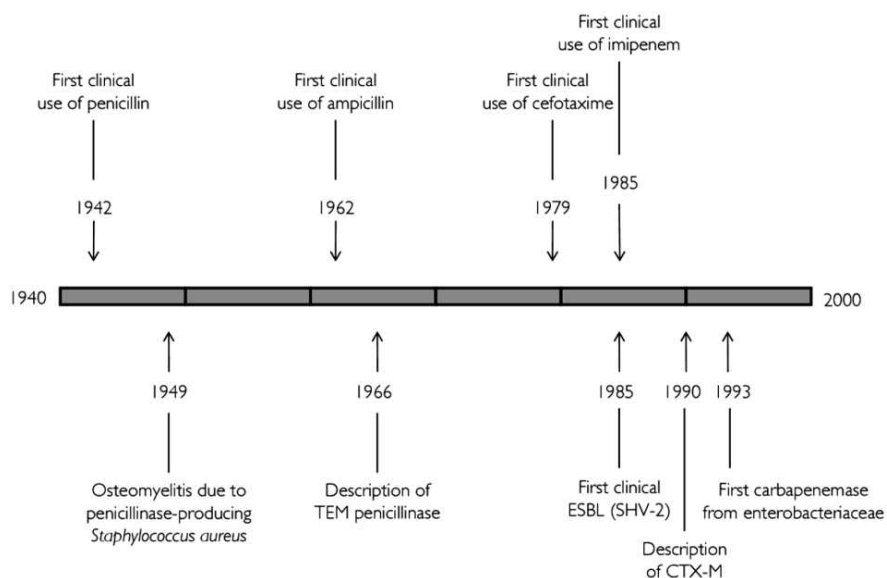


Fig. 3 : Frise chronologique montrant que l'utilisation de nouvelles β -lactamines est rapidement suivie de l'apparition de résistances ; figure de (Rice, 2012)

Les carbapénémases de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ainsi que les métallob-lactamases VIM (*Verona* integron-encoded metallo- β -lactamase), IMP (Imipenem) et NDM (New Delhi metallo- β -lactamase) et OXA-48 (oxacillinase) sont parmi les plus répandus des carbapénémases (Nordmann et al., 2011). En France, les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) sont surveillées (**Fig.4**) car considérées comme des bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe). Les autorités de santé publiques mettent tout en œuvre pour limiter cette émergence (HCSP, 2013). De plus, la dissémination globale de ces carbapénémases fait des bactéries productrices de carbapénémases une menace de dimension mondiale (**Fig. 5**).

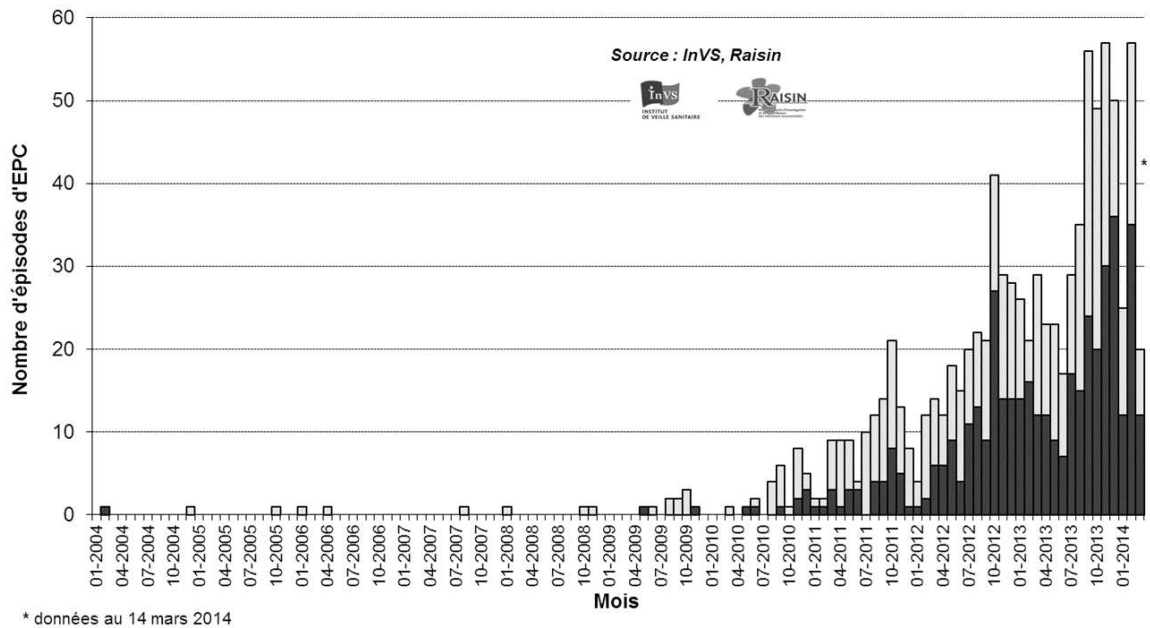


Fig. 4 : Relevé mensuel d'épisodes d'infections causées par une entérobactérie productrice de carbapénémase (EPC), en France, entre 2004 et 2014, (N= 913 épisodes), Santé publique France, <http://invs.santepubliquefrance.fr> ; en gris clair les épisodes avec lien avec un pays étranger, en gris foncé les épisodes sans lien rapporté avec l'étranger



Fig. 5 : Les grands axes de circulation des EPC depuis 1996 ; figure de (McKenna, 2013)

1.2 Exemple des fluoroquinolones

Contrairement aux β -lactamines, les quinolones et fluoroquinolones sont des antibiotiques de synthèse. Ils constituent une large classe d'antibiotiques utilisée depuis les années 1980 dans de nombreux contextes infectieux.

Les cibles de ces antibiotiques sont des enzymes intracytoplasmiques (Topoisomérases II) impliquées dans la réplication, la transcription, la recombinaison et la réparation de l'ADN en contrôlant le surenroulement de l'ADN (par réaction de clivages et ligations) :

- l'ADN gyrase (topo isomérase II) composée de 2 paires de 2 sous unités, GyrA et GyrB codées par *gyrA* et *gyrB*.
- la topo-isomérase IV composée de 2 paires de sous-unités, ParC et ParE codés par *parC* ou *parE* chez les bactéries à Gram négatif et GrlA et GrlB codées par *grlA* et *grlB* chez les bactéries à Gram positif (Hawkey, 2003).

Se fixant de façon irréversible, les quinolones inhibent ces enzymes, ce qui bloque la division et entraîne la mort des bactéries. Lors de la mise sur le marché de ces médicaments, la résistance apparaissait peu probable puisque la cible d'action est un élément central et très conservé essentiel à la vie cellulaire bactérienne. En effet, la plupart des mutations sur les gènes cibles pouvant conférer une résistance sont létales pour la bactérie. De plus, les quinolones étant des produits de synthèse, des molécules proches ne sont pas retrouvées dans l'environnement naturel comme c'est le cas pour les β -lactamines. Ainsi, on ne connaît pas dans le monde bactérien d'enzymes pré-existantes susceptibles de dégrader les quinolones et fluoroquinolones. La désillusion vint rapidement puisque les premières résistances aux fluoroquinolones sont apparues 2 ans après leur mise sur le marché. Différents mécanismes peuvent être mis en jeu pour résister à cette famille d'antibiotiques (**Fig. 6**).

Les bactéries à Gram positif et Gram négatif peuvent être résistantes aux fluoroquinolones par **mutations** des enzymes cibles, au niveau d'une région particulière (la seule non létale pour la bactérie), *quinolone resistance-determining region* « QRDR », entraînant un défaut d'affinité des quinolones pour la cible tout en conservant la fonction enzymatique vitale. En général, une mutation ponctuelle ne va conférer qu'une résistance modérée à l'antibiotique et c'est une association de mutations sur les différentes enzymes qui confèrent une résistance de haut niveau.

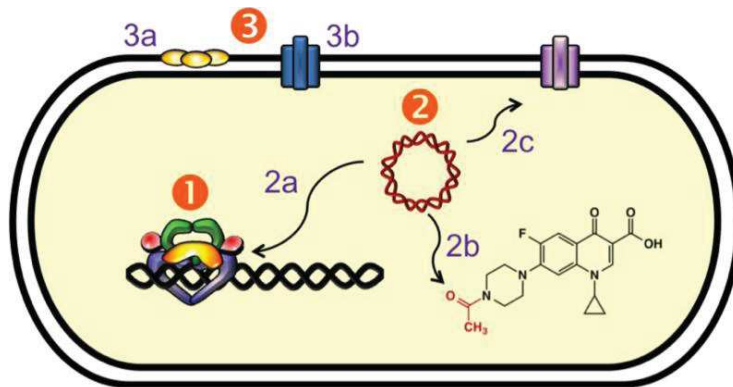


Fig 6 : Mécanismes de résistance des bactéries aux quinolones ; figure de (Aldred et al., 2014)

(1) résistance par mutation de la gyrase (vert et bleu) ou de la topoisomérase IV (rouge) affaiblissant l'affinité d'interaction de l'antibiotique avec sa cible.

(2) Résistance médiée par un plasmide : (2a) synthèse de protéines Qnr (jaune) qui protègent le complexe topoisomérase-ADN et provoquent une diminution de la fixation de l'antibiotique ; (2b) Aac(6')-Ib-cr, enzyme (aminoglycoside acetyltransferase) qui modifie l'antibiotique et en diminue l'efficacité ; (2c) pompes à efflux qui diminuent la concentration intracellulaire de l'antibiotique

(3) Résistance chromosomique : (3a) sous-expression de porines ; (3b) sur-expression de systèmes d'efflux.

Un autre mécanisme de résistance aux quinolones et fluoroquinolones est l'augmentation de l'expression ou l'acquisition de **pompes d'efflux** entraînant un défaut d'accumulation de l'antibiotique dans les bactéries et responsable de résistance à d'autres familles d'antibiotiques (résistance croisée). La **diminution de l'expression des porines** limite également l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule bactérienne, les 2 mécanismes pouvant être isolés ou combinés.

Un faible niveau de résistance est attribué à la protection des topoisomérases grâce à la **protéine Qnr** codée par un gène plasmidique. Cette protéine gênerait la fixation des quinolones sur les topoisomérases, sans en altérer l'activité (**Fig. 6**).

Les entérobactéries peuvent aussi résister en inactivant les quinolones via une **acétyltransférase** présente chez de nombreuses bactéries et capable d'inactiver les aminosides (antibiotiques d'origine naturelle). L'enzyme pré-existante à l'utilisation des fluoroquinolones a vu son spectre d'activité s'étendre des aminosides aux fluoroquinolones (Jehl et al., 2012). La combinaison de ces mécanismes de résistance va conférer des niveaux de résistance variable (**Fig. 7**).

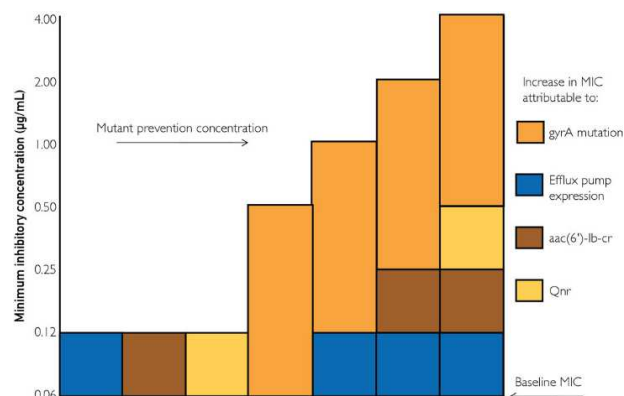


Fig. 7 : Représentation de la contribution de mécanismes de résistance sur le niveau de résistance aux fluoroquinolones. Dans cet exemple, la concentration minimale inhibitrice (MIC) est de 0,006µg/mL ; figure de (Rice, 2012).

1.3 Effets des antibiotiques sur la croissance bactérienne et définitions de la (des) résistance(s)

Les effets des antibiotiques sont qualifiés et quantifiés grâce à divers paramètres. La **Concentration Minimale Inhibitrice (CMI ou MIC)** est définie comme la plus faible concentration d'une substance active qui inhibe la croissance visible d'une culture pure après incubation. La **Concentration Minimale Bactéricide (CMB ou MBC)** est définie comme la plus faible concentration d'une substance active capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum. Si ces deux paramètres sont proches, l'ATB sera considérée comme bactéricide aux doses thérapeutiques alors qu'il sera dit bactériostatique si les deux paramètres sont plus éloignés. Enfin, si la CMB est très supérieure à la CMI (32 fois ou plus), la bactérie sera considérée comme tolérante à l'ATB puisqu'une dose élevée d'ATB produira une inhibition mais ne sera pas létale.

Par ailleurs, dans une ancienne étude sur la relation entre la dose suboptimale d'acide nalidixique (quinolones) et l'émergence de souches résistantes (Stamey and Bragonje, 1976), une augmentation du nombre de souches résistantes a été montrée avec une diminution de la concentration de l'acide nalidixique. Des résultats similaires ont été généralement rapportés avec un enrichissement des populations bactériennes résistantes lors de l'utilisation d'antibiotiques à des concentrations faibles sur de longues périodes (Gullberg et al., 2011). Une étude récente a montré que traiter *Escherichia coli* à des concentrations sublétales d'antibiotique induisait la formation de superoxydes et de radicaux hydroxylés, produits cytotoxiques et mutagènes qui conduisent à l'émergence secondaire de mutants résistants (Kohanski et al., 2010). Ce mécanisme de toxicité par formation de radicaux hydroxyles a été démontré chez les bactéries à Gram négatif et à Gram-positif.

Ce phénomène d'induction de mutants a conduit à la définition de concentrations critiques supplémentaires : la **concentration minimale de sélection (CMS ou MSC)** et la **concentration préventive de l'apparition de mutants (CPM ou MPC)** (Caron and Mousa, 2010).

Il existe donc une gamme de concentration d'antibiotique qui favorise la sélection de population bactérienne résistance. Cette fenêtre de sélection (**Fig. 8**) correspond à l'exposition des bactéries à des concentrations comprises entre la CMI et la CMS (Caron and Mousa, 2010). En effet, dans toute population bactérienne des mutants vont spontanément apparaître. Si ces mutations confèrent une meilleure résistance (CMI supérieure) à la population initiale, seule une concentration d'antibiotiques à une concentration supérieure ou égale à cette CMI préviendra la sélection de la population résistance.

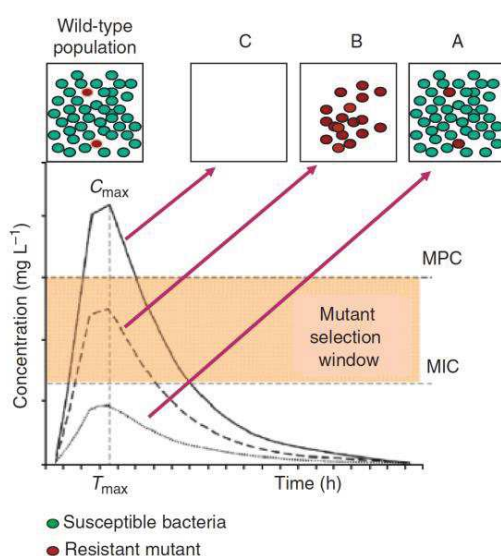


Fig. 8 : Effet de l'antibiotique en fonction de la concentration administrée ; figure de (Cantón and Morosini, 2011). Les courbes représentent la concentration en fonction du temps d'un antibiotique donné (MPC = mutation prevention concentration, MIC = minimal inhibition concentration).

(A) le pic de concentration d'antibiotique n'atteint pas la MIC, il n'y a pas de sélection des mutants au sein de la population sauvage, mais la concentration sub-inhibitrice peut favoriser ces mutations ;

(B) pendant un temps T, la courbe de concentration se situe dans la fenêtre de sélection permettant la sélection de la sous-population résistante ;

(C) le pic de la courbe dépasse la MPC empêchant la sélection de sous-populations mutants résistantes.

Ainsi, en contexte clinique, la relation entre l'apparition de la résistance et l'administration d'antibiotiques dépend de plusieurs facteurs : la souche bactérienne, les mécanismes de résistance et concentration des antibiotiques dans le corps humain qui est variable dans les différents compartiments. Les stratégies thérapeutiques doivent donc montrer une efficacité clinique mais aussi veiller à minimiser l'émergence de résistance (Rice, 2012). L'ensemble de ces concentrations critiques sont établies et considérées pour une souche bactérienne pure, en général clinique, isolée de sa communauté. Peu d'études explorent l'effet des antibiotiques sur les communautés microbiennes, en particulier environnementales.

La résistance phénotypique peut être définie qualitativement comme la survie et/ou la multiplication d'une bactérie en présence d'un agent antimicrobien comme un ATB ou un biocide. En pratique clinique, les souches bactériennes doivent être plus précisément catégorisées en appliquant un seuil de concentration critique à partir duquel l'utilisation d'un antibiotique aux doses admises chez l'homme aura une efficacité thérapeutique. Ainsi, les souches seront catégorisées sensible, intermédiaire ou résistante (S/I/R) à un antibiotique donné. Cette **catégorisation clinique** repose sur les CMI déterminées pour des populations d'une l'espèce bactérienne donnée et sur les concentrations tissulaires et humorales pouvant être atteintes chez les patients sans toxicité, sur la confrontation des résultats *in vivo* et *in vitro* et sur la variabilité statistique des méthodes. Ces données permettent de déterminer des concentrations minimales (c) et maximales (C) critiques (**clinical breakpoints**). Comparer la CMI d'une souche avec ces concentrations permet de catégoriser la souche et de prédire l'efficacité du traitement :

- $CMI \leq c$: la souche est dite sensible, la probabilité de succès avec cet antibiotique est forte
- $CMI > C$: la souche est dit résistante, la probabilité d'échec thérapeutique est forte
- $c < CMI < C$: la souche est catégorisée intermédiaire, le succès ou l'échec thérapeutique sont imprévisibles

A côté de cette catégorisation clinique, ***l'epidemiological cut-off value (ECOFF) ou ECV*** est un paramètre qui permet de séparer, pour chaque couple antibiotique / espèce bactérienne, les bactéries sauvage (wild type) de celles « non sauvages » ayant acquis au moins un mécanismes de résistance (Kronvall et al., 2011). Ce paramètre correspond à la CMI qui sépare les souches sauvages d'une espèce des souches « non sauvages ». Il est à noter que certaines espèces sont naturellement résistantes, c'est à dire que les souches sauvages possèdent déjà des mécanismes de résistance. Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante à l'ampicilline mais naturellement sensible aux carbapénèmes. Les souches sauvages sont donc résistantes à l'ampicilline mais la résistance aux carbapénèmes ne concerne que quelques souches dites « non sauvages ».

La résistance clinique va être prédite par la concentration critique (clinical breakpoint) prenant en compte les paramètres pharmacodynamiques quand l'ECOFF ou ECV permettra de différencier les phénotypes sauvages des phénotypes résistants et sera utilisé dans un but de surveillance épidémiologique. Dans certains cas, ces 2 valeurs sont les mêmes, dans d'autres, elles seront différentes, les souches présentant une CMI supérieure au ECOFF mais catégorisée comme sensible pourra être considérée de sensibilité diminuée (Sillely, 2012).

2. Méthodes d'étude de l'antibiorésistance dans l'environnement

Alors que les méthodes d'évaluation de la sensibilité aux ATB de souches cliniques sont standardisées dans les laboratoires de bactériologie médicale (par exemple par le respect des recommandations de l'EUCAST, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, <http://www.eucast.org>) et reposent sur l'isolement et donc l'étude de souches pures, il est important de pouvoir caractériser la résistance à l'échelle des communautés bactériennes dans l'environnement. Les principales approches de l'antibiorésistance environnementale sont basées sur la culture et/ou sur des techniques de biologie moléculaire. Ces approches sont ni contradictoires, ni exclusives, mais fournissent bien souvent des informations complémentaires. Les techniques les plus fréquemment utilisées et présentant un intérêt particulier dans le cadre de cette thèse sont présentées dans ce chapitre.

2.1. Détection de l'antibiorésistance dans l'environnement

2.1.1 Détection de bactéries résistantes aux antibiotiques (ARBs) par culture

Ces méthodes d'étude reposent sur la mise en culture de l'échantillon et l'isolement de colonies considérées généralement comme des souches pures ou des clones. Les ARBs (antibiotic resistant bacteria) vont être cultivées sélectivement par ajouts des ATBs d'intérêt dans le milieu d'isolement. Ce milieu peut-être généraliste (Luria-broth, Mueller Hinton, Trypticase soja, etc.) pour travailler sur la flore totale cultivable ou spécifique d'un sous-groupe bactérien donné, par exemple MacConkey ou Drigalski pour détecter les enterobactéries. L'(les)ATB(s) est (sont) ajouté(s) à une concentration permettant de sélectionner les souches présentant une résistance (Riber et al., 2014; Salloto et al., 2012) ou une co-résistance en utilisant par exemple des milieux contenant des ATBs et des métaux lourds (Becerra-Castro et al., 2015). L'étude de l'antibiorésistance environnementale peut reposer sur l'utilisation de milieux habituellement utilisés en biologie clinique pour la détection directe d'un phénotype de résistance au sein d'un échantillon humain. Par exemple, les milieux ChromID BLSE®, CarbaSMART® et ChromID VRE®, (Biomérieux) permettent la détection directe des bactéries à Gram négatif productrices de BLSE, de carbapénémases et les entérocoques résistants à la vancomycine, respectivement. Une fois les souches isolées, elles peuvent être totalement caractérisées du point de vue taxonomique et fonctionnel incluant les mécanismes de leur résistance.

Si on s'intéresse aux bactéries pathogènes de l'homme, ces techniques donnent de bonnes indications sur le risque sanitaire lié à l'environnement. En effet, les pathogènes humains étant supposés « généralement cultivables », les méthodes basées sur la culture permettent par exemple de suivre la persistance de bactéries résistantes et/ou pathogènes dans des milieux naturels ou impactées par les activités anthropiques, comme dans les sols fertilisés par des résidus de stations d'épuration (Bondarczuk et al., 2016). Toutefois des approches de détection génétique peuvent donner des résultats plus fiables car elles évitent le biais de la cultivabilité des bactéries viables mais non cultivables.

2.1.2 Détection des gènes de résistance (ARGs) aux ATBs par approches moléculaires

Plusieurs approches moléculaires pour la détection et la caractérisation des ARGs sont basées sur la méthode d'amplification génique par réaction polymérisation en chaîne, *polymerase chain reaction* (PCR). La PCR ou des approches dérivées de la PCR sont largement utilisées pour la détection de gènes de résistance ou de gènes liés à la résistance dans les communautés microbiennes environnementales (Zhang et al., 2009). La PCR permet aussi la détection des mécanismes génétiques impliqués dans la dissémination de ces gènes de résistance par la détection d'éléments génétiques mobiles (MGEs) comme les transposons, les intégrons mobiles ou leurs cassettes et les plasmides (Henriques et al., 2006; Laroche et al., 2009). Par exemple, 63 types d'intégrons de classe I portant 43 ARGs différents ont été détectés par PCR dans les communautés bactériennes de deux rivières urbaines de Taipei (Yang et al., 2014). Selon le support génétique de la résistance, la matrice ADN servant à l'amplification par PCR peut être de l'ADN génomique total mais aussi spécifiquement de l'ADN plasmidique. L'approche plasmidique permet d'explorer les ARGs potentiellement transmissible par transfert génétique horizontal (HGT) et donc de recueillir des informations sur les réservoirs environnementaux des gènes de résistance et leur dynamique (Ash et al., 2002).

La variante de la PCR la plus utilisée pour la détection environnementale est la PCR quantitative en temps réel (qPCR) qui est non seulement plus sensible que la PCR classique mais qui permet de quantifier le nombre copies d'ADN cible présentes dans l'échantillon analysé. L'analyse quantitative des gènes de résistance dans l'environnement aquatique permet en particulier d'étudier l'impact de certains facteurs environnementaux ou procédés de traitement sur la dynamique des gènes de résistance (Ahammad et al., 2014; Mackie et al., 2006; Ouyang et al., 2015; Wright et al., 2008). A titre d'exemple, la qPCR a montré des concentrations variables de gènes de résistance à la doxycycline (*tetB*) en eau douce en fonction du niveau d'anthropisation. La concentration de *tetB* était corrélée à celle d'autres gènes de résistance, à celle de l'oxygène dissous, à la température et à

la concentration de doxycycline dans l'eau (Harnisz et al., 2015). Ainsi, le nombre de copies du gène *tetB* peut être utilisé comme un indicateur de la qualité de l'eau. Autre exemple, le nombre de copies du gène *bla_{NDM-1}* codant pour une carbapénémase augmente lors des pèlerinages de masse dans le fleuve Ganges (Ahammad et al., 2014). La qPCR peut également être mise en œuvre pour rechercher et quantifier les MGEs. Cette approche permet de quantifier les MGEs sans culture préalable évaluant ainsi la capacité de transfert horizontal de gènes de résistance (Ouyang et al., 2015).

Les techniques d'hybridation de l'ADN ont été modifiées pour permettre l'identification de gènes spécifiques (par exemple gènes de résistances) à partir d'échantillons divers. Les puces à ADN sont les principaux outils actuels basés sur l'hybridation. Certaines puces ont été conçues pour du génotypage au sein de communautés (PhyloChip), permettant l'étude de la biodiversité de la communauté étudiée (Wu et al., 2010). Cependant, l'utilisation des puces à ADN pour l'étude d'échantillons environnementaux est souvent limitée en raison de sa faible sensibilité (Gilbride et al., 2006) et en raison de la complexité des échantillons environnementaux (voir chapitre « Etude de l'antibiorésistance sur isolats bactériens »).

2.2. Etude de l'antibiorésistance sur isolats bactériens

2.2.1 Détermination de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques par détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La mesure de la CMI est la méthode la plus fiable pour déterminer ou confirmer la sensibilité des micro-organismes aux agents antimicrobiens. La CMI est habituellement déterminée sur des gammes de dilutions de facteurs 2 de l'antibiotique testé en milieu gélosé (méthode de référence) ou liquide. Un inoculum bactérien de densité standardisée issu d'une culture pure est inoculé aux milieux additionnés de différentes concentrations de l'ATB. Après 18 à 48h d'incubation, selon la vitesse de croissance de la bactérie étudiée, la CMI est déterminée comme étant la plus faible concentration d'ATB incorporé dans le milieu pour lequel aucune croissance n'est observée.

Les CMI₅₀ et CMI₉₀ correspondent aux concentrations d'un ATB qui inhibent respectivement la croissance de 50% et 90% d'une population de souches d'une espèce donnée. Ces valeurs sont fréquemment utilisées pour évaluer la sensibilité aux ATBs d'une espèce bactérienne et permet la détermination du spectre d'activité d'un ATB. Ainsi, par exemple, si plus de 90% des souches testées pour une espèce donnée sont sensibles, alors l'espèce est qualifiée de « habituellement sensible ». Autre exemple, l'espèce sera dite « habituellement résistante » si au moins 50% des souches sont résistantes.

Dans les études environnementales, la détermination de la CMI est largement appliquée pour caractériser les niveaux de résistance d'isolats environnementaux, par exemple pour des souches isolées d'environnements hydriques : *Pseudomonas aeruginosa* (Pirnay et al., 2005), *Enterococcus* sp. (Nam et al., 2013). Les CMI peuvent être réalisées sur différents membres d'une communauté microbienne pour avoir une image de la résistance dans la communauté (Voolaid et al., 2012), mais l'isolement préalable des souches et leur étude individuelle reste une approche réductrice de la résistance dans une communauté complexe. Nous proposerons dans la partie expérimentale de cette thèse un essai d'application de la CMI à une communauté cultivable totale sans isolement préalable des souches formant la communauté (chapitre. B, partie 1.).

2.2.2 Détermination de la sensibilité bactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé

La méthode de diffusion en milieu gélosé, dite antibiogramme, permet une approche simplifiée de la CMI par l'observation d'une zone d'inhibition de pousse autour d'un disque imprégné d'une quantité donnée d'antibiotique. La corrélation entre le diamètre de la zone d'inhibition et les concentrations critiques déterminées pour cet antibiotique permet de catégoriser les isolats bactériens testés. Les bactéries testées sont alors classées comme sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à l'ATB testé. Par rapport à la détermination de la CMI, la méthode de diffusion en milieu gélosé est une méthode indirecte et peut aboutir à des erreurs de catégorisation. La détermination de la CMI reste la méthode de référence. Cependant, la méthode de l'antibiogramme qui date des années 1940s est constamment améliorée, en particulier par une meilleure standardisation technique, par la détermination de concentrations critiques (breakpoints) espèce spécifiques et par la prise en compte de l'*epidemiological cut-off value* (ECOFF). Cette méthode, méthode de routine en microbiologie clinique, est largement utilisée pour caractériser les résistances d'isolats environnementaux. Par exemple, la prévalence de bactéries fécales (*E. coli* et des entérocoques) résistantes aux antibiotiques dans les rivières du bassin versant de la Seine a été déterminée à l'aide d'antibiogrammes (Servais and Passerat, 2009). Là encore, cette technique n'est réalisable qu'après isolement préalable des souches d'intérêt.

2.2.3 Etude des gènes de résistance sur souches isolées

L'étude des gènes sur souche isolée peut se faire sur ADN génomique total ou sur ADN plasmidique après extraction différentielle. L'expression des gènes peut aussi être évaluée sur les ARN totaux. Comme pour la détection des ARGs directement dans l'environnement (chap. 2.1.2), la PCR (ou la RT-PCR (reverse transcription-PCR pour l'expression) est la méthode de base pour

amplifier et étudier les ARGs dans une souche bactérienne isolée. Les bases de données, très riches sur les gènes de résistance, permettent de définir des couples d'amorce afin d'amplifier tous les gènes connus.

La PCR multiplex est une variante de la PCR classique. Elle implique l'amplification simultanée de plusieurs séquences grâce à plusieurs couples d'amorces dans le même mélange réactionnel. Malgré la possibilité de formation de dimères d'amorce qui peut compromettre l'efficacité de l'amplification, la PCR multiplex est très pratique pour la détection rapide et simultanée de plusieurs gènes impliqués dans la multirésistance ou dans des mécanismes complexe de résistance (Gilbride et al., 2006). Par exemple, dans une étude concernant des circuits d'eau en Corée, des entérocoques résistants à la vancomycine ont été détectés dans 12,9% des échantillons en recherchant simultanément par PCR multiplex les trois gènes impliqués en cascade dans cette résistance *vanA*, *vanB*, *vanC-1* et *vanC-2/3* (Nam et al., 2013).

Toujours basé sur une étape préalable d'amplification génique de type PCR, l'utilisation de puces à ADN (microarray), basé sur le principe d'hybridation, permet l'exploration de l'antibiorésistance à partir d'isolats bactériens en recherchant simultanément plusieurs ARGs. De par sa faible sensibilité, cette approche est plus adaptée aux bactéries en culture qu'à l'analyse directe d'un échantillon sans culture préalable. Dans cette technique, l'ADN est amplifié par PCR puis les amplicons marqués par fluorescence sont hybridés à des sondes moléculaires attachés sur un support, les puces à ADN (Fig. 9). Les signaux positifs (spots) sont excités par laser et visualisé par scanner de fluorescence et/ou système de microscopie confocale. L'intensité du signal sur la puce est directement proportionnelle à l'abondance de l'amplicon cible, ce qui donne une évaluation semi-quantitative.

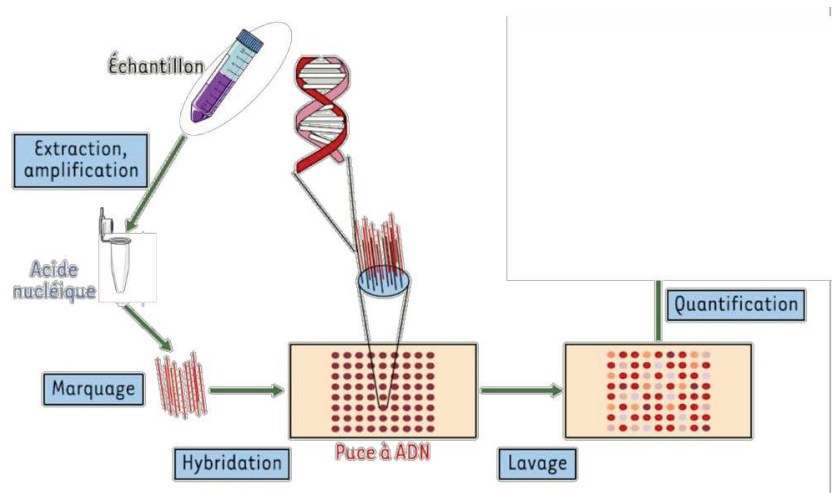


Fig. 9 : principe général d'analyse d'ADN par puces à ADN (modifié d'après (Glaser, 2005)

Il existe de très nombreux systèmes de puces développés en contexte clinique afin de caractériser le génotype de résistance et de virulence de bactéries pathogènes (Bogaerts et al., 2016; Deshmukh et al., 2016; Gilbride et al., 2006; Sibley et al., 2012; Wilson et al., 2002). Certains systèmes ont été adaptés pour le screening de nombreux ARGs à partir d'isolats environnementaux (Call et al., 2003). La forte prévalence de gènes de virulence et de résistance dans des isolats de pathogène *E. coli* provenant de différents écosystèmes aquatiques dont des eaux usées municipales a ainsi été démontrée (Hamelin et al., 2007). Un avantage de cette technique de screening sur des isolats environnementaux est la capacité de détecter des combinaisons de gènes nouvelles ou inhabituelles (Hamelin et al., 2006). Les puces peuvent aussi explorer l'expression des gènes de résistance ou la variation d'expression de gènes après exposition à un ATB si l'étape d'amplification cible les ARNm (RT-PCR) (Tattevin et al., 2009). Par contre, les puces permettent uniquement l'identification de génotypes connus.

2.2.4 Avantages et limites des méthodes basées sur l'étude d'isolats bactériens

L'intérêt majeur des analyses réalisées sur isolats est de pouvoir identifier les espèces bactériennes porteuses du phénotype résistant et réaliser des études fonctionnelles complètes. De plus, l'application de techniques de biologie moléculaire sur isolats bactériens permet de distinguer les résistances intrinsèques des résistances acquises en investiguant sur le support génétique de la résistance.

En revanche, ces méthodes ne permettent de mettre en évidence que ce qui est recherché et donc ce qui est connu. De plus, des résultats faussement positifs peuvent être dus à la détection de gènes silencieux ou de gènes soumis à une régulation affectant l'expression phénotypique de la résistance (Sundsford et al., 2004). Par ailleurs, seules les bactéries cultivables peuvent être explorées or elles constituent une petite proportion (estimée entre 0,1 et 10 %) des communautés microbiennes environnementales (Rizzo et al., 2013). De plus, les bactéries non cultivables peuvent être impliquées dans l'émergence et la dissémination de gènes de résistances et de nombreuses espèces habituellement cultivables comme certains pathogènes humains peuvent être sous forme viable non cultivable dans l'environnement (Halpern et al., 2007). Enfin, l'étude d'une souche isolée provenant d'une communauté complexe va donner une vision extrêmement réductrice de cette communauté surtout si on considère la résistance comme un phénomène d'interaction biologique complexe impliqué dans les grands équilibres écologiques. Des approches plus globales respectant la complexité du phénomène de résistance apporteront des informations essentielles.

2.3 Les approches « omiques » de l'antibiorésistance à l'échelle des communautés bactériennes

Le développement des techniques génétiques avec en particulier le séquençage à haut débit a conduit à l'explosion des approches métagénomiques pour les études de communautés microbiennes (Simon and Daniel, 2011). Ces méthodes indépendantes de la culture contournent le biais de la cultivabilité et permettent une vision globale d'un phénomène biologique complexe comme l'antibiorésistance. Toutefois, la résistance aux ATBs a une définition phénotypique qui impose l'analyse du comportement des bactéries exposées aux ATBs. Ainsi, l'exploration des communautés résistantes associe des approches culture-dépendantes et culture-indépendantes.

2.3.1 Approches taxonomiques des communautés résistantes

La description de la biodiversité taxonomique des communautés est souvent préalable ou concomitante à leur caractérisation en termes de résistance. Pour cela, des méthodes fiables d'identification bactérienne sont nécessaires.

Méthodes d'identification des espèces bactériennes

Après plus d'un siècle d'identification pasteurienne basée sur la diversité des caractères métaboliques des bactéries, la fin du XXe siècle a vu l'émergence de l'identification phylogénétique basée principalement sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S (Olsen et al., 1994). L'ARNr 16S est un élément essentiel conservé chez les bactéries puisque c'est un élément structural majeur de la sous-unité 30S des ribosomes. Ce gène présente des régions conservées quasi universelles dans le domaine bactérien, alternant avec des régions variables spécifiques de genres et/ou d'espèces (**Fig. 10**). Ainsi, l'amplification par PCR entre deux régions conservées grâce à des amorces universelles suivie de l'analyse par séquençage de régions variables amplifiées permet une identification phylotaxonomique après comparaison aux bases de données. Une espèce non décrite ne pourra bien sûr pas être identifiée mais sera placée dans l'arbre phylogénétique à proximité de ses plus proches voisins dans l'évolution au sein d'un genre, d'une famille ou d'un autre niveau taxonomique. Ce mode d'identification est donc basé sur une classification naturelle des espèces bactériennes qui suit les parentés évolutives.

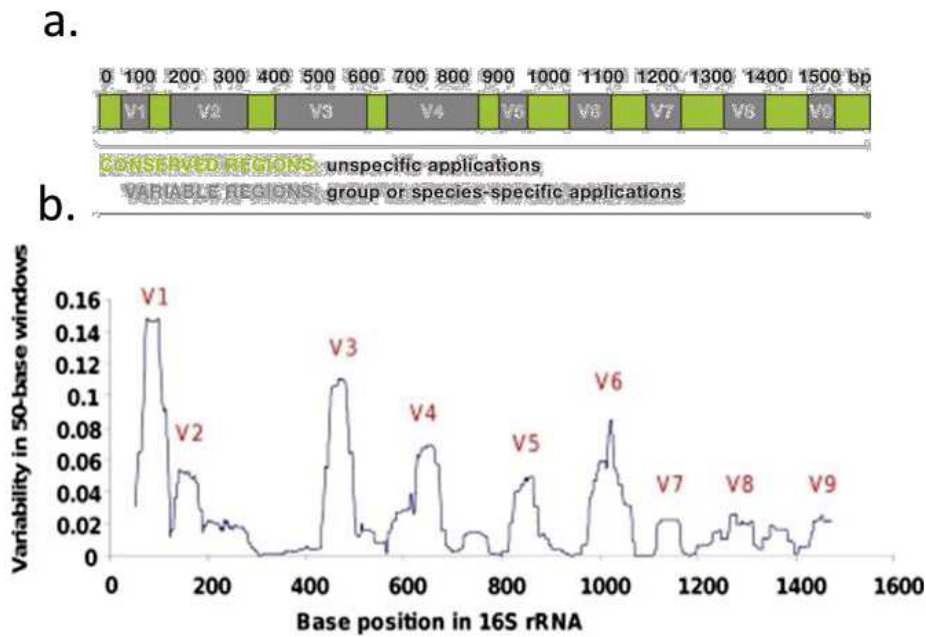


Fig. 10 : Structure du gène de l'ARNr 16S

(a) Représentation schématique du gène codant l'ARNr 16S, en vert les régions conservées permettant la définition d'amorces universelles et en gris les régions variables spécifiques de groupes ou d'espèces.

(b) Représentation de la variabilité (calculé de la façon suivante : 1 moins la fréquence du nucléotide (nt) le plus fréquent, lissée sur 50 nt) des 9 régions variables dans le gène codant l'ARNr16S chez *Pseudomonas* sp. (étude menée sur 79 souches) ; d'après (Bodilis et al., 2012).

Le début du XXIe siècle a vu l'avènement des méthodes protéomiques avec l'identification bactérienne par MALDI-TOF (Popović et al., 2017; Singhal et al., 2015). Il s'agit aujourd'hui de la méthode de routine qui a remplacé très rapidement toutes les autres approches pour l'identification de première intention en microbiologie médicale. Ce n'est pas une méthode phylotaxonomique puisqu'elle compare un spectre protéique à une banque de spectres. Une espèce inconnue ne pourra pas être affiliée à un genre ou une famille sur la base de son spectre protéique. La technique MALDI-TOF MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* est une technique d'ionisation qui utilise une matrice absorbant l'énergie laser pour créer des ions à partir de grandes molécules telles que l'ADN, les protéines, les peptides et les sucres (Hillenkamp et al., 1991). C'est une méthode rapide, précise et rentable de caractérisation et d'identification des microorganismes. Cette technologie génère des empreintes spectrales de masse caractéristiques, qui sont des signatures uniques pour chaque microorganisme et sont donc idéales pour une identification microbienne précise au niveau des genres et des espèces. Les principes fondamentaux de la technique MALDI-TOF MS sont présentés en figure 11. Ils comprennent les étapes suivantes :

- I) L'échantillon bactérien est mélangé avec une matrice sur une plaque métallique conductrice.
- II) Après cristallisation de la matrice et de l'échantillon, la plaque métallique est introduite dans le spectromètre de masse et est bombardée avec de brèves impulsions de laser.

III) La matrice absorbe l'énergie du laser conduisant à la vaporisation et à l'ionisation des analytes en phase gazeuse.

IV) La molécule ionisée est accélérée et éjectée à travers un tube de vol en métal pour atteindre un détecteur.

V) Selon leur masse et leur charge, les bioanalytes qui composent un échantillon complexe sont séparés selon leur TOF (temps de vol) et créent un spectre de masse.

VI) Le spectre obtenu est comparé avec la base de données des spectres.(Croxatto et al., 2012).

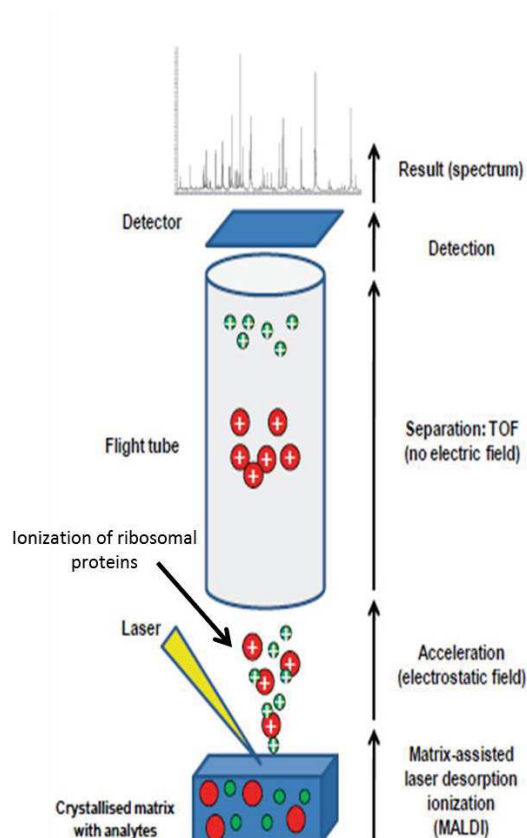


Fig.11: Schématisation de la technique d'identification bactérienne par MALDI-TOF (Croxatto et al., 2012)

Culturomique

Une des stratégies permettant l'exploration de l'antibiorésistance est l'utilisation de milieux de culture supplémentés avec un ou plusieurs antibiotiques, ce qui permet la sélection de la sous-communauté résistante cultivable. Pour une approche globale évitant au maximum les biais de cultivabilité plusieurs milieux peuvent être utilisés pour une même communauté. L'identification des membres de la communauté cultivée se fera colonie par colonie en général par MALDI-TOF ou par « metabarcoding » ciblé sur le gène de l'ARNs 16S (voir ci-dessous). Cette approche, appelée culturomique (Lagier et al., 2012), a donné d'excellents résultats sur le microbiote digestif humain. Le

répertoire d'espèces détectées surpassait celui décrit par métagénomique et séquençage de dernière génération (Dubourg et al., 2013). Cette approche a conduit à la description de plus de 150 nouvelles espèces dans le tube digestif humain. De ce point de vue, l'ensemble des approches métagénomiques du microbiote digestif n'a pas été aussi contributif que cette seule étude culturomique. L'analyse du microbiote digestif humain a demandé l'utilisation de 212 conditions de culture différentes (Lagier et al., 2012). On voit donc combien ces approches peuvent être laborieuses et chronophages. De plus, malgré des essais de modification des milieux de culture pour imiter l'environnement naturel, par exemple en termes de concentrations de nutriments, de gradient d'oxygène et/ou d'ajustement de pH, la proportion de bactéries cultivées au sein d'une communauté reste limitée (Bondarczuk et al., 2016).

On peut toutefois considérer que la culturomique peut répondre à la problématique des communautés antibiorésistantes par l'utilisation d'un large panel de milieux contenant divers antibiotiques à diverses concentrations plus ou moins associés à d'autres éléments présents dans l'écosystème étudié. Une telle approche est proposée dans la partie expérimentale de cette thèse (chapitre B, partie 1.).

Métataxogénétique ou métataxogénomique ciblée des communautés cultivables

L'ADN total extrait d'une communauté résistante cultivable obtenu, par exemple, par culturomique est alors étudié pour explorer la diversité d'espèces dans la communauté. Ces approches sont qualifiées de métataxogénomiques mais comme l'approche est ciblée sur un seul gène, en général l'ARNr 16S, les termes métataxogénétique ou métataxogénomique ciblée sont plus adaptés. On parle aussi de « metabarcoding » des communautés bactériennes, c'est-à-dire l'identification de marqueurs polymorphiques permettant d'établir la « carte d'identité de la communauté ».

A partir de l'ADN de la communauté bactérienne, les amplicons du gène ARNr 16S obtenus doivent être séparés selon leur polymorphisme de séquence car ils sont tous de même taille. L'électrophorèse en gradient dénaturant permet cette séparation car la dénaturation en fonction du gradient d'un double brin d'ADN en simple brin, dépend de la séquence nucléotidique de cet ADN. Avec une électrophorèse sur gel en gradient chimique dénaturant (*denaturing gradient gel electrophoresis* DGGE), les amplicons du gène ARNr 16S migrent dans un gel avec gradient d'agents dénaturants, mélange d'urée et de formamide (Muyzer et al., 1993). Le même principe est appliqué pour la TTGE, *temporal temperature gradient gel electrophoresis* mais il s'agit d'une dénaturation de l'ADN par application d'un gradient de température plutôt qu'une dénaturation chimique. Lors de ces migrations, les amplicons initialement doubles brins commencent leur migration jusqu'à ce qu'ils

rencontrent des conditions dénaturantes altérant leur mobilité électrophorétique. Il en résulte un arrêt de migration différentiel selon la séquence des amplicons. La distance de migration est finalement strictement dépendante de la séquence. Les bandes obtenues peuvent alors être séquencées pour déterminer la composition des communautés microbiennes (**Fig. 12**) ou par exemple, suivre l'évolution de la diversité au fil du temps (Simpson et al., 1999).

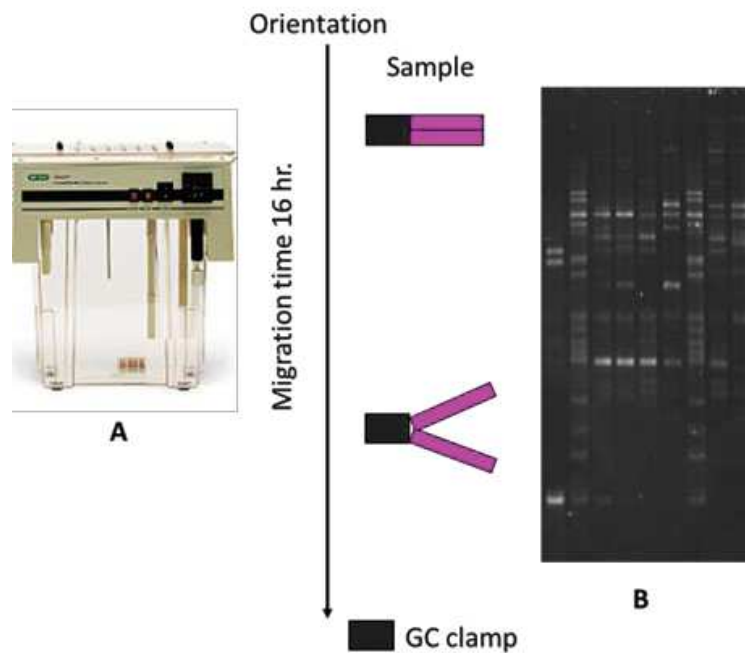


Fig.12 : méthode d'analyse par TTGE

A- Exemple d'appareillage

B- Exemple de profil électrophorétique obtenu après TTGE pour évaluer la diversité de la communauté bactérienne totale et résistante au niveau de l'espèce. Dans un champ électrique, l'ADN se déplace à travers un gel sous gradient de température dans la chambre d'électrophorèse. La température à laquelle la séparation des brins d'ADN se produit dépend de la séquence, c'est-à-dire que les régions riches en AT ont tendance à se dénaturer à une température inférieure (dans la zone supérieure du gel) tandis que les régions riches en GC se dénaturant à haute température seront immobilisées dans la partie inférieure dans le gel.

La méthode de T-RFLP (non détaillée ici) permet aussi cette séparation ainsi que le séquençage shotgun de l'ensemble des amplicons (voir plus loin).

Toutefois, les principales limites de ces approches sont connues :

- i) Le niveau taxonomique d'identification peut être faible en raison de la taille limitée des séquences analysées (<500 bp).
- ii) Des fragments d'ADN différents peuvent avoir les mêmes points de fusion et donc les mêmes distances de migration.

- iii) Certaines bactéries présentent une hétérogénéité de séquence ARNr 16S liée à la présence de plusieurs copies différentes dans leur génome, ce qui conduit à plusieurs bandes de migration pour une seule et même espèce.
- iv) Un nombre élevé d'espèces différentes donnera de nombreuses bandes mal séparées sur le gel de migration et ainsi difficiles à découper et séquencer.

Finalement, les empreintes de communauté sont réservées aux communautés de faible diversité, ce qui peut être le cas des communautés résistantes aux ATBs.

Pour des communautés plus complexes, l'ensemble des amplicons peuvent subir un séquençage « shotgun » par NGS (next generation sequencing) dont le principe simplifié est présenté en **figure 13**. La métagénomique ciblée du gène ARNr 16S par pyroséquençage (454 technology) et de séquençage à haut rendement ou « high-throughput sequencing » (Illumina) a révélé la diversité des bactéries résistantes à la tétracycline après culture en « batch » de boues activées : *Sulfuritalea*, *Armatimonas*, *Prostheco bacter*, *Hyphomicrobium*, *Azonexus*, *Longilinea*, *Paracoccus*, *Nvosphingobium* et *Rhodobacter*. De plus, cette étude montre que la présence de tétracycline à faible dose (5mg/L) a un effet sur la composition de la communauté bactérienne, en particulier sur l'abondance et la diversité de gènes de résistance (Huang et al., 2014).

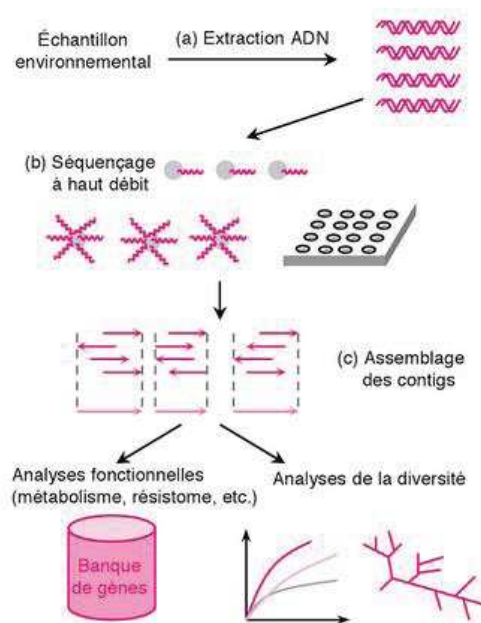


Fig. 13 : Analyses métagénomiques par NGS (new generation sequencing) ; figure de (Ona-Nguema et al., 2015)

Métataxogénétique ou métataxogénomique ciblée indépendante de la culture

Les techniques NGS ont l'avantage de permettre l'identification des organismes non cultivables, et faiblement cultivables ou cultivables dans des conditions très particulières. Elles sont donc appliquées avec succès lors d'études indépendantes de la culture. La sensibilité du NGS dépend de la redondance de l'analyse. Selon les études et le niveau de redondance cette sensibilité est très variable. Les approches indépendantes de la culture demanderont plus de redondance afin de détecter les populations minoritaires que les approches post-culturelles. A titre d'exemple parmi de nombreuses études, cette approche a permis d'étudier la diversité bactérienne dans un continuum rivière-estuaire (Meziti et al., 2016). Dans la même étude, les auteurs ont dépassé la simple description de la diversité en complétant l'étude par de la métagénomique globale (voir chapitre 2.3.2).

2.3.2 Approche métagénomique globale des communautés et de l'antibiorésistance

Contrairement à la métagénomique ciblée à visée de « barcoding » taxonomique, la métagénomique globale permet le séquençage de tous les gènes présents dans une communauté sans a priori sur les gènes recherchés. Elle permet aussi un accès aux gènes eucaryotes et viraux. La métagénomique globale est aussi appelée génomique environnementale, génomique communautaire ou ecogénomique microbienne (Joly et al., 2015). La composition des communautés microbiennes a été étudiée par métagénomique dans différents environnements tels que des environnements marins (DeLong et al., 2006), des communautés bactériennes du sol (Riaz et al., 2008), les sédiments (Abulencia et al., 2006), ou des communautés bactériennes d'eau douce (Cottrell et al., 2005; Debros et al., 2009; Meziti et al., 2016). Ces approches sont souvent complémentaires de la métagénomique ciblée qui fournit uniquement le répertoire des espèces présentes. Elles apportent des informations fonctionnelles par l'analyse *in silico* de tous les gènes de la communauté. Dans le contexte de l'analyse des eaux naturelles, la métagénomique globale apporte aussi des informations sur les sources de contamination (Meziti et al., 2016) et sur la résistance dans la communauté.

Ainsi, ces techniques ont beaucoup amélioré la détection de la résistance dans l'environnement par la capacité à détecter de très larges gammes de déterminants de résistance. Toutefois, la métagénomique ne permet pas de relier ces gènes à l'organisme porteur ni de prédire leur réelle implication dans un potentiel phénotype de résistance. En revanche, la reconstruction des génomes de micro-organismes résistants de la communauté permet de déterminer l'environnement génétique de ces résistances et ainsi déterminer les modes de transmission de ces gènes, par exemple *via* des éléments génétiques mobiles.

Par ailleurs, la source de contamination par des gènes de résistance peut être déterminée par métagénomique. Par exemple, cette technologie a permis de déterminer le résistome, c'est à dire la diversité et l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques et des éléments génétiques mobiles (plasmides mobilisables, intégrons de classes I et II et transposons) dans divers environnements. Par exemple, les effluents des fermes laitières et d'usines de traitement des eaux usées ont été comparés à la source et au fleuve récepteur de ces effluents (Rowe et al., 2016). Les auteurs ont montré que les effluents contribuent à un enrichissement des communautés bactériennes en gènes de résistance, notamment *tetC* et *tetW*, gènes de résistance aux tétracyclines et *sul2*, gène de résistance aux sulfamides. Cinquante-trois gènes de résistance différents ont ainsi été mis en évidence, conférant une résistance à sept classes d'antimicrobiens. Toujours dans la problématique de l'identification de la source de la contamination, des auteurs ont utilisé une méthode de NGS pour identifier la source de la contamination fécale de l'eau par détection de marqueurs génétiques spécifiques des *E. coli* en fonction de leur hôte d'origine. Ces marqueurs ont été recherchés dans une rivière japonaise mettant en évidence une source majoritairement humaine de la contamination fécale (Gomi et al., 2014).

L'analyse directe des séquences permet d'identifier des gènes de résistance déjà connus déposés dans des banques de données généralistes ou spécialisées. Une annotation précise peut aussi permettre de relier un gène inconnu à une fonction grâce à des signatures fonctionnelles communes. Il existe des bases de données spécialisées pour la résistance aux ATBs. CARD, *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (Jia et al., 2017; McArthur et al., 2013) centralise les annotations des bases de données concernant l'antibiorésistance et permet d'évaluer la probabilité de transfert horizontal, ou si le gène est responsable d'une résistance intrinsèque ou adaptative. Une autre plateforme, RESCon (*resistance readiness condition*), affecte des catégories de risque en termes de santé publique selon le gène détecté (Martínez et al., 2015).

L'approche de métagénomique fonctionnelle peut également être développée pour explorer les fonctions présentes dans un environnement donné. Cette technique implique le clonage des ADNs métagénomiques dans des plasmides, la transformation de bactéries avec ces plasmides et recherche des phénotypes de résistance conférés. Cette approche est lourde et coûteuse mais elle permet la découverte de mécanismes de résistance inédits. Une représentation schématique de la métagénomique fonctionnelle appliquée à l'antibiorésistance est donnée en **figure 14**.

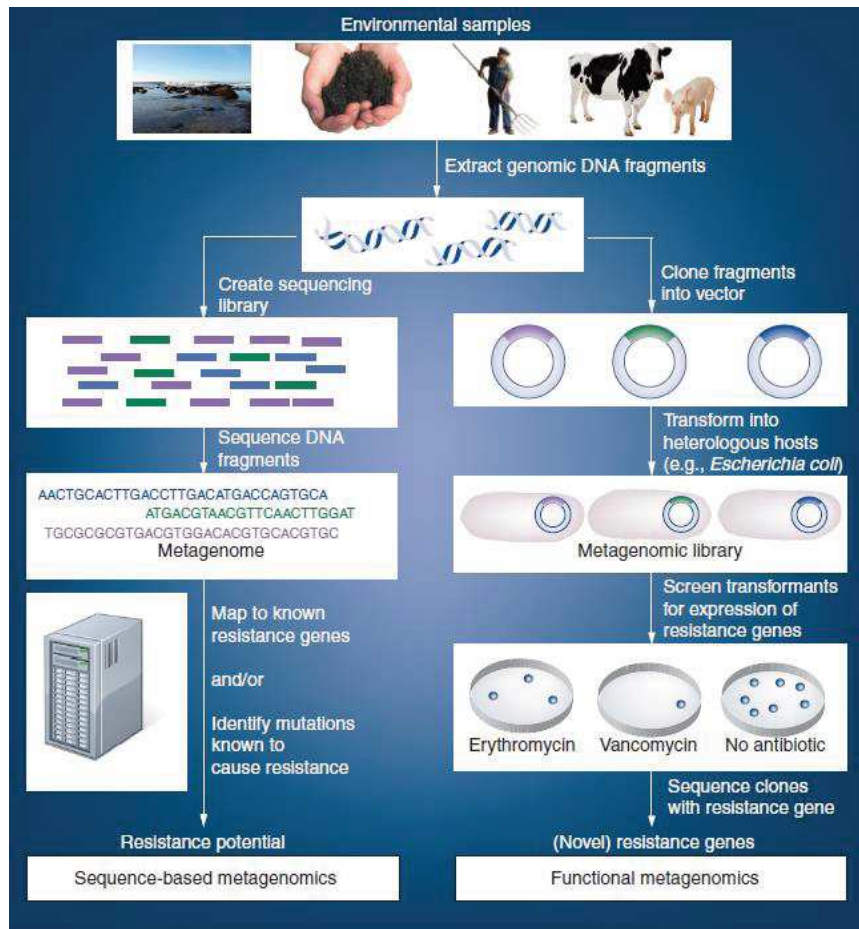


Fig. 14 : Métagénomique fonctionnelle appliquée à l'antibiorésistance ; figure de (Schmieder and Edwards, 2012)

2.3.3 Avantages et limites des approches moléculaires « omiques »

Les techniques NGS ont l'avantage de permettre l'identification des organismes non cultivables, cultivables et rares, ainsi que le séquençage global du contenu génétique d'un écosystème microbien. La cultivabilité n'est donc plus une limite. En revanche, l'étape critique est l'étape d'extraction des acides nucléiques qui, si elle est imparfaite, peut aboutir à une sous-estimation de la biodiversité et à une description biaisée des fonctions biologiques de la communauté. L'exactitude des résultats est liée à la quantité et la qualité de l'ADN obtenu qui dépend des méthodes de lyse bactérienne, d'extraction d'ADN et de purification utilisée (Lemarchand et al., 2005). En particulier, les communautés sont formées de bactéries ayant des structures pariétales très diverses, certaines comme les *Actinobacteria* étant très résistantes à la lyse.

La métagénomique est considérée comme une approche sensible mais l'accès aux sous-populations rares au sein d'une communauté demande un séquençage dit « profond », basé sur la

redondance de l'analyse. La redondance de l'analyse varie d'une étude à l'autre, ce qui rend les résultats de métagénomiques peu comparables. Il est important de connaître le seuil de détection de chaque méthode et technologie de NGS. Ainsi, une étude des performances comparées des approches métagénomiques sur les selles humaines est présentée (Fig. 15). Elle montre, qu'une approche métagénomique ne permet pas de détecter des espèces présentes à moins de 10^6 UFC par gramme de selle. L'approche culturale ciblée n'a bien sûr pas l'avantage de la globalité mais permet la détection de 100 bactéries cultivable par gramme de selle.

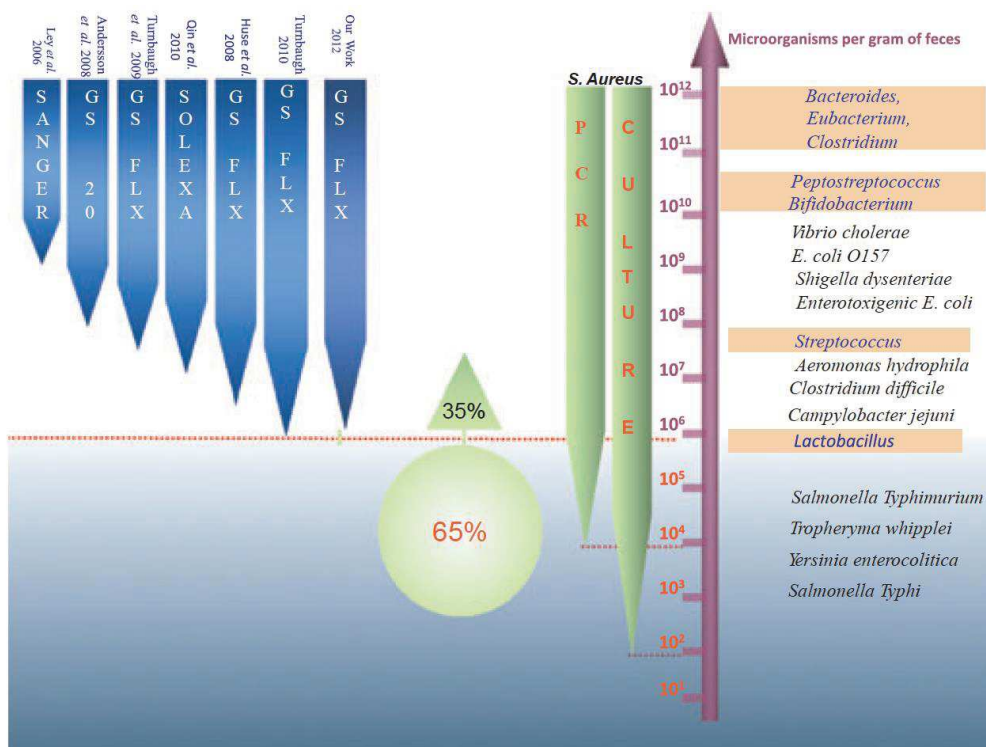


Fig. 15 : Seuils de détection des approches métagénomiques en fonction de la technologie de séquençage et comparaison aux approches par culture ciblée. Les flèches bleues montrent la profondeur de détection dans des publications de description du métagénome digestif de l'homme. La ligne pointillée rouge haute montre le seuil minimal de détection des méthodes en 2012 et les deux autres seuils montrent les performances de la détection spécifique de *Staphylococcus aureus* par PCR et par culture dans la même matrice ; figure de (Lagier et al., 2012)

2.4 Conclusions

La prévalence, la distribution et la diffusion des ARBs et des ARGs dans l'environnement hydrique méritent une évaluation précise en raison de l'augmentation du risque associé à la santé humaine. Nous avons brossé un tableau rapide des méthodes utilisées aujourd'hui. Il en ressort que toutes les approches ont leurs avantages et leurs inconvénients. Elles peuvent toutes être pertinentes pour répondre à une question précise et sont donc complémentaires dans le cadre d'études qui doivent également caractériser la niche des communautés antibiorésistantes : caractérisation physico chimique de la niche et identification des pressions anthropiques exercées. Ces aspects intégratifs seront, en particulier, développés dans la revue de littérature sur les eaux de ruissellement en milieu urbain présentée en fin de cette synthèse bibliographique (page 48).

3. Impact des conditions environnementales sur l'antibiorésistance des communautés bactériennes en milieu hydrique

3.1 Aspects généraux

Aujourd'hui, la croissance des populations humaines dans les grandes villes s'accompagne d'une demande croissante et continue en eau douce (Kutlu et al., 2013). Cette forte consommation et cette démographie s'accompagnent de la production de grands volumes d'eaux usées. Ces eaux usées peuvent être traitées via les stations d'épuration, ou déversées dans les rivières urbaines menant à leur contamination microbienne et chimique et donc à la détérioration de la qualité des eaux naturelles. Au développement des grandes villes est habituellement associé le développement industriel qui, à son tour, peut déverser ses déchets et/ou eaux usées dans les cours d'eau proches (Jurado et al., 2012). Plusieurs autres activités humaines liées à l'eau ont été identifiées comme détériorant la qualité de l'eau, comme par exemple la baignade de masse (Telang et al., 2009). La détérioration de la qualité de l'eau est donc un problème croissant principalement attribuable aux activités anthropiques, urbaines, industrielles mais aussi agricole. En effet, l'agriculture est une autre source principale de la pollution de l'eau par le drainage des champs agricoles vers les cours d'eau qui transportent des polluants chimiques (engrais et pesticides) et biologiques (amendements) (Jurado et al., 2012). De plus, les pratiques agricoles peuvent aussi altérer la qualité des eaux souterraines par le lessivage des polluants vers les eaux souterraines. Autre exemple, la déforestation a un rapport direct sur l'augmentation du phosphore total et des sédiments qui entrent dans les cours d'eau via des ruissellements de surface (Clarke et al., 2015).

La présence de xénobiotiques dans l'eau participe à la sélection et/ou à l'émergence de populations bactériennes résistantes (Guerin et al., 2009; Re and Ploy, 2012). Face à ces diverses sources de contamination, la grande capacité adaptative des bactéries conduit à l'émergence continue de souches résistantes aux xénobiotiques et parmi eux aux ATBs classiquement utilisés en médecine humaine. Cette émergence est un problème complexe dans lequel la pression de sélection exercée dans l'environnement joue un rôle central encore trop peu précisé. La **figure 16** est une illustration simplifiée des sources de xénobiotiques et de leur impact sur l'environnement.

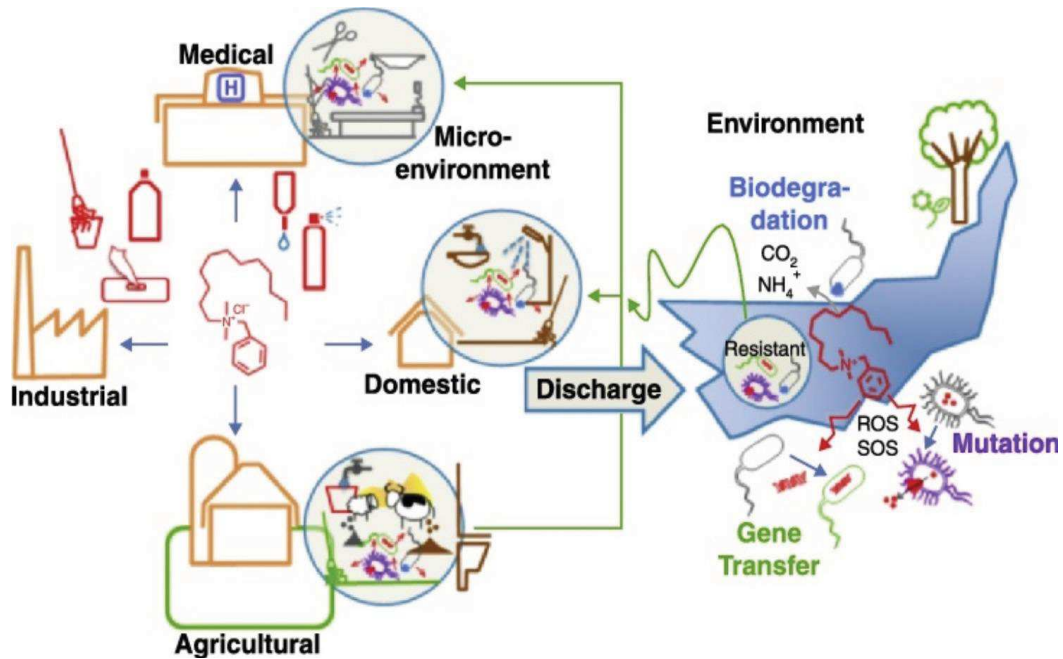


Fig. 16 : Provenance des xénobiotiques et effets de l'exposition sur les bactéries hydriques ; figure de (Tezel and Pavlostathis, 2015)

Les réarrangements génétiques dans les intégrons illustrent l'impact des pressions environnementales sur l'antibiorésistance d'une bactérie porteuse de ces MGEs (Fig. 17), ce qui souligne aussi l'adaptabilité des bactéries. Les intégrons sont aussi appelés « plateformes génétiques » et sont capables, grâce à une intégrase de mobiliser des gènes de résistance aux ATBs, aux métaux lourds, par exemples. Ces gènes sont exprimés grâce à un promoteur fort situé en amont. Il a été montré qu'en conditions de stress, il y a déclenchement du système SOS avec dérégulation de l'expression de l'intégrase ce qui promeut l'excision, l'intégration et donc les réarrangements de cassettes au sein de l'intégron et finalement, une adaptation de la bactérie aux conditions de stress (Re and Ploy, 2012).

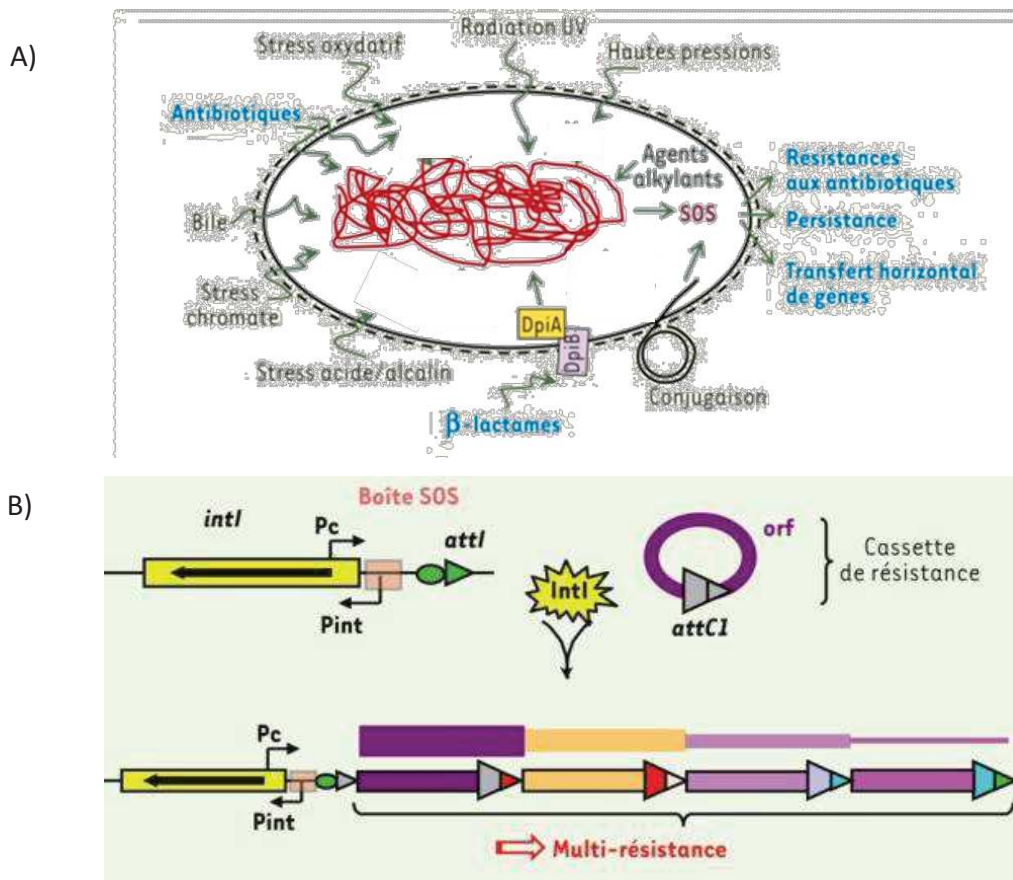


Fig. 17 : effet d'un stress antibiotique sur les réarrangements génétiques d'un intégron ; figure de (Re and Ploy, 2012)

A) des stress endogènes et exogènes peuvent induire le système SOS. La sollicitation du système SOS conduit à des dépressions de promoteurs et donc à l'expression de protéines impliquées dans l'adaptation de la bactérie. DPIA et B : système de transduction du signal

B) intégron, système permettant l'expression de gènes de résistance (cassettes). *intI* : gène codant l'intégrase ; *Pint* : promoteur de l'intégrase ; *Pc* : promoteur des cassettes de gène ; *attI* et *attC* : sites de recombinaison spécifique. La succession de cassettes aboutit à des intégrons de multirésistance. La position des gènes dépend des pressions de sélections exercées sur la bactérie : plus la cassette est proche du promoteur *Pc*, plus elle sera exprimée.

Les intégrons ne sont pas l'unique support d'évolution de l'antibiorésistance et d'adaptation des bactéries aux pressions de sélections environnementales. La résistance aux ATBs se développe par mutation, ou par HGT. Chez l'Homme, les communautés bactériennes peuvent par exemple acquérir des gènes de résistance par transfert génétique, particulièrement quand une pression de sélection est exercée (traitement antibiotique). Dans l'environnement, le réservoir de gènes de résistance est lié particulièrement aux bactéries humaines et animales qui sont rejetées dans les eaux usées mais aussi à l'effets sélectifs de polluants (Wellington et al., 2013). Ainsi, les ATB ne sont

pas les seuls polluants qui favorisent les HGT. Il a par exemple été montré que les nanoparticules favorisaient les phénomènes de conjugaison (Qiu et al., 2012) et potentiellement le transfert d'ARGs. Finalement, les activités anthropiques intenses créent des conditions favorables à l'évolution des bactéries, en particulier par transfert de gènes (**Fig. 18**) (Gillings and Stokes, 2012).

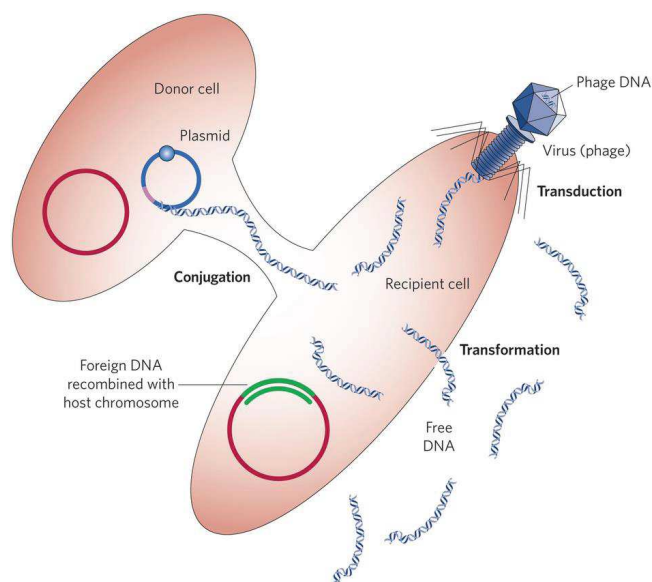


Fig 18 : Mécanismes de transfert génétique horizontal chez les bactéries ; figure de (Stewart, 2013)

Les conditions environnementales ont également une influence sur la persistance de l'antibiorésistance en particulier, dans les milieux hydriques. Bien sûr le maintien d'une pression de sélection va favoriser la persistance de souches résistantes en relation avec la nature du contaminant à l'origine de la sélection. Pourtant, il faut souligner que le gène de résistance à un antibiotique donné est souvent associé, sur le même réplicon, à d'autres gènes de résistances, résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds. Ainsi, ce co-portage a pour conséquence qu'une pression de sélection par exemple aux métaux lourds va favoriser la persistance de bactéries résistantes aux antibiotiques. On parle alors de **co-sélection**. Ainsi, des activités agricoles ou l'aquaculture génèrent des métaux tels le cadmium, le zinc, le cuivre ou le mercure qui peuvent participer à la co-sélection de gènes de résistance aux antibiotiques (Seiler and Berendonk, 2012). Pour reprendre l'exemple des intégrons, il a été montré que dans des environnements pollués par des métaux lourds, la fréquence de portage des intégrons était beaucoup plus élevée. Les auteurs ont conclu que la contamination de sédiments par des métaux lourds favorisait la persistance des bactéries porteuses de l'intégron et donc les co-résistances portées par l'intégron (Oliveira-Pinto et al., 2016).

Par ailleurs, il a été récemment montré que la persistance de gènes de résistance dans l'environnement dépendait des communautés dans lesquelles se retrouvaient ces gènes. Ainsi, des

gènes de résistance auraient ils tendance à être éliminés par la communauté autochtone. Les auteurs concluent en soulignant l'effet potentiellement protecteur de la communauté native pour limiter la persistance et la dissémination des gènes de résistance (Narciso-da-Rocha and Manaia, 2017).

Les aspects généraux présentés ci-dessus sont volontairement parcellaires mais emblématiques de la complexité de la dynamique d'antibiorésistance des communautés bactériennes selon les conditions environnementales.

Comme illustration de ces phénomènes complexes, nous proposons une revue de littérature considérant en détails ces divers niveaux de complexité pour donner une vision intégrative de l'antibiorésistance dans les eaux de ruissellement en milieu urbanisé.

3.2. Revue de littérature sur l'antibiorésistance dans les eaux de ruissellement en milieu urbanisé

Antimicrobial resistance in urban runoffs

A. Almakki, E. Jumas-Bilak, P. Licznar-Fajardo

To be submitted to Journal of Water and Health

1. Cycle of water and runoff in urban context

The natural cycle of water involves the runoff onto soil surfaces, infiltration and stock of water into soil or plants, and flow to groundwater reserves. Anthropogenic activities can disturb aquatic ecosystems both by direct runoff pollution and by destruction of self-purification capacity of natural ecosystems. The cycle of water is mainly disturbed in urban and industrial settings. Cities and conurbations display many impervious surfaces, which increase the runoff and the risk of stormwater overflow.

Stormwater runoffs are collected from pervious and impervious surfaces after snow or rainfall events. Runoffs from different lands such as forest, agricultural, industrial, urban or mixed areas either flow directly through the natural watershed or are carried by separate from or combined with sanitary wastewater sewer systems. From there, runoffs are discharged to the receiving freshwater bodies by effluents. Today, in developed countries, the water cycle is more and more artificial because it is strongly impacted by the “all in pipes” rationale. Impervious surfaces and pipe networks that increase with urbanization lead to engorgements and floods with recurrent chemical contaminations of fresh waters (Miquel, 2003). Anthropogenic impact represented by the presence of domestic and industrial sewage effluents into runoffs is shown to cause an increase in temperature and microbial contaminants downstream in addition to significant increase in total suspended solids, nutrients (phosphate, ammonia, nitrite, nitrate, total nitrogen and total phosphorus), chloride, sulfate, total alkalinity and hardness (Shakir et al., 2013). These physical and chemical variations lead to a decrease of dissolved oxygen concentration with negative impact on aquatic ecosystems (Rashid and Romshoo, 2013).

In urbanized zones, runoffs called urban runoffs come from diverse origins. The major contributors to urban runoffs are stormwater collected from impervious surfaces like roofs (Adeniyi and Olabanji, 2005; Gromaire et al., 2001; Lye, 2009), roads (Kayhanian et al., 2012), sidewalks, parking lots (Göbel et al., 2007), etc (**Fig. 1**). However, a comprehensive study on urban runoffs in California showed that a majority of bacterial loading occurs during dry weather conditions (24% storm, 76% dry) (Reano et al., 2015). One explanation is that urban runoff can be also generated from residential activities utilizing water such as excessive landscape watering, washing vehicles, leaks from plumbing systems and recreational waters in domestic or touristic settings (Rashid and Romshoo, 2013; Reano et al.,

2015). The runoff linked to these residential and recreational activities accounts for nearly 25% of the overall household water consumption (Reano et al., 2015).

Atmospheric pollutants and dusts generated by traffics (Kayhanian et al., 2012), industry and other anthropogenic activities can be deposited in and transported by runoff waters. The urban runoffs are also contributors of receiving water contamination by fecal bacterial contaminants from human and animals (Selvakumar and Borst, 2006) (**Fig.1**). Other bacteria autochthonous to plumbing systems and effluent pipes can also be found in effluent runoff waters. However, microbial contamination and the associated infectious risk are less assessed than chemical contamination in urban runoff (Chen et al., 2016; Gromaire et al., 2001; Lamprea and Ruban, 2011). Considering that urban runoff waters can be re-used to augment water supplies (Sidhu et al., 2013a), their chemical and bacterial contamination as well as the associated risk for human and environmental health should be carefully assessed.

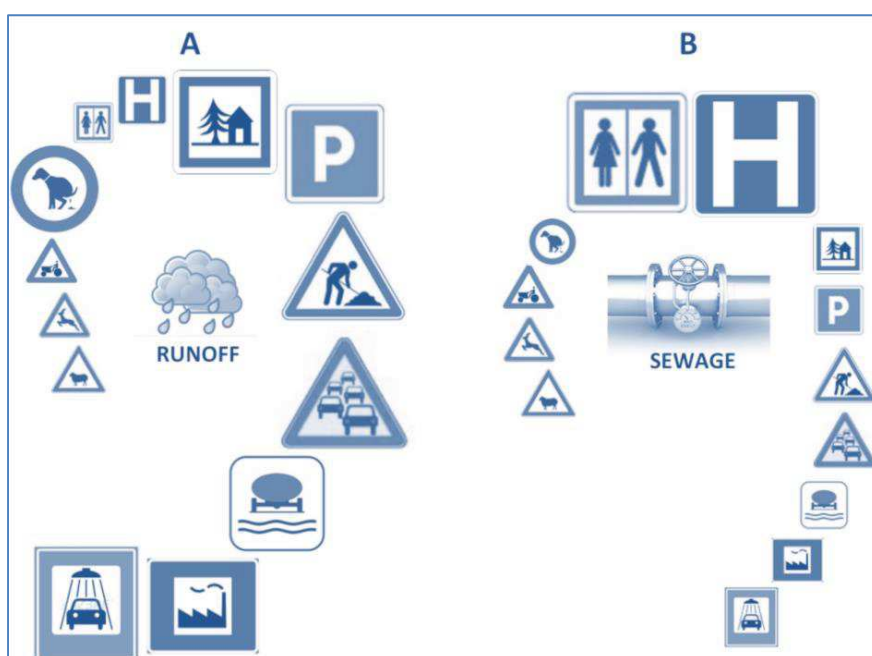


Fig. 1: Contribution of various sources of contamination to urban runoffs (A), compared to sewage water (B). The size of icons is roughly proportional to the contribution of every contamination source. As a non-exhaustive list : animal husbandry, wild animals, agriculture, pets dejections, human toilets and dejections, hospital, houses, roofs and gardens, parking lots, road-working, traffic, transport of chemical substance, industry, car washing.

2. Physical and chemical parameters in urban runoff waters

Temperature directly impacts the life cycle of most living beings and particularly, the bacterial growth. Obviously, the atmospheric temperature and the season influence surface waters. In addition, the temperature of runoff water can be impacted by anthropic activities particularly by industrial effluents but also by urbanization. Urbanization (roads, roofs and other impervious

surfaces) captures and transfers heat from sun to receiving water bodies through stormwater runoff (Hathaway et al., 2016). This increase of water temperature in urban area has been shown to have a negative impact on the aquatic ecosystem (Rossi and Hari, 2007) and to influence bacterial dynamics (Paule-Mercado et al., 2016).

The pH of water from urban runoff ranges from 6.8-8.2 according to conditions (Hao et al., 2006; Kumar and Prabhabar, 2012). This alkalinity acts positively as a buffer against acidic pollutants associated with urban development. But an increase in pH also reflected runoff contamination by metallic roofs (Adeniyi and Olabanji, 2005; Lye, 2009), high touristic pressure (Rashid and Romshoo, 2013) and road traffic (Hao et al., 2006).

The electrical conductivity expressed in $\mu\text{S}/\text{cm}$ is directly linked to water mineralization. Values vary according to the concentration of calcium, iron, chlorides, nitrates, etc. This parameter is correlated to water purity and increases with the level of water pollution (Kumar and Prabhabar, 2012). It has been measured in a continuum of wetland differently impacted by urban and agricultural runoffs and the study demonstrated a good correlation of conductivity with other markers of pollution (Harwell et al., 2008).

Normal values of dissolved oxygen in uncontaminated water range from 8 to 10 mg/L. These concentrations indicate good water quality reflecting high biological oxygen demand, nutrients abundance, and photosynthesis whereas a lower concentration (below 5mg/L) is associated with serious threat to aquatic life. Dissolved oxygen concentration is usually inversely related to temperature with low values usually detected during summer season (Kumar and Prabhabar, 2012). Water from urbanized zones, especially runoff from impervious surfaces, is usually associated with low dissolved oxygen concentrations (Duwig et al., 2014; Kayhanian et al., 2012) and high levels of biological oxygen demand (Mallin et al., 2009).

Waters also contain diverse nutrients generally measured in mg/L like total phosphates and nitrogen. The presence of nitrate and nitrite in abnormally large amount may be detected in rivers receiving surface runoff from agricultural lands amended by nitrogen fertilizers (Kumar and Prabhabar, 2012). Increased population density in large cities is also associated with increased input of nutrients to urban runoff (Caraco and Cole, 1999). Nitrogen and phosphate pollutions are also observed in urban runoffs, mainly due to sewage misconnections and use of fertilizers for urban amenities. Significant nutrient concentrations are also detected in waters flowing from roads, commercial and industrial zones, roofs and gully liquors (Lundy et al., 2012).

The amount of total suspended solids in water indicates pollution pressure in urban runoff. Concentrations can be 10 or 100 times than recommended in water quality standards (25 mg/L) (Lundy et al., 2012). They come for example from roads and traffic (Kayhanian et al., 2012), car parks (Göbel et al., 2007), roadside gully, industrial and commercial roofs, sewage misconnections. High

rate of suspended solids is generally linked to contaminations by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Murakami et al., 2004). These pollutants are particularly concentrated in road dust that comes from vehicle emissions, tires, tarmac, paint markers, etc. Leaching by rain or human activities such as car washing or street sweeping contribute to urban water pollution (Murakami et al., 2004). Consequently, PAHs and heavy metals are present in both particulate and dissolved phases in urban runoff.

Heavy metals are well-known contaminants of waters bodies, lead (Pb), zinc (Zn), copper (Cu), cadmium (Cd) and nickel (Ni) being the main stormwater pollutants (Lundy et al., 2012). Several studies have detected decreased concentration of Pb in recent decades as a result of the regulation of Pb use in tires and gasoline in several countries (Huber et al., 2016), confirming the significant contribution of heavy metals from vehicle and traffic in runoff contamination (Göbel et al., 2007; Kayhanian et al., 2012). For instance, the average total Pb concentration near US highways has decreased from 1860 µg/L in 1979 to 10 µg/L in 2008 (Lundy et al., 2012). The metal roofs of commercial and industrial estates are also a significant heavy metal source of pollution in urban runoffs (Lundy et al., 2012). As an illustration, runoff pollution by rainwater collection has been evaluated in a study conducted in Paris, France, a city with huge surfaces of metallic roofs. It has been shown that, rooftops were source of 80% of the regional sewer system contamination with heavy metals like cadmium, lead and zinc (Gromaire et al., 2001). Beside heavy metals, cobalt (Co) and tungsten (W) are strongly suggestive of contamination due to anthropogenic activities, mainly traffic, as their natural occurrence in environment is very low (Bäckström et al., 2003).

PAHs, particularly those containing more than 3 aromatic rings, were mostly transported with particles in road runoff (Kumata et al., 2000) but PAHs in oil and grease can also directly contaminate urban runoffs (Kayhanian et al., 2012). Other outstanding pollutants such as perfluoro-octane sulphonate (PFOS) are also detected in the runoff because they are transported via the atmosphere and are widely distributed in dust (Sasaki et al., 2003). Heavy metals, PAHs and PFOS are recognized as persistent in environment, producing adverse effects on aquatic ecosystems and being chronically toxic for humans and other living beings (Nakayama et al., 2005). For instance, road dust displays genotoxicity and estrogenic activities that increase with traffic activities (Degirmenci et al., 2000).

3. Antibiotics and antimicrobial agents in waters and urban runoffs

3.1. Natural antibiotics in environment and runoffs

Several antibiotics (ATB) are produced naturally in the environment by soil microorganisms, such as β -lactams produced by *Penicillium*, *Cephalosporium* or *Actinomycetes*, and aminoglycosides and

tetracyclines produced by *Streptomyces* (Kümmerer, 2009a). The main function of natural ATBs is to regulate some competing bacteria along a microbial community by producers, which naturally resist to their own antibiotics, for instance, by the production of ATB inhibiting enzymes like β -lactamases (Kümmerer, 2009a). Bacteria can also expel the antibiotic through an efflux pump, a non-specific mechanism that also expels bacterial metabolites and other xenobiotics such as heavy metals. Therefore, co-resistance to ATBs and heavy metals is frequently observed (Pidcock, 2006) in natural but also in polluted soils. Natural antibiotics (tetracyclines and aminoglycosides) can also serve as intercellular signaling agents in plants by acting onto chloroplast transcription/translation processes (Brain et al., 2008). The concentrations of naturally produced ATBs are expected to be low (ng/L), therefore their contribution to environmental contamination is considered as non-significant (D'Costa et al., 2007; Kümmerer, 2009a). It is worth noting that there is no evidence of production of any ATB by aquatic bacteria (Kümmerer, 2009a). The assessment of natural ATBs contribution in runoff waters contamination needs the study of pristine sites without anthropogenic inputs. In the study of Yang and Carlson no tetracyclines, which are naturally occurring ATBs reliably measured in environmental samples, have been detected in a pristine site in Colorado (Yang and Carlson, 2003). This result confirms the low contribution of natural ATBs to the global reservoir of ATBs in environment.

3.2. Antibiotics from agriculture, animal husbandry and aquaculture origins in environment and runoffs

ATBs used in veterinary medicine belong to the same chemical classes as those used in human infectiology (Cantas et al., 2013), i.e., tetracyclines, quinolones, and sulfonamides (Zhang et al., 2016a). ATBs are administered to animals for treating infections but also as growth-promoting agents through feeding at low concentrations over long periods (Silbergeld et al., 2008). Significant quantities of consumed ATBs may be eliminated unchanged or as active metabolites through urinary and fecal excretions (Du and liu, 2012). One secondary pathway for dissemination of ATBs and their metabolites is fertilizing field by manure (Sarmah et al., 2006). ATBs can be retained by agricultural soils that act as reservoirs (Lee et al., 2007; Rooklidge, 2004). Then, they can gradually be released and reach hydric compartments: to surface-water by drainage and runoff, and to groundwater by percolation. ATBs may also be leaked from manure storage structures or artificial lagoons (Meyer, 2004) or through dust (Hamscher et al., 2003).

Beside livestock, the rapid development of aquaculture leads to the increase of ATBs consumption for both fish treatment and growth promotion (Pruden et al., 2013). Fish farms directly impact water and contribute to an increase of ATBs and ATB resistant bacteria (ARB) in aquatic environment (Cantas et al., 2013).

Antibiotics are also used in plants agriculture for treating bacterial diseases of some fruits and vegetables and also as promoters for fruit growth (Kümmerer, 2009a). In spite of their low-level usage representing about 0.1% of the total use of ATBs in agriculture in USA, careful concern is required (McManus et al., 2002) as these ATBs such as streptomycin and oxytetracycline are highly resistant to natural degrading factors like high temperature, UV irradiation and oxidation. Their long lasting in the environment may increase selective pressure and the selection of resistant bacteria. Agricultural runoffs can then impact downstream urban waters. For example, tetracyclines are observed when both urban and agricultural influences were present along the Poudre River in Colorado (Yang and Carlson, 2003).

3.3. Municipal, hospital and industrial wastewaters

As for animals, ATBs consumed by humans are excreted in urine and feces as parent compounds or as byproducts. Moreover, out-of-date prescriptions also may be discarded directly in the toilet thereby ending up in sewage but also in carbage can and then in dump with soil and water contaminations. Six different families of ATBs have been detected in wastewater worldwide at variable concentrations ranging from ng/L to mg/L (Zhang and Li, 2011). When ATBs and their metabolites reach wastewater treatment plants (WWTPs), they may be removed by adsorption, biodegradation or biotransformation. Combination to particulate matter can enhance ATB elimination by physicochemical processes such as hydrolysis (β -lactams), photolysis, and volatilization (Pruden et al., 2013).

High ATB consumption occurs mainly in hospitals where about half of patients are treated by at least one class of ATBs for a relatively long period. As a result, increased quantities of ATBs and their metabolites are excreted in hospital wastewater effluents and then combined to the municipal wastewater to the final drainage into the main urban freshwater stream (Baquero et al., 2008; Oberlé et al., 2012). Typically, ATB concentrations in hospital effluents were observed to be 100-fold higher than that of municipal effluents (Kümmerer, 2009b). Although hospital sewage constitutes about 1% of the municipal sewage (Kümmerer, 2009a), hospital wastewater is considered as a main contributor of ATBs to the municipal WWTPs and to the receiving river. Quantification of antibiotic residues in the effluent hospital wastewater using liquid chromatography/tandem mass spectrometry method revealed that four fluoroquinolones were detected at high concentrations. For example, 218 $\mu\text{g/L}$ of ciprofloxacin was detected at the point of exit of inpatient hospital wards and 236 $\mu\text{g/L}$ in the drain stream at 100 meters far from the hospital (Diwan et al., 2010).

Concentrations of ATBs in pharmaceutical factories effluents can reach milligram-per-liter concentrations in some studied cases (Kristiansson et al., 2011; Pruden et al., 2013). This is largely more than the amount of any pharmaceuticals excreted in the environment after human or animal

treatments. Sometimes concentrations in environment reach therapeutic levels as it has been detected in China (Li et al., 2009), with the detection of high resistance rates in bacterial communities downstream to drug industrial effluents. In India, several studies report high concentrations of fluoroquinolones in effluents of WWTPs receiving drug factories effluents where they detected 14 mg/L of ciprofloxacin in the effluent of the WWTP and up to 6.5 mg/L in two local lakes (Fick et al., 2009).

3.4. Other antimicrobial agents and biocides contaminating waters

Beside ATBs, disinfectants, preservatives, fungicides, and insect repellents display biocide activity (Liu et al., 2015). They can enter into the surface water directly or indirectly through WWTPs and have deleterious effect on aquatic organisms such as algae (Yang et al., 2008) and fish (Davoren and Fogarty, 2005).

Disinfection by-products are chemical compounds that result from the interaction between chemical disinfectants, mainly chlorine, and organic matters. They are harmful to human health and to the environmental microorganisms. More than 600 disinfection by-products have been detected in drinking water of which, chloramines, trihalomethanes and haloacetic acids are the most prevalent in drinking water (Richardson, 2011). Small water systems which provide water supply to areas of population density of about 5.000 persons usually contain higher disinfection by-products than medium and large water systems as a result of inability to provide adequate water treatment (Charrois et al., 2004). Of note, the carcinogenic *N*-Nitrosodimethylamine is formed during chlorination and chloramination of water containing the herbicide diuron. This by-product is found in groundwater impacted by agricultural runoff (Chen and Young, 2009). Absent from pristine headwaters but dominant in WWTPs effluents, *N*-Nitrosamines, *N*-Nitrosodimethylamine and their precursors were also found in agricultural or stormwater runoff (Zeng et al., 2016).

3.5. Dynamics of antimicrobial agents in the environment

The most important influencing factor for persistency of ATBs and their active by-products in environment is their stability in soil and/or water where some ATBs like fluoroquinolones may remain active for a long time (Turiel et al., 2006). The persistency of ATBs in soil or their transport to surface water is influenced by many factors such as the affinity of ATBs (or their metabolites) to combine with other compounds. For example, tetracycline has a high potential to be transported to surface water due to its low sorption into soil (Kay et al., 2004). Another factor influencing ATB persistency is their resistance to biotransformation as observed for sulfamethoxazole and fluoroquinolones that will subsequently pass untransformed into the WWTPs effluents (Daughton and Ternes, 1999; Roberts and Thomas, 2006). In water, ATB persistency and its impact on microbial

communities are influenced by the physico-chemical properties of water like temperature, pH and dissolved organic compounds, and environmental conditions like solar exposition (Hirsch et al., 1999; Yan and Song, 2014; Yan et al., 2013).

In most studies, ATBs are detected at higher concentration in winter than in summer (Jiang et al., 2011; Kim and Carlson, 2007; Yan et al., 2013; Yang et al., 2011). Seasonal variations could be explained by low temperature and sunshine conditions, which may reduce the processes of microbial degradation and photo-degradation, in addition to the increased incidence of infectious diseases and ATB consumption during cold season (Yan et al., 2013). In a runoff-receiving urban lake, the concentration of 8 antibiotics had increased in surface water or sediment after stormwater event (Zhang et al., 2016a). This result demonstrates the role of runoff waters in the dissemination of ATBs in environment; at least when marked climatic events occurred.

The occurrence of ATBs in natural reservoirs is also influenced by site of sampling because the concentrations of ATBs are higher near the source of contamination and decreased as moving away from this source. In a recent study, the prevalence of ATBs was investigated in the Yangtze River (China) that passed through industrial and crowded urbanized areas. Out of 20 ATBs investigated, 11 belonging to three classes were detected: chloramphenicol, sulfonamides, and macrolides with higher concentrations at the confluence of rivers and sewage effluents than in the coastal sites (Yan et al., 2013). Others authors detected high concentrations of sulfamethoxazole and trimethoprim in watershed impacted by anthropic activities (Duwig et al., 2014).

In conclusion, the concentration of ATBs in environment is generally considered to be low (except in massive industrial pollution area) compared to the therapeutic concentrations. However, these low sub-inhibitory concentrations can lead to microbial community and niche imbalances (results presented on this thesis). So, the impact of antibiotics contamination deserves to be considered whatever their concentrations in waters because ATBs are not only selectors for ARB but also resistance promoters (see chapter 7 of this review).

4. Bacterial communities in urban runoffs

The most commonly detected bacteria in aquatic ecosystems belong to the phyla *Proteobacteria* (*Alpha-*, *Beta-*, and *Gamma-proteobacteria*), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* (Vaz-Moreira et al., 2014). Microbial community composition and structure are highly diverse and correlated to the geographical location and season. Bacterial communities in aquatic environment contain both autochthonous members (aquatic bacteria also found in pristine waters) and allochthonous bacteria introduced from diverse sources, for instance from soil (Lee and Kang, 2016). Soil bacteria are major contributors to aquatic bacterial contamination as they are organized in

abundant communities that differ in structure according to the nutrient availability, depth of soil layer and season. Since most bacteria are clustered in the top layer of soil (Lee and Kang, 2016), they are better able to disseminate in water during flood episodes. In one hand, soil can be considered as a natural reservoir for antibiotics and bacteria carrying resistance genes and in the other hand, soil is directly implicated in further contamination of groundwater by leaching and contamination of adjacent surface water by surface runoffs.

Beside soil bacteria, aquatic allochthonous bacteria can originate from human beings or animals; they can be mutualistic or pathogenic. Human enteric pathogens contaminate water, which in turn, exposes human and cause several serious infectious diseases such as salmonellosis, shigellosis, cholera, enteric viral infection and amoebiasis. An example of this feco-oral route of transmission is the increased incidence of infectious diseases among inhabitants of Varanasi city in India correlated with the use of Gange river water for daily activities (Hamner et al., 2006). Allochthonous bacterial pathogens can also enter freshwater via runoffs mainly through inefficiently treated sewage from overcrowded areas devoided of proper sanitary disposal. In addition, human and animal pathogens can enter surface water by runoff from manure-applied agriculture field (Thurston-Enriquez et al., 2005). High quantities of pathogenic bacteria may enter river water as a result of extreme climate changes like severe floods, especially when these floods affect sewer and sewage plants (Sugiyama et al., 2010). Mutualistic bacteria from human and animal gut can also spread in environment via contaminated water and their detection can be indicative for feco-oral infectious risk, as detailed below.

In urban area of developed countries, the 'all pipes' rationale creates technological ecosystems as observed in premise plumbing. Premise plumbing includes all water supply systems delivering water to various buildings like houses, hospitals, condominiums, apartments, and office buildings. Water circulating in premise plumbing may contain microbial communities in spite of the use of different disinfectants (Wang et al., 2013). Bacteria in premise plumbing belong to *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Acidobacteria* (Wang et al., 2013). They are autochthonous to natural water and they found in premise plumbing particular niche conditions that enhance their installation and spread. Among these communities, there are opportunistic human pathogens called opportunistic premise plumbing pathogens (OPPPs), such as *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and non-tuberculous mycobacteria (Falkinham et al., 2015 for a comprehensive review), which are innately resistant to ATBs. OPPPs are adapted to growth in premise pipes, mainly because they tolerate low concentrations of organic carbon and oxygen in stagnant ditch, resist to amoeba grazing and form biofilm, which protects bacterial cells from disinfectants and thermal shocks (Falkinham et al., 2015).

The total bacterial load in urban runoff water is significantly influenced by land use and land cover (Converse et al., 2011; Selvakumar and Borst, 2006). High-population density is found to be associated with higher bacterial loads (Glennie, 1984). For instance, microorganism load from high-density residential areas are higher than those observed in low-density residential and in commercial areas (Selvakumar and Borst, 2006). Another factor that affects bacterial concentration in urban runoff is the seasonal variations with lower bacterial concentrations during winter than summer (Selvakumar and Borst, 2006). Such observation can be attributed to increased dilution of runoff water during winter by rainfalls and also to lower growth rates of microorganisms at low temperature.

Urban runoff water contains a less diversified microbial community compared to agricultural and municipal wastewater due to less nutrient availability (Ibekwe et al., 2016). Most of the detected bacteria belong to *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* (Ibekwe et al., 2013). However, community equilibrium may be disrupted by climatic events. For example, increased concentrations of the genera *Aeromonas* and *Bacillus* were observed in the receiving water of Lakes Xuanwu and Wulongtu after storm event (Zhang et al., 2016a). One explanation could be the resuspension of benthic bacteria into surface water by the storm event (Sidhu et al., 2012). Several studies observed that river sediments contain greater quantities of microorganisms than surface water ((Bai and Lung, 2005; Fries et al., 2008; Ibekwe et al., 2016). Indeed, high quantities of aquatic microbes live in attached complex and abundant communities called biofilm (Costerton et al., 1995).

Finally, chemically polluted runoff waters contain other bacteria like OPPPs that generally display a resistance to xenobiotics and a large repertoire of enzymes. For instance, high concentration of *Mycobacterium goodii* and *Pseudomonas aeruginosa* are found in the Lerma River (Mexico) impacted by hydrocarbons, polychlorobiphenyl (PCB) and heavy metals (Brito et al., 2015).

5. Indicators of human pathogens in urban runoff

Allochthonous bacterial contamination of water associated with high-risk of human infection occurs mainly by human or animal microbiota dissemination via fecal matter. Such a contamination and the resulting feco-oral epidemiological cycle is a major cause of human diseases because 2.4 billion peoples have no access to water sanitation (WHO, 2015). Therefore, the detection of fecal bacteria would indicate water contamination and risk for human health. However, pathogens are generally at low concentration in environment and alternative non-pathogenic bacteria but dominant in fecal matters are used as indicators. Among the thousands bacterial species inhabiting the human gut (Cabral, 2010), the genera *Bacteroides* and *Enterococcus*, as well as members of the family *Enterobacteriaceae*, are among the most prevalent and are used as indicators of fecal contamination.

Classical fecal indicator bacteria (FIB) are: total coliforms (among them thermotolerant coliforms and *Escherichia coli*) and fecal streptococci (among them *Enterococcus* spp.) (Cabral, 2010). Total coliforms that gather fecal and non-fecal enterobacteria are not specific enough to indicate contamination by gut bacteria. Therefore, thermotolerant coliforms also called fecal coliforms, which grow at 44-45°C and ferment lactose (Payment et al., 2003), are the most frequently used indicator of fecal pollution of water. *E. coli* is considered as a reliable indicator compared to other thermotolerant coliforms such as *Klebsiella* spp., which are able to grow in water (Caplenas and Kanarek, 1984). Since thermotolerant coliforms come from the gut of all warm-blooded and some cold-blooded animals, they cannot predict the source of pollution (Harwood et al., 2000). As *Enterococcus* spp. can survive in water environment and in WWTPs for longer period than coliforms, they might indicate persistent fecal contamination more accurately and they appear more related with the overall infectious risk than thermotolerant coliforms (Byappanahalli et al., 2012; Kay et al., 1994). However, fecal enterococci are also found in all warm-blooded animals, so they lack specificity to trace human fecal contamination. For instance, they are prevalent in animal manure used for fertilizing land, thereby enterococci are good indicators of human contamination in urban context but not in countrysides (Byappanahalli et al., 2012; Cabral, 2010). Some species and sub-species of *Bacteroides* are frequently isolated from mammalian gut and because they have low ability to grow in environment, their detection in water reflects a rather recent fecal contamination (Abraham, 2011). In addition to *E. coli*, *Clostridium perfringens*, somatic coliphage and male-specific coliphage are complementary indicators. They contribute to the complete description and the modelization of urban residential runoffs in California over period of five years during dry and storm conditions (Reano et al., 2015).

In this context, methods were developed to track microbial source; they focus on human specific indicators in order to discriminate between human and non-human source of contamination. These methods are PCR-based methods that amplify genes associated with certain groups of bacteria or viruses. For bacteria, the detection of *Bacteroides* HF183 and *Methanobrevibacter smithii nifH* gene has been successfully associated to human sources of contamination by sewage pollution of stormwater runoff water (Sidhu et al., 2012, 2013a). It is also believed that analysis of the ATB resistance profiles of fecal indicator bacteria may help to trace the source of contamination and differentiate human from animal origins (Harwood et al., 2000). The resistance profile of fecal streptococci classifies correctly 95% of the strains from human sources (Hagedorn et al., 1999). Another example, from the Seine watershed (France) in 2009, the prevalence of *E. coli* displaying resistance to at least one ATB differed widely according to the origin of contamination: hospital effluents (71%), municipal wastewaters (44%), agricultural fields (16%) and forests (2%) (Servais and

Passerat, 2009). However, due to the rapid evolution of resistance epidemiology, the specificity of a given resistance profile should be regularly re-evaluated.

The human adenovirus and human polyomavirus are also considered as valuable index for the presence of human enteric viruses because they are highly prevalent in sewage and highly specific to human host (Sidhu et al., 2013b).

Pharmaceutical products (caffeine, paracetamol, salicylic acid and acesulfame) are also useful indicators of anthropogenic sewage pollution (Glassmeyer et al., 2005).

It is noteworthy that the dynamics of OPPPs concentration in water systems differs from that of classical feco-oral pathogens and human-specific markers, for which the concentration increases coming closer to the point source of contamination. In contrast, the numbers of OPPPs increase centrifugally from their point of entry in the system because they can multiply in pipes and plumbing systems (Falkinham et al., 2015). Consequently, OPPP numbers do not correlate with fecal coliform numbers and other classical indicators (Falkinham et al., 2015) and fecal indicators and microbial source tracking methods may fail to evaluate OPPPs contamination.

Fecal indicators are routinely used in urban runoff waters as a standard of water quality assessment (United States Environmental and Protection Agency, 2015). In developed countries with good sanitary system, fecal indicators in runoff mainly originate from domestic animal feces and wild life. However, when stormwater urban runoffs sewer systems mixed with municipal sanitary wastewater due to failed infrastructure and cross-connection, fecal pollution of human origin can be detected in stormwater urban runoffs (Sauer et al., 2011). Urban runoffs contamination by fecal indicators is particularly significant because higher concentrations were detected in urban runoffs than in agricultural and mixed land use runoffs (Paule-Mercado et al., 2016). The concentration of fecal indicators in stormwater runoff is influenced by lot of environmental parameters, such as early or late-phase of storm event, early or late warm season and various physical or chemical parameters (Paule-Mercado et al., 2016). Fecal coliforms have been detected in freshwater sources receiving urban runoffs (Mallin et al., 2000) but *Enterococcus* spp., which persist in environment, have been often detected at higher concentrations and rates than *E. coli* (Krometis et al., 2010; Parker et al., 2010; Sidhu et al., 2012). The count of fecal coliforms and fecal streptococci are poorly correlated in runoff waters (Selvakumar and Borst, 2006). Microbial source tracking indicators such as *Bacteroides* HF183, human adenovirus and acesulfame concur to demonstrate more ubiquitous sewage contamination in the environment of major Australian cities than assessed by classical indicators (coliforms and enterococci) (Sidhu et al., 2013b).

Despite their large utilization as indicators of microbial quality water, fecal indicators estimation in runoff water seems frequently non-correlated to the presence of pathogens (de Man et al., 2014; Selvakumar and Borst, 2006). For instance, a study in Dutch urban sites shows that all urban

floodwater samples contained fecal indicators but their concentrations are non-correlated to those of pathogens present in the same samples (de Man et al., 2014). Briefly, the prevalence of pathogens depends on their seasonality and their persistency in relation to the location of flooding. Since these parameters may differ from those of indicators, discrepancies between indicator and pathogen prevalence may be observed (de Man et al., 2014). Waterborne enteric pathogens are frequently detected in runoff waters in high-density residential areas and during extreme climatic events leading to flooding. They include bacteria, viruses (enteric viruses), protozoa; all are indicating sewage pollution (Noble et al., 2006; Sidhu et al., 2012). Urban runoffs water were shown to contain higher concentrations (7.94%) of total potential pathogens than agricultural runoff (6.52%) or recreational area runoff (6.00%) (Ibekwe et al., 2013). Waterborne enteric pathogens in runoff waters are mainly *Vibrio* spp., *Leptospira* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia*, enterovirus and norovirus (Cann et al., 2013; de Man et al., 2014; Sidhu et al., 2012). Considering the human infectious risk, some studies demonstrated that exposure to stormwater runoff waters is linked to gastrointestinal diseases (Curriero et al., 2001; Gaffield et al., 2003) but rare studies evaluate the annual risk for human infection associated to pathogens in urban runoffs. De Man et al. (2014) assess an annual risk of 8% for people exposed at least 2 times a year to floodwater originating from rainfall generated urban runoff (de Man et al., 2014).

6. Antibiotic resistant bacteria (ARBs) in urban runoffs

Hydric bacteria, as all bacteria, have their own resistance determinants that are intrinsically inherited or acquired by mutation or horizontal gene transfer under selective pressure. Classically, it is believed that high ATB concentrations (near minimum inhibitory concentration, MIC) select for resistant strains by killing all susceptible bacteria (Drlica, 2003) whereas low concentration (ng/L) will enhance mutation in naturally occurring hypermutator bacteria (Sandegren, 2014). Very low concentration (< MIC) may cause minute reduction in growth of susceptible bacteria, even though, these low concentrations are important for selection and enrichment of resistant mutants and even can select for de novo mutants (Gullberg et al., 2011). It is important to note that the very low amounts of antibiotics measured in water and external environment can be in the same order of magnitude as the minimum selective concentration (MSC), which is the lowest antibiotic concentration that allows selection of resistant mutants (Gullberg et al., 2011; Sandegren, 2014). The MSCs are almost up to 140-fold below the MIC of the susceptible bacteria. This finding suggests that infinitesimally low concentration of ATBs can select resistance (Gullberg et al., 2014) and it is

generally accepted that the exposure to antibiotics at low concentrations over long periods is an optimal way to enrich communities by resistant members (Gullberg et al., 2011).

Bacterial aquatic communities are dynamic and are influenced by environmental conditions but also by the own adaptive capacities. For example, it appears that resistant mutants selected at sub-MIC are generally fitter than those selected at high concentrations suggesting that, in the absence of antibiotic pressure, these mutants will be more persistent in bacterial populations than those selected by high antibiotic concentration, which have higher fitness cost (Sandegren, 2014).

Outstanding antimicrobial resistance has been detected in several aquatic bacteria such as *Aeromonas*, *Rhodospirillaceae*, *Shewanella*, *Vibrio*, and *Actinomyces* (Goñi-Urriza et al., 2000; Hernández et al., 2011; Schreiber and Kistemann, 2013). Resistance and often multidrug resistance to ATBs are also common traits shared by OPPPs belonging to *Proteobacteria* such as *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* (Falkinham et al., 2015). In addition, most fecal bacteria of human origin that contaminate water bodies carry antibiotic resistance genes (ARGs) as a result of exposure to antibiotic treatment that selects ARBs inside human gut (Salysers et al., 2004). *Aeromonas* spp. is emblematic of autochthonous bacteria that have a role in disseminating antimicrobial resistance. For instance, the survey of antimicrobial resistance along Elorn river in Brittany (France), which drained a wide farming land of intense livestock farming activities and freshwater fish farming, shows a general bacterial enrichment in addition to an increasing rates of resistance to oxolinic-acid and oxytetracycline in *Aeromonas* populations (Gordon et al., 2007). Member of the genus *Aeromonas* spp. naturally produce three β -lactamases belonging to class B (carbapenemase), class C (cephalosporinase), and class D (oxacillinase). They can exchange resistance genes with other bacteria in the environment as they possess high quantity of mobile genetic elements like class 1 integrons (Henriques et al., 2006) or by horizontal transfer of plasmids that harbor resistance gene(s) (for instance, fluoroquinolone resistance gene *Qnr*) (Cattoir et al., 2008a). It has been shown that plasmids encoding multidrug resistance isolated from *Aeromonas* can be transferred to human pathogens like *Escherichia coli* or *Enterobacter aerogenes* (Marchandin et al., 2003; Rhodes et al., 2000). So, aquatic environment is inhabited by a high diversity of autochthonous bacteria representing a vast reservoir of resistance genes and by allochthonous bacteria, which can be pathogens and is therefore a place where transfer of resistance genes among and between autochthonous and allochthonous bacteria has been demonstrated.

Concerning ARBs in urban runoffs, increased ATB concentrations, as well as percentages of ARBs and resistance genes in two urban freshwater sources after storm event have been observed in China (Zhang et al., 2016a). The detected ARBs include *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, and *Bacillus cereus* as also observed in a river in South Africa (Carstens et al., 2014). The latter report shows that most isolates were resistant to cephalotin and/or amoxicillin and that few

resisted to erythromycin and streptomycin. Other reports indicate that about 20% of bacteria isolated from waterways are multidrug resistant (MDR) because they resisted to ampicillin, kanamycin, chlorotetracycline, oxytetracycline, and streptomycin (West et al., 2011). Despite the presence of ARBs on urban impervious surfaces, the percentage of ARBs detected in runoff water is generally lower than those observed for WWTPs effluents (Zhang et al., 2016a).

Local conditions influence the prevalence of ARBs. Resistant microorganisms colonizing sediments can be easily moved through the overlying water column under influence of man or natural events like heavy rainfall events (Griffith et al., 2010). High prevalence of MDR *E. coli* was detected in riverbed sediments of the anthropically impacted Apies River (South Africa), suggesting that river sediments may act as a reservoir of resistant bacteria with subsequent dissemination to the overlying river under certain conditions (Abia et al., 2015). Moreover, a higher number of opportunistic pathogens known for their intrinsic and acquired resistance to ATBs (*Aeromonas*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* and *P. aeruginosa*) were detected in freshwater resources during post-monsoon and winter seasons than during summer as a result of additional discharge of terrestrial resistant strains by runoff during the heavy rainfalls (Mohanta and Goel, 2014).

7. Resistomes and ARGs in urban runoffs

The resistome is defined as the whole pool of genes involved in ATB resistance in a given ecosystem. As ATBs, ARGs are considered as emerging contaminants because of their potential adverse effect on the ecosystem and human health (Hoa et al., 2011). They are found at increased levels in sediments and other aquatic compartments, mainly in urban, agricultural and industrial areas. Generally, ARGs or ARG fragments are carried by living bacteria but they can also persist freely in environment after bacterial death. The resistome is transmissible from bacterium to bacterium by conjugation or transduction or from environment to bacterium by transformation. Within the resistome, the total of all mobile genetic elements (MGE) (plasmids, phages, integrons and transposons, etc) that contributes to horizontal gene transfer (HGT) is called mobilome (Caniça et al., 2015; D'Costa et al., 2011). Gene transfer within a bacterial community is a major and rapid evolution process that allows niche adaptation, niche extension and colonization of new niches. Thanks to the water continuum, the presence of resistance genes on MGE allowed the resistance genes to spread by HGT into further distant geographical area (Allen et al., 2010).

Many resistance genes are produced by soil ATB-producing bacteria as a self-protection mechanism. Soil microbial communities could thus be considered as reservoir for ARBs as well as for ARGs

(Walker and Walker, 1970). For example, *Streptomyces* have been shown to produce several classes of β -lactamases and their homologs are responsible for the clinical resistance to β -lactams (Forsman et al., 1990). Another example is the detection of quinolone resistance genes (*qnr*) originating from waterborne bacteria like *Aeromonas* spp. in resistant clinical strains (Baquero et al., 2008). ARGs that largely contribute to the clinical ATB resistance such as aminoglycoside modifying enzymes and extended spectrum β -lactamases have been detected in soil before the first therapeutic use of their target ATBs (D'Costa et al., 2011; Song et al., 2005). However, anthropization is believed to enhance the ARG prevalence in various ecosystems. Using PCR, several types of genes linked to tetracycline resistance by efflux pump and ribosomal protection proteins were analyzed in the Pearl River estuary (Chen et al., 2013). The study revealed a significant correlation between the abundance and diversity of resistance genes, ATBs and the anthropogenic footprint in the River estuary. Consequently, tetracycline resistance genes (*tet*) can be used as indicators of anthropogenic impact on the occurrence and dissemination of resistance in environment (Chen et al., 2013).

Several studies suggest that resistant determinants in environmental bacteria can serve primarily functions other than deactivating the ATBs. This biological phenomenon is named exaptation. For instance, plasmid-encoded β -lactamases may be involved in synthesis of bacterial peptidoglycan and as a side effect, they hydrolyze β -lactams (Meroueh et al., 2003). But efflux pumps are probably the most emblematic examples of exaptation. Indeed, efflux pumps, which are complex machineries that eject molecules from cytoplasm throughout membrane(s) and cell wall, have many functions in bacterial metabolism beside ATB efflux. Pump mutations or overexpression can lead to enlarge the repertory of molecules extruded by the efflux system leading to the resistance to many xenobiotic compounds including ATBs. The ejection of several classes of ATBs by the same pump leads to a MDR phenotype (Alonso et al., 1999). Very efficient efflux pumps are described in aquatic bacteria such as *P. aeruginosa* (Schwartz et al., 2015). The selection or overexpression of the same efflux pump by both ATBs and heavy metals explain several cases of co-resistance between ATBs and heavy metals (Baker-Austin et al., 2006). Quaternary ammonium compounds are heavily used biocides in hospital and in industrial settings that can induce overexpression of efflux pumps leading to cross-resistance to the ATBs belonging to fluoroquinolones (Buffet-Bataillon et al., 2016).

The mechanisms of co-resistance could also be due to different resistance determinants present on the same genetic element. Large conjugative plasmids are known as MGE that frequently carry multiple ARGs, as well as genes that confer resistance to biocides and heavy metals (Gullberg et al., 2014). For instance, an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) plasmid identified in enterobacteria during hospital outbreaks contains genetic determinants for resistance to β -lactams but also to aminoglycosides, tetracycline, macrolides, trimethoprim, sulfonamide, silver, copper, and arsenic. Such a plasmid generally confers high fitness costs for the ARBs in absence of selective pressure. It

has been recently shown that a single ATB or heavy metal at very low concentrations markedly under the MIC (as measured in external environment) can select this type of plasmid. These low concentrations correspond to the MSC described above and the MSC can be further lowered by the combined effect of several xenobiotics. Finally, multipartite MGE and MSC of a single or a mix of xenobiotics in external environment contribute to the emergence, maintenance and transmission of MDR ARGs on MGE (Gullberg et al., 2014).

Beside conjugative plasmids, integrons are other multipartite genetic elements formed by several gene cassettes and known for their role in capture and spread of ARGs, mainly among Gram-negative bacteria and particularly among pathogens. Beside chromosomal integrons also called superintegrons, which are not involved in resistance, mobile integrons are smaller with less than ten cassettes, mainly containing ARGs. They are not mobile by themselves but they are carried by MGE such as transposons and plasmids. More than 130 cassettes conferring resistance to ATB families but also to antiseptics and biocides have been described in mobile integrons (Stalder et al., 2012, for a very comprehensive review on the involvement of integrons in environmental spread of antibiotic resistance).

Mobile integrons are found in diverse ecosystems, class 1 integrons being particularly present in water bodies compared to class 2 integrons (Luo et al., 2010). The link between mobile integron prevalence in bacterial communities and ATB pressure is suggested by numerous studies as well as by their higher prevalence in *E. coli* populations near areas of human activities (Stalder et al., 2012). For instance, urban WWTPs and hospital effluents have been shown to contain high prevalence rates of class 1 integron (Ferreira da Silva et al., 2007; Guo et al., 2011). In addition, the prevalence of mobile integron-containing strains is higher in polluted than in pristine natural waters (Stalder et al., 2014). The link between mobile integrons prevalence and ATBs in environment has been demonstrated for factories effluents and WWTPs but their prevalence increase also in anthropized environment without detection of ATB inputs. Again, heavy metals play a major role. For instances, i) adding cadmium to water in microcosm lead to a 100-fold increase in integron abundance (Wright et al., 2008) ii) a class 1 mobile integron carried by Tn21 transposon contains a mercury resistance operon (Stalder et al., 2014). Quaternary ammonium compounds also contribute to the selection of strains carrying class 1 integrons with quaternary ammonium resistance gene (*qac*) (Stokes and Gillings, 2011). Finally, as for conjugative plasmids, class 1 integrons are linked with trace element resistance determinants and so, may support ARG maintenance via trace element stress (Rosewarne et al., 2010). Despite the correlation between the prevalence of mobile integrons and antibiotic resistance is widely studied for enterobacteria of medical interest but still controversial for other

bacteria, the quantification of integrase gene of class 1 integrons is currently proposed as an indicator of bacterial resistance in environment.

MGEs contribute directly to HGTs and HGTs are also influenced by bacterial lifestyle and environmental stresses. Bacteria in aquatic systems live in attached biofilms as well as in flocs, which are biofilm-forming bacteria in aggregates. Biofilm-forming bacteria are frequently resistant after prolonged exposure to low ATB concentration due to weak diffusion of ATBs in biofilm structure (Qi et al., 2016). Thereby, biofilms and flocs are considered as reservoirs of ARGs and MGEs, such as class 1 integrons (Drudge et al., 2012), in which the rate of transfer of MGEs carrying resistance determinants, such as resistance to quaternary ammonium biocides and fluoroquinolones is increased due to the proximity of bacterial cells (Buffet-Bataillon et al., 2016). Altogether, biofilm is an ideal environment for acquisition and spread of resistance genes (Fux et al., 2005).

Considering the influence of external conditions on HGT and resistance evolution, anthropogenic stresses are likely to facilitate transfer of chromosomal resistance genes to the MGE pool and therefore to accelerate evolution and spread of resistant strains (Cattoir et al., 2008b). In this context, environmental pollutant such as metals, detergents, and nanomaterials can facilitate the transmission of ARGs by HGT, possibly through suppressing cell membrane barrier and increasing permeability (Wang et al., 2015). Integrons seem also involved in bacterial mechanisms leading to resistance because they are linked with SOS bacterial response. Under stress conditions, integrase expression and thereby rearrangements and capture of new resistance cassettes was shown to be enhanced (Guerin et al., 2009).

The studies that specifically investigate ARGs and resistome in runoff waters are very scarce. The main finding is the detection of nine ARGs and integrons at increased levels after storm events, indicating the potential role of stormwater in dissemination of ARGs from land sewer system to the urban freshwater resources (Zhang et al., 2016a). Most other studies consider surface waters receiving WWTP effluents, which could contribute to runoff. The predominant ARGs in WWTP effluents are class 1 integrons and sulfonamides resistance genes (*sul*) (Zhang et al., 2016b). Hospital effluents are a major source of mobile integron dissemination with a prevalence in *E. coli* strains that decreases from the hospital to the WWTP and the receiving river continuum (Oberlé et al., 2012). Similar prevalence and concentrations of ARGs exist in both animals and human waste streams but higher diversity of ARG is present in WWTP effluents than in livestock environments (Agga et al., 2015). Manure has been shown to significantly increase the mobile genetic resistance element pool in soil and therefore could contaminate runoff waters (Heuer et al., 2011). Another indirect example of runoff water contamination by ARGs is provided by the use of reclaimed water for urban park irrigation in the city of Victoria (Australia). The use of reclaimed water led to a shift in bacterial

community composition linked to an increase in ARG concentration and to the emergence of particular ARG types, such as KPC and IMP-2 groups that encode emerging broad spectrum beta-lactamases (Han et al., 2016) degrading last-line antibiotics of the carbapenems class used to treat patients infected by bacteria resistant to other available antibiotics.

8. Conclusion

Runoff water has currently received less interest than other water bodies concerning antimicrobial resistance. However, from existing studies, past and current urbanization, modifications of environmental conditions and human lifestyle worldwide, as well as the continuing emergence of new antibiotic resistance mechanisms, runoff water studies should not be neglected anymore because of their central role in ATBs, ARB, and MGE dissemination. Taking into account the current threat of antimicrobial resistance on human health, such an effective vehicle for resistance spread has to be plainly considered in current national and international global action plans on antimicrobial resistance based on the One Health concept.

Bibliography

- Abia, A.L.K., Ubomba-Jaswa, E., and Momba, M.N.B. (2015). High prevalence of multiple-antibiotic-resistant (MAR) *Escherichia coli* in river bed sediments of the Apies River, South Africa. *Environ. Monit. Assess.* *187*, 652.
- Abraham, W.-R. (2011). Megacities as sources for pathogenic bacteria in rivers and their fate downstream. *Int. J. Microbiol.* *2011*.
- Adeniyi, I.F., and Olabanji, I.O. (2005). The physico-chemical and bacteriological quality of rainwater collected over different roofing materials in Ile-Ife, southwestern Nigeria. *Chem. Ecol.* *21*, 149–166.
- Agga, G.E., Arthur, T.M., Durso, L.M., Harhay, D.M., and Schmidt, J.W. (2015). Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. *PLoS One* *10*, e0132586.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., and Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 251–259.
- Alonso, A., Rojo, F., and Martínez, J.L. (1999). Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ. Microbiol.* *1*, 421–430.
- Bäckström, M., Nilsson, U., Håkansson, K., Allard, B., and Karlsson, S. (2003). Speciation of Heavy Metals in Road Runoff and Roadside Total Deposition. *Water. Air. Soil Pollut.* *147*, 343–366.
- Bai, S., and Lung, W.-S. (2005). Modeling sediment impact on the transport of fecal bacteria. *Water Res.* *39*, 5232–5240.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., and McArthur, J.V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* *14*, 176–182.
- Baquero, F., Martínez, J.-L., and Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 260–265.
- Brain, R.A., Hanson, M.L., Solomon, K.R., and Brooks, B.W. (2008). Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* *192*, 67–115.
- Brito, E.M.S., De la Cruz Barrón, M., Caretta, C.A., Goñi-Urriza, M., Andrade, L.H., Cuevas-Rodríguez, G., Malm, O., Torres, J.P.M., Simon, M., and Guyoneaud, R. (2015). Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: Investigation of hydrocarbon degradation potential. *Sci. Total Environ.* *521–522*, 1–10.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Maillard, J.-Y., Bonnaure-Mallet, M., and Jolivet-Gougeon, A. (2016). Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria. *Future Microbiol.* *11*, 81–92.
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., and Harwood, V.J. (2012). *Enterococci* in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *76*, 685–706.
- Cabral, J.P.S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *7*, 3657–3703.
- Caniça, M., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Clemente, L., Gomes-Neves, E., Poeta, P., Dias, E., and Ferreira, E. (2015). Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. *Res. Microbiol.* *166*, 594–600.
- Cann, K.F., Thomas, D.R., Salmon, R.L., Wyn-Jones, A.P., and Kay, D. (2013). Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiol. Infect.* *141*, 671–686.

- Cantas, L., Shah, S.Q.A., Cavaco, L.M., Manaia, C.M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., and Sørum, H. (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front. Microbiol.* *4*, 96.
- Caplenas, N.R., and Kanarek, M.S. (1984). Thermotolerant non-fecal source *Klebsiella pneumoniae*: validity of the fecal coliform test in recreational waters. *Am. J. Public Health* *74*, 1273–1275.
- Caraco, N.F., and Cole, J.J. (1999). Human impact on nutrient export: an analysis using major world rivers. *Ambio* 167–170.
- Carstens, A., Bartie, C., Dennis, R., and Bezuidenhout, C. (2014). Antibiotic-resistant heterotrophic plate count bacteria and amoeba-resistant bacteria in aquifers of the Mooi River, North West province, South Africa. *J. Water Health* *12*, 835–845.
- Cattoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Soussy, C.-J., and Nordmann, P. (2008a). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.* *14*, 231–237.
- Cattoir, V., Nordmann, P., Silva-Sanchez, J., Espinal, P., and Poirel, L. (2008b). ISEcp1-mediated transposition of qnrB-like gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 2929–2932.
- Charrois, J., Graham, D., Hrudey, S., and Froese, K. (2004). Disinfection by-products in small Alberta community drinking-water supplies. *J. Toxicol. Environ. Health A* *67*, 1797–1803.
- Chen, W.-H., and Young, T.M. (2009). Influence of nitrogen source on NDMA formation during chlorination of diuron. *Water Res.* *43*, 3047–3056.
- Chen, B., Liang, X., Huang, X., Zhang, T., and Li, X. (2013). Differentiating anthropogenic impacts on ARGs in the Pearl River Estuary by using suitable gene indicators. *Water Res.* *47*, 2811–2820.
- Chen, R.-H., Li, F.-P., Zhang, H.-P., Jiang, Y., Mao, L.-C., Wu, L.-L., and Chen, L. (2016). Comparative analysis of water quality and toxicity assessment methods for urban highway runoff. *Sci. Total Environ.* *553*, 519–523.
- Converse, R.R., Piehler, M.F., and Noble, R.T. (2011). Contrasts in concentrations and loads of conventional and alternative indicators of fecal contamination in coastal stormwater. *Water Res.* *45*, 5229–5240.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* *49*, 711–745.
- Curriero, F.C., Patz, J.A., Rose, J.B., and Lele, S. (2001). The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *Am. J. Public Health* *91*, 1194–1199.
- Daughton, C.G., and Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* *107 Suppl 6*, 907–938.
- Davoren, M., and Fogarty, A.M. (2005). Ecotoxicological evaluation of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol, and sodium p-tertiary amylphenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *60*, 203–212.
- D’Costa, V.M., Griffiths, E., and Wright, G.D. (2007). Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 481–489.
- D’Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* *477*, 457–461.
- Degirmenci, E., Ono, Y., Nagadome, H., Kanoh, S., and Kawara, O. (2000). Genotoxicity and estrogen-like cell growth activity of samples extracted from street dusts. *Environ. Toxicol.* *15*, 504–508.

- Diwan, V., Tamhankar, A.J., Khandal, R.K., Sen, S., Aggarwal, M., Marothi, Y., Iyer, R.V., Sundblad-Tonderski, K., and Stålsby-Lundborg, C. (2010). Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health* *10*, 414.
- Drlica, K. (2003). The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* *52*, 11–17.
- Drudge, C.N., Elliott, A.V.C., Plach, J.M., Ejim, L.J., Wright, G.D., Droppo, I.G., and Warren, L.A. (2012). Diversity of integron- and culture-associated antibiotic resistance genes in freshwater floc. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 4367–4372.
- Du, L., and liu (2012). Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* *32*, 309–327.
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M.C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., and Martins, J.M.F. (2014). Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? *Procedia Earth Planet. Sci.* *10*, 370–375.
- Falkinham, J.O., Hilborn, E.D., Arduino, M.J., Pruden, A., and Edwards, M.A. (2015). Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Health Perspect.* *123*, 749–758.
- Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2007). Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* *60*, 166–176.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., and Larsson, D.G.J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.* *28*, 2522–2527.
- Forsman, M., Häggström, B., Lindgren, L., and Jaurin, B. (1990). Molecular analysis of beta-lactamases from four species of *Streptomyces*: comparison of amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* *136*, 589–598.
- Fries, J.S., Characklis, G.W., and Noble, R.T. (2008). Sediment-water exchange of *Vibrio* sp. and fecal indicator bacteria: implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Res.* *42*, 941–950.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* *13*, 34–40.
- Gaffield, S.J., Goo, R.L., Richards, L.A., and Jackson, R.J. (2003). Public health effects of inadequately managed stormwater runoff. *Am. J. Public Health* *93*, 1527–1533.
- Glassmeyer, S.T., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Cahill, J.D., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Meyer, M.T., and Kryak, D.D. (2005). Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ. Sci. Technol.* *39*, 5157–5169.
- Glenne, B. (1984). Simulation of Water Pollution Generation and Abatement on Suburban Watersheds1. *JAWRA J. Am. Water Resour. Assoc.* *20*, 211–217.
- Göbel, P., Dierkes, C., and Coldewey, W.G. (2007). Storm water runoff concentration matrix for urban areas. *J. Contam. Hydrol.* *91*, 26–42.
- Goñi-Urriza, M., Pineau, L., Capdepuy, M., Roques, C., Caumette, P., and Quentin, C. (2000). Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J. Antimicrob. Chemother.* *46*, 297–301.

- Gordon, L., Giraud, E., Ganière, J.-P., Armand, F., Bouju-Albert, A., de la Cotte, N., Mangion, C., and Le Bris, H. (2007). Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 1167–1176.
- Griffith, J.F., Schiff, K.C., Lyon, G.S., and Fuhrman, J.A. (2010). Microbiological water quality at non-human influenced reference beaches in southern California during wet weather. *Mar. Pollut. Bull.* *60*, 500–508.
- Gromaire, M.C., Garnaud, S., Saad, M., and Chebbo, G. (2001). Contribution of different sources to the pollution of wet weather flows in combined sewers. *Water Res.* *35*, 521–533.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* *324*, 1034.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., and Andersson, D.I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* *7*, e1002158.
- Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L., and Andersson, D.I. (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio* *5*, e01918-01914.
- Guo, X., Xia, R., Han, N., and 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. *Let. Appl. Microbiol.* *52*, 667–675.
- Hagedorn, C., Robinson, S.L., Filtz, J.R., Grubbs, S.M., Angier, T.A., and Reneau, R.B. (1999). Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 5522–5531.
- Hamner, S., Tripathi, A., Mishra, R.K., Bouskill, N., Broadaway, S.C., Pyle, B.H., and Ford, T.E. (2006). The role of water use patterns and sewage pollution in incidence of water-borne/enteric diseases along the Ganges river in Varanasi, India. *Int. J. Environ. Health Res.* *16*, 113–132.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Sczesny, S., Nau, H., and Hartung, J. (2003). Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers? *Environ. Health Perspect.* *111*, 1590–1594.
- Han, X.-M., Hu, H.-W., Shi, X.-Z., Wang, J.-T., Han, L.-L., Chen, D., and He, J.-Z. (2016). Impacts of reclaimed water irrigation on soil antibiotic resistome in urban parks of Victoria, Australia. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* *211*, 48–57.
- Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., and Solomon, K. (2006). Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* *384*, 505–513.
- Harwell, M.C., Surratt, D.D., Barone, D.M., and Aumen, N.G. (2008). Conductivity as a tracer of agricultural and urban runoff to delineate water quality impacts in the northern Everglades. *Environ. Monit. Assess.* *147*, 445–462.
- Harwood, V.J., Whitlock, J., and Withington, V. (2000). Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 3698–3704.
- Hathaway, J.M., Winston, R.J., Brown, R.A., Hunt, W.F., and McCarthy, D.T. (2016). Temperature dynamics of stormwater runoff in Australia and the USA. *Sci. Total Environ.* *559*, 141–150.
- Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., and Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* *157*, 938–947.

- Hernández, A., Sánchez, M.B., and Martínez, J.L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front. Microbiol.* *2*, 22.
- Heuer, H., Schmitt, H., and Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* *14*, 236–243.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., and Kratz, K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* *225*, 109–118.
- Ho, P.T.P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D.H., Viet, P.H., and Suzuki, S. (2011). Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Sci. Total Environ.* *409*, 2894–2901.
- Huber, M., Welker, A., and Helmreich, B. (2016). Critical review of heavy metal pollution of traffic area runoff: Occurrence, influencing factors, and partitioning. *Sci. Total Environ.* *541*, 895–919.
- Ibekwe, A.M., Leddy, M., and Murinda, S.E. (2013). Potential human pathogenic bacteria in a mixed urban watershed as revealed by pyrosequencing. *PLoS One* *8*, e79490.
- Ibekwe, A.M., Ma, J., and Murinda, S.E. (2016). Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources. *Sci. Total Environ.* *566–567*, 1176–1185.
- Jiang, L., Hu, X., Yin, D., Zhang, H., and Yu, Z. (2011). Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* *82*, 822–828.
- Kay, D., Fleisher, J.M., Salmon, R.L., Jones, F., Wyer, M.D., Godfree, A.F., Zelenauch-Jacquotte, Z., and Shore, R. (1994). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. *Lancet Lond. Engl.* *344*, 905–909.
- Kay, P., Blackwell, P.A., and Boxall, A.B.A. (2004). Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environ. Toxicol. Chem.* *23*, 1136–1144.
- Kayhanian, M., Fruchtmann, B.D., Gulliver, J.S., Montanaro, C., Ranieri, E., and Wuertz, S. (2012). Review of highway runoff characteristics: comparative analysis and universal implications. *Water Res.* *46*, 6609–6624.
- Kim, S.-C., and Carlson, K. (2007). Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environ. Sci. Technol.* *41*, 50–57.
- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., and Larsson, D.G.J. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One* *6*, e17038.
- Krometis, L.-A.H., Characklis, G.W., Drummey, P.N., and Sobsey, M.D. (2010). Comparison of the presence and partitioning behavior of indicator organisms and *Salmonella* spp. in an urban watershed. *J. Water Health* *8*, 44–59.
- Kumar, P.M., and Prabhabar (2012). Physico Chemical Parameters of River Water A Review. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* *3*.
- Kumata, H., Sanada, Y., Takada, H., and Ueno, T. (2000). Historical Trends of *N*-Cyclohexyl-2-benzothiazolamine, 2-(4-Morpholinyl)benzothiazole, and other anthropogenic contaminants in the urban reservoir sediment core. *Environ. Sci. Technol.* *34*, 246–253.
- Kümmerer, K. (2009a). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* *75*, 417–434.
- Kümmerer, K. (2009b). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere* *75*, 435–441.

- Lamprea, K., and Ruban, V. (2011). Characterization of atmospheric deposition and runoff water in a small suburban catchment. *Environ. Technol.* *32*, 1141–1149.
- Lee, S.-H., and Kang, H. (2016). The activity and community structure of total bacteria and denitrifying bacteria across soil depths and biological gradients in estuary ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 1999–2010.
- Lee, L.S., Carmosini, N., Sassman, S.A., Dion, H.M., and Sepúlveda, M.S. (2007). Agricultural Contributions of Antimicrobials and Hormones on Soil and Water Quality. In *Advances in Agronomy*, D.L. Sparks, ed. (Academic Press), pp. 1–68.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., Zhang, Y., and 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.
- Liu, W.-R., Zhao, J.-L., Liu, Y.-S., Chen, Z.-F., Yang, Y.-Y., Zhang, Q.-Q., and Ying, G.-G. (2015). Biocides in the Yangtze River of China: spatiotemporal distribution, mass load and risk assessment. *Environ. Pollut. Barking Essex* *1987* *200*, 53–63.
- Lundy, L., Ellis, J.B., and Revitt, D.M. (2012). Risk prioritisation of stormwater pollutant sources. *Water Res.* *46*, 6589–6600.
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., and J J Alvarez, P. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ. Sci. Technol.* *44*, 7220–7225.
- Lye, D.J. (2009). Rooftop runoff as a source of contamination: a review. *Sci. Total Environ.* *407*, 5429–5434.
- Mallin, M.A., Williams, K.E., Esham, E.C., and Lowe, R.P. (2000). Effect of Human Development on Bacteriological Water Quality in Coastal Watersheds. *Ecol. Appl.* *10*, 1047–1056.
- Mallin, M.A., Johnson, V.L., and Ensign, S.H. (2009). Comparative impacts of stormwater runoff on water quality of an urban, a suburban, and a rural stream. *Environ. Monit. Assess.* *159*, 475–491.
- de Man, H., van den Berg, H.H.J.L., Leenen, E.J.T.M., Schijven, J.F., Schets, F.M., van der Vliet, J.C., van Knapen, F., and de Roda Husman, A.M. (2014). Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Res.* *48*, 90–99.
- Marchandin, H., Godreuil, S., Darbas, H., Jean-Pierre, H., Jumas-Bilak, E., Chanal, C., and Bonnet, R. (2003). Extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 3994–3995.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., and Jones, A.L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* *40*, 443–465.
- Meroueh, S.O., Minasov, G., Lee, W., Shoichet, B.K., and Mobashery, S. (2003). Structural aspects for evolution of beta-lactamases from penicillin-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 9612–9618.
- Meyer, M.T. (2004). Use and Environmental Occurrence of Veterinary Pharmaceuticals in United States Agriculture. In *Pharmaceuticals in the Environment*, A.P.D.K. Kümmerer, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 155–163.
- Miquel, G. (2003). Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Tome 2 (2002-2003).
- Mohanta, T., and Goel, S. (2014). Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in three different aquatic environments over three seasons. *Environ. Monit. Assess.* *186*, 5089–5100.

- Murakami, M., Nakajima, F., and Furumai, H. (2004). Modelling of runoff behaviour of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from roads and roofs. *Water Res.* *38*, 4475–4483.
- Nakayama, S., Harada, K., Inoue, K., Sasaki, K., Seery, B., Saito, N., and Koizumi, A. (2005). Distributions of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in Japan and their toxicities. *Environ. Sci. Int. J. Environ. Physiol. Toxicol.* *12*, 293–313.
- Noble, R.T., Griffith, J.F., Blackwood, A.D., Fuhrman, J.A., Gregory, J.B., Hernandez, X., Liang, X., Bera, A.A., and Schiff, K. (2006). Multitiered approach using quantitative PCR to track sources of fecal pollution affecting Santa Monica Bay, California. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 1604–1612.
- Oberlé, K., Capdeville, M.-J., Berthe, T., Budzinski, H., and 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.
- Parker, J.K., McIntyre, D., and Noble, R.T. (2010). Characterizing fecal contamination in stormwater runoff in coastal North Carolina, USA. *Water Res.* *44*, 4186–4194.
- Paule-Mercado, M.A., Ventura, J.S., Memon, S.A., Jahng, D., Kang, J.-H., and Lee, C.-H. (2016). Monitoring and predicting the fecal indicator bacteria concentrations from agricultural, mixed land use and urban stormwater runoff. *Sci. Total Environ.* *550*, 1171–1181.
- Payment, P., Waite, M., and Dufour, A. (2003). Introducing parameters for the assessment of drinking water quality.
- Piddock, L.J.V. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 629–636.
- Pruden, A., Larsson, D.G.J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K.K., Graham, D.W., Lazorchak, J.M., Suzuki, S., Silley, P., Snape, J.R., et al. (2013). Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* *121*, 878–885.
- Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du, X., Liu, X., Qiu, S., and Song, H. (2016). Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* *7*, 483.
- Rashid, I., and Romshoo, S.A. (2013). Impact of anthropogenic activities on water quality of Lidder River in Kashmir Himalayas. *Environ. Monit. Assess.* *185*, 4705–4719.
- Reano, D.C., Haver, D.L., Oki, L.R., and Yates, M.V. (2015). Long-term characterization of residential runoff and assessing potential surrogates of fecal indicator organisms. *Water Res.* *74*, 67–76.
- Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P., and Pickup, R.W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 3883–3890.
- Richardson, S.D. (2011). Disinfection By-Products: Formation and Occurrence in Drinking Water. In *Encyclopedia of Environmental Health*, (Burlington, MA), pp. 110–136.
- Roberts, P.H., and Thomas, K.V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* *356*, 143–153.
- Rooklidge, S.J. (2004). Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. *Sci. Total Environ.* *325*, 1–13.

- Rosewarne, C.P., Pettigrove, V., Stokes, H.W., and 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.
- Rossi, L., and Hari, R.E. (2007). Screening procedure to assess the impact of urban stormwater temperature to populations of brown trout in receiving water. *Integr. Environ. Assess. Manag.* *3*, 383–392.
- Salyers, A.A., Gupta, A., and Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* *12*, 412–416.
- Sandegren, L. (2014). Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups. J. Med. Sci.* *119*, 103–107.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., and Boxall, A.B.A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* *65*, 725–759.
- Sasaki, K., Harada, K., Saito, N., Tsutsui, T., Nakanishi, S., Tsuzuki, H., and Koizumi, A. (2003). Impact of airborne perfluorooctane sulfonate on the human body burden and the ecological system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *71*, 408–413.
- Sauer, E.P., Vandewalle, J.L., Bootsma, M.J., and McLellan, S.L. (2011). Detection of the human specific *Bacteroides* genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water Res.* *45*, 4081–4091.
- Schreiber, C., and Kistemann, T. (2013). Antibiotic resistance among autochthonous aquatic environmental bacteria. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* *67*, 117–123.
- Schwartz, T., Armant, O., Bretschneider, N., Hahn, A., Kirchen, S., Seifert, M., and Dötsch, A. (2015). Whole genome and transcriptome analyses of environmental antibiotic sensitive and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates exposed to waste water and tap water. *Microb. Biotechnol.* *8*, 116–130.
- Selvakumar, A., and Borst, M. (2006). Variation of microorganism concentrations in urban stormwater runoff with land use and seasons. *J. Water Health* *4*, 109–124.
- Servais, P., and Passerat, J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total Environ.* *408*, 365–372.
- Shakir, A., Chaudhry, A.S., and Qazi, J.I. (2013). Impact of anthropogenic activities on physico-chemical parameters of water and mineral uptake in Catla catla from river Ravi, Pakistan. *Environ. Monit. Assess.* *185*, 2833–2842.
- Sidhu, J.P.S., Hodggers, L., Ahmed, W., Chong, M.N., and Toze, S. (2012). Prevalence of human pathogens and indicators in stormwater runoff in Brisbane, Australia. *Water Res.* *46*, 6652–6660.
- Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., Gernjak, W., Aryal, R., McCarthy, D., Palmer, A., Kolotelo, P., and Toze, S. (2013a). Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Sci. Total Environ.* *463–464*, 488–496.
- Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., and Toze, S. (2013b). Sensitive detection of human adenovirus from small volume of primary wastewater samples by quantitative PCR. *J. Virol. Methods* *187*, 395–400.
- Silbergeld, E.K., Graham, J., and Price, L.B. (2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health* *29*, 151–169.

- Song, J.S., Jeon, J.H., Lee, J.H., Jeong, S.H., Jeong, B.C., Kim, S.-J., Lee, J.-H., and Lee, S.H. (2005). Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *J. Microbiol. Seoul Korea* *43*, 172–178.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., and Ploy, M.-C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* *3*, 119.
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., and Ploy, M.-C. (2014). Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* *8*, 768–777.
- Stokes, H.W., and Gillings, M.R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* *35*, 790–819.
- Sugiyama, M., Shiogama, H., and Emori, S. (2010). Precipitation extreme changes exceeding moisture content increases in MIROC and IPCC climate models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 571–575.
- Thurston-Enriquez, J.A., Gilley, J.E., and Eghball, B. (2005). Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. *J. Water Health* *3*, 157–171.
- Turiel, E., Martín-Esteban, A., and Tadeo, J.L. (2006). Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. *Anal. Chim. Acta* *562*, 30–35.
- United States Environmental, and Protection Agency (2015). Recreational water quality criteria.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol. Rev.* *38*, 761–778.
- Walker, M.S., and Walker, J.B. (1970). Streptomycin biosynthesis and metabolism. Enzymatic phosphorylation of dihydrostreptobiosamine moieties of dihydro-streptomycin-(streptidino) phosphate and dihydrostreptomycin by *Streptomyces* extracts. *J. Biol. Chem.* *245*, 6683–6689.
- Wang, H., Pryor, M.A., Edwards, M.A., Falkinham, J.O., and Pruden, A. (2013). Effect of GAC pre-treatment and disinfectant on microbial community structure and opportunistic pathogen occurrence. *Water Res.* *47*, 5760–5772.
- Wang, Q., Mao, D., Mu, Q., and Luo, Y. (2015). Enhanced horizontal transfer of antibiotic resistance genes in freshwater microcosms induced by an ionic liquid. *PLoS One* *10*, e0126784.
- West, B.M., Liggitt, P., Clemans, D.L., and Francoeur, S.N. (2011). Antibiotic Resistance, Gene Transfer, and Water Quality Patterns Observed in Waterways near CAFO Farms and Wastewater Treatment Facilities. *Water, Air, Soil Pollut.* *217*, 473–489.
- WHO (2015). Progress on sanitation and drinking water - 2015 update and MDG assessment.
- Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., and 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.
- Yan, S., and Song, W. (2014). Photo-transformation of pharmaceutically active compounds in the aqueous environment: a review. *Environ. Sci. Process. Impacts* *16*, 697–720.
- Yan, C., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Nie, M., Shi, H., and Gu, L. (2013). Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: occurrence, distribution and risk assessment. *Environ. Pollut. Barking Essex* *1987* *175*, 22–29.
- Yang, S., and Carlson, K. (2003). Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Res.* *37*, 4645–4656.

Yang, J.-F., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Tao, R., Su, H.-C., and Liu, Y.-S. (2011). Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers, China. *J. Environ. Sci. Health B* 46, 272–280.

Yang, L.-H., Ying, G.-G., Su, H.-C., Stauber, J.L., Adams, M.S., and Binet, M.T. (2008). Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1201–1208.

Zeng, T., Glover, C.M., Marti, E.J., Woods-Chabane, G.C., Karanfil, T., Mitch, W.A., and Dickenson, E.R.V. (2016). Relative Importance of Different Water Categories as Sources of N-Nitrosamine Precursors. *Environ. Sci. Technol.* 50, 13239–13248.

Zhang, T., and Li, B. (2011). Occurrence, Transformation, and Fate of Antibiotics in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 951–998.

Zhang, S., Pang, S., Wang, P., Wang, C., Han, N., Liu, B., Han, B., Li, Y., and Anim-Larbi, K. (2016a). Antibiotic concentration and antibiotic-resistant bacteria in two shallow urban lakes after stormwater event. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 9984–9992.

Zhang, X.-H., Xu, Y.-B., He, X.-L., Huang, L., Ling, J.-Y., Zheng, L., and Du, Q.-P. (2016b). Occurrence of antibiotic resistance genes in landfill leachate treatment plant and its effluent-receiving soil and surface water. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 218, 1255–1261.

B. Partie expérimentale

Dans la synthèse bibliographique nous avons montré les enjeux de santé associés à la résistance aux antibiotiques avec la nécessité de considérer cette problématique dans sa globalité. Cette vision globale, dite « One Health » intègre les questions de santé au niveau des populations humaines, des populations animales et de l'environnement. La diversité des écosystèmes et des conditions environnementales nécessite une exploration diversifiée des réservoirs environnementaux de la résistance aux agents antimicrobiens. Nous avons ainsi montré dans une revue de littérature que l'environnement urbain et les eaux de ruissellement sont relativement peu explorés pour la résistance aux antibiotiques malgré de nombreuses données sur la qualité chimique de ces eaux qui incitent à prolonger les recherches en ce sens.

Les écosystèmes urbains sont peuplés par une forte densité humaine et sont donc, pour l'homme, des lieux majeurs d'exposition aux risques chimiques mais aussi microbiologiques. La ville de Montpellier et ses cours d'eaux urbains nous donnent un cadre d'étude de la dynamique des communautés bactériennes résistantes dans des rivières urbaines plus ou moins influencées par le voisinage d'un hôpital. Ces rivières coulent dans un bassin versant limité à proximité d'une zone karstique en amont et de lagunes côtières en aval.

Notre approche de la résistance des communautés n'est pas basée sur une métagénomique globale mais plutôt sur des approches mixtes permettant une caractérisation phénotypique de la résistance des communautés à des fins, essentiellement, de comparaison avec ce qui est observé en médecine humaine.

La partie expérimentale de ce travail est soutenue par la mise au point d'une approche mixte originale qui permet une évaluation globale du niveau de résistance aux antibiotiques dans les communautés bactériennes sans isolement des partenaires. La détermination de la *community-Inhibitory Concentration* (c-IC) aux antibiotiques permet secondairement la description de la richesse taxonomique des communautés résistantes. Nous avons testé cette approche sur les eaux naturelles de la région de Montpellier dans un lac d'eau douce peu anthropisé (Le Salagou), dans un fleuve côtier en zone urbaine (Le Lez) et dans une lagune côtière d'eau saumâtre (L'Etang de l'Or). Cette approche relativement simple nous a apporté des informations sur les communautés résistantes dans les eaux de surface, sur le risque infectieux éventuellement associé et sur la vulnérabilité de chaque communauté bactérienne vis-à-vis d'une exposition aux antibiotiques.

Ces résultats concluants nous ont conduits à utiliser cette approche mixte avec quelques modifications pour répondre à l'objectif de cette thèse sur l'étude de la dynamique des

communautés bactériennes résistantes dans des rivières urbaines pouvant être influencée par un ruissellement provenant d'une zone hospitalière. Afin d'argumenter comparativement notre objectif principal, la détermination des c-Cl a aussi été appliquée à l'étude de la dynamique des communautés bactériennes résistantes dans les sources karstiques en amont de la ville

**1. Mise au point et évaluation d'une méthode mixte d'exploration
de l'antibiorésistance environnementale**

Effects of antibiotics on abundance and richness of cultivable bacterial communities from surface waters

Ayad Almakki^{1,2}, Kevin Estèves¹, Audrey S. Vanhove¹, Thomas Mosser¹, Fabien Aujoulat¹, Hélène Marchandin^{1,3}, Mylène Toubiana¹, Patrick Monfort¹, Estelle Jumas-Bilak^{1,4} and Patricia Licznar-Fajardo^{1,4§}

¹Equipe "Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements", UMR 5569 HydroSciences Montpellier, Université de Montpellier, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, France

² Department of clinical laboratory science, College of pharmacy, University of Basrah, Iraq

³ Département de Bactériologie-Virologie, CHRU Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 Av. du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France

⁴ Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU Montpellier, Hôpital St Eloi, 80 Avenue Augustin Fliche, 34090 Montpellier, France

[§] Corresponding author: Dr Licznar-Fajardo Patricia, email: patricia.licznar-fajardo@umontpellier.fr

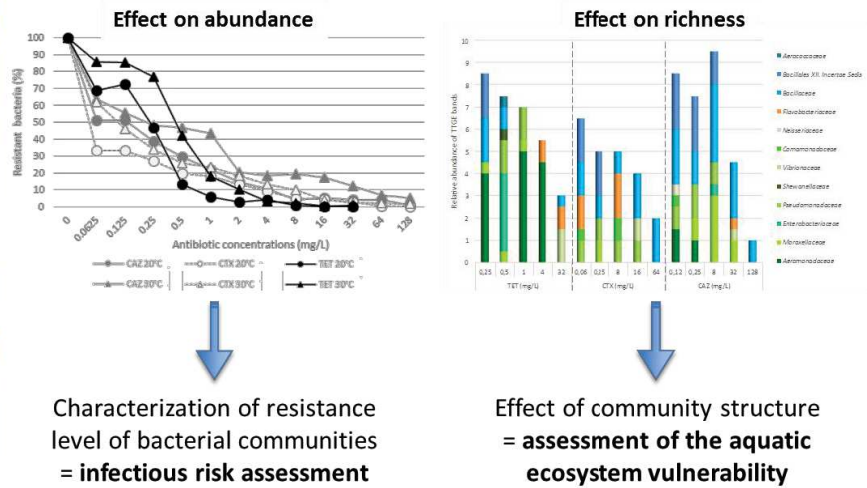
Has been submitted to Science of the Total Environment: resubmission in process

Graphic abstract



3 types of surface water

1 method to evaluate and compare the effect of antibiotics on cultivable bacterial communities



Highlights

c-IC describes the behavior of bacterial communities facing ATB pressure

c-IC helps to evaluate the vulnerability of aquatic ecosystems regarding to ATBs

c-IC helps to evaluate the environmental infectious hazard associated to ATB resistance

Abstract

New-generation sequencing methods are efficient to explore the resistome in ecosystems but links to phenotypic resistance parameters are hardly established. To survey the effect of antibiotics on abundance and diversity of cultivable bacteria in communities from water samples, we developed an original method that combines determination of community Inhibitory Concentration (c-IC) of antibiotics (ATB) and description of the taxonomic richness among resistant bacteria.

Water sampled from De l'Or brackish lagoon, Lez-River and Salagou-Lake (South of France) was cultured in different conditions and on media containing various concentrations of tetracycline, cefotaxime or ceftazidime. Bacterial abundance and concentrations of antibiotics decreasing by 50% and 90% the cultivable community (c-IC₅₀ and c-IC₉₀, respectively) were determined. The repertory of Operational Taxonomic Units (OTUs) cultivable in presence of various concentrations of antibiotics was established by sequencing of partial 16S rRNA gene after separation by Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) fingerprinting. Temperature and salinity influenced the abundance of cultivable bacteria in presence of ATBs and hence the c-ICs. Very low ATB concentrations can decrease markedly bacterial abundance. The comparison of c-IC₅₀ and c-IC₉₀ with concentrations used for clinical categorization showed that some sub-populations persisted at ATB concentrations over the clinical breakpoint predictive of therapeutic resistance.

Thirty-three OTUs belonging to *Proteobacteria* (56%), *Firmicutes* (17%), *Bacteroidetes* (17%) and *Actinobacteria* (10%) were detected. Beside scarce ubiquitous genera, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Vibrio*, most OTUs were specific of a type of water. In freshwater, antibiotic selective pressures modified the bacterial community structure with the selection of taxa including human pathogens like *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* and *Aeromonas*. In brackish water, OTUs were more diverse and community structure less vulnerable to antibiotics.

In conclusion, c-IC determination combined to taxonomic richness description is a useful tool to characterize resistant bacterial communities and thereby to evaluate the vulnerability of aquatic ecosystem to antimicrobial pressures.

Keywords: bacterial communities; natural waters; antibiotics; community inhibitory concentration; taxonomic richness; selective pressure

1. Introduction

At the 'omics' era, metagenomic methods approach the stock and/or the bulk expression of antibiotic (ATB) resistance genes at the community level (Amos et al., 2014; Kristiansson et al., 2011; Marti et al., 2014; Port et al., 2014; Schlüter et al., 2008; Szczepanowski et al., 2008). These culture-independent tools have demonstrated the huge diversity of resistance genes and encoded mechanisms, which form the environmental resistome. In medicine, resistance to ATBs is a bacterial behaviour observed *in vitro* as a resistant phenotype, which is predictive of patient treatment failure. Resistant phenotypes are defined by comparison of Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) with thresholds, so called clinical breakpoints, edited by expert committees for each ATB and bacterial type. Environmental studies would benefit from the phenotypic evaluation of resistance to ATB allowing comparison with medical studies that generally express resistance by the used of concentration parameters (w/v) (Brauner et al., 2016; Rizzo et al., 2013).

Regarding environmental bacteria, *in vitro* studies of ATB resistant phenotypes are generally performed on isolated colonies of well-known pathogenic species (Maravić et al., 2012; Okoh and Igbinosa, 2010; Ramírez Castillo et al., 2013). Studies on isolated environmental autochthonous non-pathogenic bacteria are scarcer (Schreiber and Kistemann, 2013; Varela et al., 2016; Vaz-Moreira et al., 2011) and the effects of antimicrobials on the whole cultivable communities are even less studied (Varela et al., 2014; Weber et al., 2011). This urges the need for indicators or parameters that could predict the behaviour of microbial communities facing antimicrobial constraints. These parameters should help to evaluate the vulnerability of ecosystems and the potential risks associated with human exposure to environmental antibiotic resistant bacteria. In this context, aquatic environments are of particular interest because they are involved in the dispersal of xenobiotics and xenobiotics-resistant bacteria and also in the mix of genes and microorganisms from diverse origins (Baquero et al., 2008; Gaze et al., 2013).

The aim of this study was to develop an original approach combining the determination of community Inhibitory Concentrations (c-IC) of antibiotics and taxon richness evaluation to evaluate

the effects of antibiotics on cultivable bacterial communities in waters. The convenience and efficiency of the method were tested on three different types of natural surface waters.

2. Material and methods

2.1. Study area, water sampling and processing

Three sampling sites were selected based on situations of contrasted anthropization in the Montpellier area, an urban agglomeration of about 400.000 inhabitants located in the coastal basins of the Mediterranean sea Gulf of Lion, South of France. Montpellier city (about 264.000 inhabitants) is located in a small watershed that flows towards the Lez River. This coastal river of 13 km runs through the city and the De l'Or coastal brackish lagoon before emptying into Mediterranean Sea. Upstream the Lez watershed, in the piedmont of Cévennes, Salagou Lake is weakly anthropized compared to Lez River and De l'Or coastal lagoon.

Freshwaters were sampled from the Lez River (43.570878, 3.897733), from the Salagou Lake (43.654424, 3.384781) and from *De l'Or* Lagoon (43.554166, 3.970255).

The three sites were sampled one-time. Water samples (1 L) were collected in sterile glass bottles, 30 cm under the water surface in April. Samples were transported in coolers to the laboratory and processed within 4 h after collection. One milliliter was filtered through 0.45 micron-pore-size cellulose sterile filters (Sartorius, Germany) using a vacuum filter apparatus and filters were placed on selective or non-selective media. Samples were then diluted 10 fold and 100 fold before plating 100 µL, in triplicate, on non-selective media for total cultivable community assessment.

2.2. Determination of community Inhibitory Concentrations (c-IC) of antibiotics

For every water sample, the c-IC was determined by plating the filter and 100 µL of the bacterial community suspensions (non-diluted, diluted 10 and 100 fold) on trypticase soy agar (TSA, Difco laboratories, USA) containing one concentration (two fold dilutions) of every tested ATB: cefotaxime (CTX, from 128 to 0.0625 mg/L), ceftazidime (CAZ, from 128 to 0.0625 mg/L) and tetracycline (TET,

from 32 mg/L to 0.0625 mg/L). For brackish water, c-ICs were also determined onto marine agar (19.45 g/L of NaCl) (MA, Difco laboratories, USA) culture media, supplemented with the same antibiotics and same concentrations.

For each medium and each antibiotic, a set of plates was incubated for 48 h at 20 °C, another set being incubated for 48 h at 30 °C. Colonies were then counted and the number of Colony Forming Units (CFU) was used for the determination of c-IC₅₀ and c-IC₉₀, which correspond to the antibiotic concentration inhibiting 50 % and 90 % of the total cultivable community (CFU counted on media without ATB), respectively. Clinical breakpoints corresponding to clinical resistance were from the 2013 recommendations of the Committee of the Antibiogram of the French Society of Microbiology (CA-SFM, 2013): 2 mg/L for CTX and 8 mg/L for CAZ and TET

2.3. 16S rDNA PCR- Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE)

Bacterial DNA was extracted from the bulk growing colonies harvested from TSA and MA media by an enzymatic method (MasterPure Gram positive DNA purification kit, Epicentre, France) according to the manufacturer's recommendations. DNA extracts were used as a template to amplify the V3 variable region of the 16S rRNA gene using the primers HDA1GC-HDA2 (Ogier et al., 2002). TTGE migration was performed as already described (Michon et al., 2010).

For community analysis, TTGE bands were compared to diversity ladders or sequenced. Three diversity ladders, each corresponding to the Salagou Lake, Lez River or De l'Or Lagoon community, were constructed as described (Roudière et al., 2009). Briefly, each colonial morphotype observed on culture media plates was identified at the species level by sequencing the nearly complete 16S rRNA gene. The V3 region was then amplified for each species as described above and the different V3 amplicons mixed to construct the diversity ladder. A TTGE ladder was loaded on every TTGE migration gel allowing the assignation of TTGE bands obtained for analyzed samples to a bacterial taxon in case of identical migration distances.

For sequencing, TTGE bands were excised from the TTGE gel and washed twice in sterile water. DNA eluted in 10 mM Tris buffer (pH 8.5) was used as a template to amplify the V3 region with the primers HDA1-HDA2 (200 bp) (Ogier et al., 2002) and the PCR conditions described above. PCR products were checked by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel and sequenced on an ABI 3730xl sequencer (Cogenics, UK). Sequences were compared to GenBank and RDP11 databases (Cole et al., 2014) for affiliation to a genus-level Operational Taxonomic Unit (OTU) considering the phylotaxonomic frame surrounding the OTU in RDP11. The crude taxonomic diversity index (DI) corresponded to the number of different bands per TTGE profile.

2.4. Statistical analyses

Data were analyzed using R software available at <http://www.R-project.org> and R package FactoMineR (Husson et al., 2008). Normality of distributions and equality of standard deviations were tested using Shapiro-Wilk and Fisher tests respectively. Student and Mann-Whitney tests were used to define statistical significant differences.

3. Results

3.1. Influence of culture conditions and ATBs on the abundance of the cultivable communities

With the aim to explore bacterial community resistance to 3 ATBs, we used 74 growth conditions for freshwater (TSA medium without or with various antibiotic concentrations, two incubation temperatures) and 148 growth conditions for brackish water analysis (same 74 conditions as for freshwater samples for TSA medium and MA medium). The abundance of cultivable bacteria determined with TSA medium without antibiotic was higher in Lez River than in Salagou Lake water ($1.35 \times 10^3 \pm 2.97 \times 10^2$ CFU/mL vs $2.75 \times 10^2 \pm 1.10 \times 10^2$ CFU/mL respectively) while similar in Lez River and De l'Or Lagoon waters ($2.15 \times 10^3 \pm 9.21 \times 10^2$ CFU/mL in Lagoon water). Despite NaCl in the MA medium led to the selection of halotolerant/halophilic cultivable bacteria, the abundance of growing bacteria ($3.37 \times 10^3 \pm 2.09 \times 10^3$ CFU/mL) was not significantly different than that observed

on TSA medium ($p > 0.05$). For every sample, there was no significant difference between the counts of cultivable bacteria after an incubation at 20 °C or 30 °C ($p > 0.05$) (inserts in Fig. 1).

The bacterial communities were then tested for growth at 20 °C and 30 °C onto media containing increasing concentrations of cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) or tetracycline (TET). We generally observed a decrease in CFU number related to the increase of ATB concentration, suggesting the overall susceptibility of the bacterial communities to the 3 ATBs tested (Fig. 1). The abundance of cultivable bacteria in presence of ATBs varied according to the type of water and to the culture conditions (ATB type and concentration, incubation temperature and NaCl presence).

For freshwater samples (Fig. 1A and B), the curves of abundance displayed roughly similar appearances for every temperature and ATB. Bacteria growing at 30 °C were more resistant to CAZ, CTX and TET compared with bacteria growing at 20 °C in most of the conditions tested but the differences were not statistically significant ($p > 0.1$). In brackish water sample, the resistance of the bacterial community to CAZ and TET was particularly marked compared to freshwater samples (Fig. 1C and D). For CTX, the appearance of abundance curves was roughly similar between brackish water and freshwater samples.

According to the presence of NaCl in the culture medium (TSA or MA), significant differences in the amount of bacteria resistant to TET or CAZ were observed ($p = 0.0119$ and $p < 0.0001$, respectively) (Fig. 1C and D), in contrast to the curve shape of abundance of CTX-resistant-bacteria that appeared unaffected by NaCl concentration ($p = 0.3012$). The halotolerant/halophilic community growing onto MA was more resistant to TET than the community growing onto TSA medium. The proportion of bacterial communities growing from lagoon water on TSA and resistant to TET, CAZ or CTX was not statistically different according to the temperature of incubation ($p = 0.6501$, $p = 0.9085$ and $p = 0.9548$, respectively). At the contrary, the halophilic/halotolerant community that grew from lagoon water on MA at 20 °C was more resistant to low CAZ concentrations than that growing at 30 °C (Fig. 1D) ($p = 0.00357$) whereas an inverse tendency was observed for TET resistance (higher resistance for community growing at 30 °C than community growing at 20 °C, $p = 0.0315$). As observed for all

communities grown on TSA communities, the resistance to CTX of the MA growing community appeared unaffected by the temperature of incubation ($p = 0.9492$).

Overall, we demonstrated the influence of environmental growing conditions on the amount of bacteria resistant to antibiotics within cultivable water communities.

3.2. Assessment of resistance level of the cultivable bacterial community by the determination of $c\text{-IC}_{50}$ and $c\text{-IC}_{90}$

We then determined 2 parameters to characterize resistance level of the cultivable community: $c\text{-IC}_{50}$ and $c\text{-IC}_{90}$, in mg/L, *i.e.* antibiotic concentrations inhibiting 50 % and 90 % of the bacterial community, respectively. In 15 cases among 24 conditions, low concentrations of ATBs (0.06 to 0.250 mg/L) could inhibit the growth of half of the bacterial community ($c\text{-IC}_{50}$, Fig. 2), particularly for CTX. However, concentration that inhibited 90% of the community ($c\text{-IC}_{90}$) was markedly higher and ranged from 0.5 to 64 mg/L.

For the two freshwater samples, $c\text{-ICs}$ were in the same order of magnitude and varied similarly according to growth temperature with, generally, bacteria growing at 30 °C displaying higher $c\text{-IC}$ values than communities growing at 20 °C (Fig. 2). An exception was the Salagou Lake community growing at 20 °C that displayed CTX $c\text{-IC}_{90}$ at 8 mg/L, higher than that at 30 °C (1 mg/L).

Communities collected from the brackish lagoon (halophilic/halotolerant or total, growing at 20 °C or at 30 °C) presented more contrasted resistance profiles than freshwater communities according to the growing conditions (NaCl concentration and temperature). In some cases the resistance level was markedly higher than observed in freshwaters. For instances, $c\text{-IC}_{90}$ of CAZ for TSA-growing community could not be determined because it exceeded 128 mg/L. The $c\text{-IC}_{90}$ of TET for halotolerant/halophilic community was also over the highest tested concentration, *i.e.*, 32 mg/L at 20 °C (Fig. 2).

The determination of $c\text{-IC}_{50}$ and $c\text{-IC}_{90}$ allows comparison of resistance assessed in environmental communities with clinical resistance defined as MIC values exceeding clinical breakpoints. In 7

conditions on 16, the c-IC₉₀ reached or overpassed clinical breakpoints (Fig. 2). In freshwaters, the c-IC₅₀ and c-IC₉₀ of TET were under the clinical breakpoint (8 mg/L) whereas c-IC₉₀ of CTX are close or overpass CTX clinical breakpoint (2 mg/L). More than 10 % of the freshwater community growing at 30°C resist to a CAZ concentration greater than or equal to clinical breakpoint (8 mg/L). For brackish water, concentrations necessary to inhibit more than 10 % of the halotolerant/halophilic community are close to or greater than clinical breakpoints, whatever the tested antibiotic.

3.3. Taxonomic diversity in antibiotic resistant cultivable communities

We established by 16S rDNA PCR-TTGE fingerprinting the repertory of OTUs among the community growing in presence of ATBs, in every culture conditions. The ATB concentrations studied corresponded to those inducing changes in the shape of curves describing the evolution of community abundance according to ATB concentrations in Figure 1.

The crude taxonomic diversity index (DI) ranged from 1 to 16 in the river water, from 2 to 9 in the lake water and from 0 to 12 in the lagoon water (Table A.1). In almost all culture conditions for river bacterial communities and TSA lagoon communities, we observed the decrease of DI from the lowest antibiotic concentration to the highest as predicted from the decrease of community abundance observed in Figure 1. But in several cases, particularly for lagoon community on MA medium, the increase of ATB concentrations led to a higher DI (Table A.1). It is to note that the DI dynamics was not linear with often an increase of DI with increasing concentrations of antibiotics and then a decreased when maximal antibiotic concentration was reached. This suggests that minority resistant populations were detected only if a selective pressure was exerted on the whole community.

The affiliation of a band to a taxon was achieved for 645 TTGE bands (79.2 %) out of the 814 observed in our experiments, either by sequencing or by comparison with diversity ladders. The taxonomic diversity of ATB resistant bacteria corresponded to a total of 33 genera (including 5 unidentified genera in *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*) and 4 phyla: *Proteobacteria* (56 %), *Firmicutes* (17 %), *Bacteroidetes* (17 %) and *Actinobacteria* (10 %) (Table 1).

The distribution of genera according to the type of water showed that 16 genera were detected in every sample, river, lake and lagoon (Fig. 3A). Only 4 genera, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Vibrio* were common to all samples (Fig. 3A). Only one other genus, *Rheinheimera*, was shared between freshwater (lake but not river) and brackish water. Finally most genera (22/33) were specific to a type of water: 11 for lagoon, among them, the genus *Roseivirga* was found specifically in halophilic/halotolerant conditions (MA) and *Brevundimonas* and *Azomonas* in non-halophilic conditions (TSA) (Table 1). Seventeen genera were specifically encountered in freshwaters (6 in river, 5 in lake, and 6 in both) (Table 1 and Fig. 3A).

The distribution of genera according to their antimicrobial resistance showed that the genera resistant to CTX only were scarce (n = 2) and that, CTX-resistant genera were generally also CAZ-resistant (n = 16) (Fig. 3B). Cross-resistance between the cephalosporins (CTX and CAZ) and TET was observed for 12 genera compared to 4 genera displaying resistance to TET and CAZ and 2 genera resistant to TET and CTX (Table 1 and Fig. 3B). Genera displaying a cross-resistance to the 3 ATBs (Table 1 and Fig. 3B) were *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Cellulophaga*, *Marinibacillus* and *Microbacterium* from lagoon sample and were *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Bacillus* and *Exiguobacterium* from river sample. For lake water, *Bacillus* was the only genus resistant to the 3 ATBs. All Alpha and Beta-proteobacteria found in this study (*Brevundimonas*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Comamonas*) were detected only when a cephalosporin was added to the culture medium (even with very low concentration (0.06 mg/L) of CTX, Table A.1.), suggesting that they are minority in communities without this selective pressure (Table A.1). CTX-resistance was observed for 4 genera in 4 families in lake water community while more widely distributed among river water bacteria (9 genera in 8 families) and lagoon water bacteria (14 genera in 12 families) (Table 1). Most genera with isolated TET-resistance belonged to Gamma-Proteobacteria.

3.4. Dynamics of the taxonomic richness according to antibiotic concentration

The abundance of every bacterial family varied according to ATBs and their concentrations (Fig. 4). The overall dynamics of community profiles was quite different in freshwater (lake and river) and in brackish (lagoon) water. In the latter, families were more diverse and stable whatever the concentration of antibiotic (Fig. 4).

Depending on the antibiotic concentration, some families became dominant until being the sole representative of the cultivable bacterial community. It is mainly the case for *Bacillaceae* in freshwaters in presence of the highest concentrations of cephalosporins. Several other families dominated the community for a range of ATB concentrations and then decreased for highest concentrations. This tendency was particularly observed for *Moraxellaceae* in Salagou Lake water community submitted to CTX selective pressure and for *Aeromonadaceae* in Lez River under TET pressure (Fig. 4B and A, respectively). At last, several minority families were detected only when a selective pressure was exerted. It was noteworthy that *Vibrionaceae* were selected in Lez River water at high ATB concentrations (Fig. 4A).

The phylum *Proteobacteria* (green and maroon in Fig. 4) displayed the wider diversity of families in the 3 types of water. The main proteobacterial families presented a certain degree of specificity considering water origin and ATB pressure. *Moraxellaceae* (mainly the genus *Acinetobacter*) dominated lake water community under CTX pressure while *Enterobacteriaceae* and *Aeromonadaceae* were majority under TET pressure (Fig. 4B). The two latter families also dominated river water community under TET pressure (Fig. 4A). However, the river community was more diversified than the lake community with a wider representation of members of the phylum *Firmicutes* (blue in Fig. 4A and B) beside *Proteobacteria*. *Firmicutes*, mainly the order *Bacillales*, were particularly selected by CAZ in river and lake waters (Fig. 4A and B). In the brackish lagoon water, the dominant family was *Pseudomonadaceae* whatever the selective pressure, with a higher susceptibility to CAZ than to TET and CTX. The lagoon water presented the wider family diversity with an overall persistence of taxon diversity when the concentration of ATBs increased. Indeed, the

constant detection of *Bacteroidetes* was a particularity of lagoon water. It was also the case for members of the family *Microbacteriaceae* in the phylum *Actinobacteria*, except for two conditions (Fig. 4C).

In conclusion, the structure of bacterial communities in freshwater samples were disrupted by ATBs while communities from brackish water appeared less vulnerable (Fig. 4). Moreover, it was noteworthy that families of major interest in human and animal infectiology like *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* (*Acinetobacter*), *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* became dominant after exposition to ATB, even at low concentration.

4. Discussion

We presented a preliminary report that tested an original approach to assess quantitatively (c-IC₅₀ and c-IC₉₀, diversity) and qualitatively (taxonomic richness) the effect of ATBs on bacterial communities from surface natural waters. While there are numerous reports about the microbial community in marine waters and sediments, freshwater and brackish communities have been globally overlooked (Wang et al., 2012). Nevertheless, among aquatic environments, coastal rivers and lagoons are considered as major integrator ecosystems (Aliaume et al., 2007).

Facing powerful metagenomic tools (Walsh et al., 2011; Xiong et al., 2015), culture-based studies are disregarded to explore bacterial communities, particularly because they are unable to decipher the uncultivable microbial reservoir. Today in water microbiology, culture-based approaches are frequently restricted to the count of indicator microorganisms (Rizzo et al., 2013). However, culture exhibits several specific advantages because phenotypic susceptibility to antimicrobials is until now a major medical parameter (Köser et al., 2014), which is predictive of treatment efficiency and clinical evolution. The prevalence of resistance genes assessed by culture-independent methods (Walsh et al., 2011; Xiong et al., 2015) does not allow further characterization of the strains harboring resistance genes. Furthermore, the minority populations are missed when sequence-based

techniques are used (Lagier et al., 2012) but they could be of utmost importance because under selective pressure, they can become dominant and therefore be of major concern in human health. Culture-based studies of water bacterial communities are generally focused on fecal bacteria or bacteria known as human pathogens, which are generally allochthonous in aquatic systems. However, every bacterium in an ecosystem can be involved in the spread of resistance genes, acting either as a reservoir or as a vector (Baquero et al., 2008). The approach developed in this study leads to the determination of the antibiotic concentration inhibiting a given percentage of the whole cultivable bacterial community, a parameter named inhibitory concentration of the whole cultivable community (c-IC). Hence, culture conditions are critical and probably the major expected bias of the approach. We observed that physical and chemical conditions influenced the abundance of cultivable bacteria in presence of ATBs and thus the c-ICs. This indicated that preliminary studies involving a wide range of culture conditions are necessary on each type of water sample in order to cover most of the growth requirements of the bacteria present in the community. Culture conditions could also be chosen to mimic as closely as possible the environmental conditions and/or to answer to relevant scientific questions. We focused on very simple parameters such as temperature and salinity, and showed that these culture conditions influenced differently the results according to the origin of the water. Development of culturomics approaches could be of great interest to enlarge the repertory of cultivable bacteria from diverse water samples (Diop et al., 2016).

The study focused on the effect of 3 ATBs on the cultivable communities in natural waters. TET is one of the more prevalent and persistent ATB in environments that have been measured in different environmental compartments (Tello et al., 2012). Published TET concentrations range from 0.42 µg/L in surface water to 66 mg/L in liquid manure, 73 µg/L in river sediments, and 443 µg/L in farmed soil (Tello et al., 2012). These concentrations are above MIC₅₀ values for 0.002 %, 1.6 %, 15 % and 99 % of studied bacterial genera, respectively (Tello et al., 2012). By c-IC determination, we found that 125 µg/L of TET inhibited 50 % of the community abundance in the Lez River water, which is roughly concordant with the data of Tello et al. (2012). Assays in mesocosm showed that the local release of

TET (5 mg/L) had a very small effect on the development of antibiotic resistance (Atoyan et al., 2007). Moreover, studies on a river near Taipei city, Taiwan (Yang et al., 2014) or on an urban wastewater treatment plant (Novo et al., 2013) showed rare resistant bacteria (defined as resistant to 8 mg/L of TET, the clinical breakpoint used in our study) as observed herein by determination of c-IC₅₀ and c-IC₉₀. The method developed in this study gave additional data by approaching the effect of ATBs on the whole communities. Hence, we observed a marked effect of TET below 1 mg/L on the freshwater community structures with the selection of potential pathogens, i.e., a community disequilibrium in favor of enterobacteria and aeromonads.

CTX and CAZ are third-generation cephalosporins involved in the emergence of enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) (Paterson and Bonomo, 2005). Adding CTX or CAZ in culture media is particularly efficient to select ESBL-producing bacteria *in vitro* and is commonly used in clinical microbiology to detect such multiresistant strains in hospitalized patients (Rawat and Nair, 2010). Occurrence and concentrations of cephalosporins in the environment are scarcely studied compared with other ATBs such as tetracycline or fluoroquinolones. However, cephalosporins were identified in the influent and effluent of a local wastewater treatment plant at ng/L–µg/L level (Wang et al., 2011). In addition, CAZ was found in surface water at a concentration of 0.75–2.60 µg/L (Wang et al., 2011). CTX concentrations exceeding 1 mg/L were detected in sewage water in Hong Kong and Shenzhen (Gulkowska et al., 2008). The authors considered that such concentrations could select ESBL-producing bacteria (Gulkowska et al., 2008; Wang et al., 2011). Herein, we showed that residual concentrations of CTX from 0.0625 to 0.5 mg/L have a marked influence both on the abundance and on the community structure of cultivable bacteria in freshwaters. Moreover, growth with CTX selected potential pathogens such as *Acinetobacter* spp. (*Moraxellaceae*) resisting to 2 mg/L of CTX (clinical breakpoint for resistance). *Pseudomonas* isolates resistant to CAZ were recovered in the 3 types of water studied. This resistance defines multidrug resistance in the genus *Pseudomonas* and is a major cause of treatment failure, mainly in the context of healthcare-associated infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver et al., 2015).

The 3 ATBs tested revealed the selection of genera with potential impact on human infectious diseases. Species-level identification, not achieved by the 16S rRNA gene fingerprinting approach, would be necessary to assess more precisely the infectious risk associated with the resistant genera selected in natural waters. Coupling c-IC determination with species identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry could be a valuable improvement of the method (Sala-Comorera et al., 2016).

Beside data on clinically relevant ATB resistances in natural surface waters, the c-IC determination provides pieces of information about ecosystem vulnerability. As expected, the increase of antibiotic concentrations led to the decrease of bacterial abundance that was not always associated with a decrease of the taxonomic richness as observed for the *De l'Or* Lagoon water. The overall resistance of the brackish water community in term of abundance was indeed combined with a rather stable community structure encompassing the 4 phyla detected in this study. Most genera were probably autochthonous of the lagoon ecosystem (Clementino et al., 2008; Esteves et al., 2015), including *Pseudomonas* and *Vibrio*, which are potentially pathogenic for human and other animals. This relatively low vulnerability to antibiotic exposure suggests that *De l'Or* Lagoon water is probably a reservoir for resistant bacteria and resistance genes. The fact that low ATB concentrations decreased the abundance but not the taxonomic richness was rather paradoxical. One hypothesis is that every OTU identified up to genus level corresponded to a heterogeneous population, grouping variants that display diverse behaviors against antimicrobial agents. Such as diversity confers an “insurance effect” to the population by increasing the range of conditions in which the community as a whole can thrive (Boles et al., 2004). In contrast, for freshwaters from the Lez River and the Salagou Lake, various selective pressures (ATB types and concentrations) jumbled the bacterial community structures. The changes observed consisted in the selection of dominant OTUs, which were mainly known human pathogens like *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* and *Aeromonas*. The communities appeared more vulnerable with a potential association with infectious hazard. Despite the Lez River and the Salagou Lake differ in term of anthropic imprints, quantitative and qualitative

resistances were roughly similar. However, in presence of antibiotics, resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* were mostly selected in the lake water, which is less anthropized than the river water.

5. Conclusion

New concepts of resistome and pathobiome (D'Costa et al., 2006; Perry et al., 2014; Romano-Bertrand et al., 2015; Vayssier-Taussat et al., 2014) stress the importance of microbial communities in diverse aquatic environments as “incubators” for resistant bacteria that can be later involved in human infectious diseases. Environmental microbiology studies would benefit from the evaluation of antibiotic resistance by c-IC determination in order: i) to characterize bacterial communities and compare their overall behavior facing antibiotic pressure, ii) to compare results with medical data such as clinical breakpoint for resistance and epidemiology of resistant / multiresistant bacteria, thereby evaluating the environmental infectious hazard, and iii) to evaluate the vulnerability of aquatic ecosystems regarding antimicrobial effects, to more precisely characterize resistant members among these ecosystems and to study the influence of local constraints on the resistome design. Finally, c-IC determination can be easily adapted to monitor emerging resistances in the environment, such as carbapenemase-producing enterobacteria (Woodford et al., 2014).

Acknowledgements

This work was supported by funding provided by the “Observatoire Hommes-Milieus (OHM)” “Littoral Méditerranéen,” and by the Programme National EC2CO “Ecosphère Continentale et Côtière” and by a doctoral fellowship (Ayad Almakki) from Campus France. We thank Dr. H. Jean-Pierre for fructuous discussions on resistance to antibiotics in medicine.

Competing interest: None declared

Ethical approval: Not required

References

- Aliaume, C., Viaroli, P., Zaldivar, J., and Do Chi, T. (2007). Coastal lagoons of Southern Europe: recent changes and future scenarios. *Transitional Waters Monogr.* *1*, 1–12.
- Amos, G.C.A., Zhang, L., Hawkey, P.M., Gaze, W.H., and Wellington, E.M. (2014). Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Vet. Microbiol.* *171*, 441–447.
- Atoyan, J.A., Patenaude, E.L., Potts, D.A., and Amador, J.A. (2007). Effects of tetracycline on antibiotic resistance and removal of fecal indicator bacteria in aerated and unaerated leachfield mesocosms. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* *42*, 1571–1578.
- Baquero, F., Martínez, J.-L., and Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 260–265.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. (2004). Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16630–16635.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N.Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 320–330.
- CA-SFM (2013). Recommandations 2013 du Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2013_vjuin.pdf.
- Clementino, M.M., Vieira, R.P., Cardoso, A.M., Nascimento, A.P.A., Silveira, C.B., Riva, T.C., Gonzalez, A.S.M., Paranhos, R., Albano, R.M., Ventosa, A., et al. (2008). Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extrem. Life Extreme Cond.* *12*, 595–604.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., and Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* *42*, D633–642.
- D’Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* *311*, 374–377.
- Diop, A., Khelaifia, S., Armstrong, N., Labas, N., Fournier, P.-E., Raoult, D., and Million, M. (2016). Microbial culturomics unravels the halophilic microbiota repertoire of table salt: description of *Gracilibacillus massiliensis* sp. nov. *Microb. Ecol. Health Dis.* *27*, 32049.
- Esteves, K., Hervio-Heath, D., Mosser, T., Rodier, C., Tournoud, M.-G., Jumas-Bilak, E., Colwell, R.R., and Monfort, P. (2015). Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in French Mediterranean coastal lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 7600–7609.
- Gaze, W.H., Krone, S.M., Larsson, D.G.J., Li, X.-Z., Robinson, J.A., Simonet, P., Smalla, K., Timinouni, M., Topp, E., Wellington, E.M., et al. (2013). Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerg. Infect. Dis.* *19*.

- Gulkowska, A., Leung, H.W., So, M.K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L.W.Y., Richardson, B.J., Lei, A.P., Giesy, J.P., and Lam, P.K.S. (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Res.* *42*, 395–403.
- Husson, F., Josse, J., and Lê, S. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *25*, 1–18.
- Köser, C.U., Ellington, M.J., and Peacock, S.J. (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet. TIG* *30*, 401–407.
- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., and Larsson, D.G.J. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One* *6*, e17038.
- Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., et al. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 1185–1193.
- Maravić, A., Skočibušić, M., Sprung, M., Samanić, I., Puizina, J., and Pavela-Vrančić, M. (2012). Occurrence and antibiotic susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex in coastal marine environment. *Int. J. Environ. Health Res.* *22*, 531–542.
- Marti, E., Variatza, E., and Balcazar, J.L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* *22*, 36–41.
- Michon, A.-L., Aujoulat, F., Roudière, L., Soulier, O., Zorgniotti, I., Jumas-Bilak, E., and Marchandin, H. (2010). Intragenomic and intraspecific heterogeneity in *rrs* may surpass interspecific variability in a natural population of *Veillonella*. *Microbiol. Read. Engl.* *156*, 2080–2091.
- Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2013). Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.* *47*, 1875–1887.
- Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., and Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 3691–3701.
- Okoh, A.I., and Igbinosa, E.O. (2010). Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *BMC Microbiol.* *10*, 143.
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., and Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *21–22*, 41–59.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 657–686.
- Perry, J.A., Westman, E.L., and Wright, G.D. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Curr. Opin. Microbiol.* *21*, 45–50.

Port, J.A., Cullen, A.C., Wallace, J.C., Smith, M.N., and Faustman, E.M. (2014). Metagenomic frameworks for monitoring antibiotic resistance in aquatic environments. *Environ. Health Perspect.* *122*, 222–228.

Ramírez Castillo, F.Y., Avelar González, F.J., Garneau, P., Márquez Díaz, F., Guerrero Barrera, A.L., and Harel, J. (2013). Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Front. Microbiol.* *4*, 147.

Rawat, D., and Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J. Glob. Infect. Dis.* *2*, 263–274.

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., and Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* *447*, 345–360.

Romano-Bertrand, S., Dupont, C., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., and Licznar-Fajardo, P. (2015). Reducing pathobiomes could slow arms race between man and microbes. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, (A. Méndez-Vilas), pp. 698–716.

Roudière, L., Jacquot, A., Marchandin, H., Aujoulat, F., Devine, R., Zorogniotti, I., Jean-Pierre, H., Picaud, J.-C., and Jumas-Bilak, E. (2009). Optimized PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. *J. Microbiol. Methods* *79*, 156–165.

Sala-Comorera, L., Vilaró, C., Galofré, B., Blanch, A.R., and García-Aljaro, C. (2016). Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *219*, 577–584.

Schlüter, A., Krause, L., Szczepanowski, R., Goesmann, A., and Pühler, A. (2008). Genetic diversity and composition of a plasmid metagenome from a wastewater treatment plant. *J. Biotechnol.* *136*, 65–76.

Schreiber, C., and Kistemann, T. (2013). Antibiotic resistance among autochthonous aquatic environmental bacteria. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* *67*, 117–123.

Szczepanowski, R., Bekel, T., Goesmann, A., Krause, L., Krömeke, H., Kaiser, O., Eichler, W., Pühler, A., and Schlüter, A. (2008). Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* *136*, 54–64.

Tello, A., Austin, B., and Telfer, T.C. (2012). Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. *Environ. Health Perspect.* *120*, 1100–1106.

Varela, A.R., André, S., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2014). Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system. *Water Res.* *54*, 327–336.

Varela, A.R., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2016). Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater. *Sci. Total Environ.* *542*, 665–671.

- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.-F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.-A., Roumagnac, P., et al. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *4*, 29.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2011). Diversity and antibiotic resistance patterns of *Sphingomonadaceae* isolates from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 5697–5706.
- Walsh, F., Ingenfeld, A., Zampiccoli, M., Hilber-Bodmer, M., Frey, J.E., and Duffy, B. (2011). Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *J. Microbiol. Methods* *86*, 150–155.
- Wang, P., Yuan, T., Hu, J., and Tan, Y. (2011). Determination of cephalosporin antibiotics in water samples by optimised solid phase extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detector. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* *91*, 1267–1281.
- Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N.F.-Y., and Zhou, H.-W. (2012). Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 8264–8271.
- Weber, K.P., Mitzel, M.R., Slawson, R.M., and Legge, R.L. (2011). Effect of ciprofloxacin on microbiological development in wetland mesocosms. *Water Res.* *45*, 3185–3196.
- Woodford, N., Wareham, D.W., Guerra, B., and Teale, C. (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob. Chemother.* *69*, 287–291.
- Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., Zhong, X., Liang, W., and Zeng, Z. (2015). Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro)quinolones-containing manure in arable soil. *Chemosphere* *119*, 473–478.
- Yang, C.-W., Chang, Y.-T., Chao, W.-L., Shiung, I.-I., Lin, H.-S., Chen, H., Ho, S.-H., Lu, M.-J., Lee, P.-H., and Fan, S.-N. (2014). An investigation of total bacterial communities, culturable antibiotic-resistant bacterial communities and integrons in the river water environments of Taipei city. *J. Hazard. Mater.* *277*, 159–168.

Table 1: Taxa detected in this study according to the origin of the water and to the ATB resistance detected (TET: tetracycline, CAZ: ceftazidime, CTX, cefotaxime), whatever the cultural conditions.

Phylum or class	Family	Genus	River	Lake	Lagoon
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>			CTX
	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>			CAZ/CTX
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Chromobacterium</i>	CAZ		
	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i>	CAZ/CTX		
	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	TET/CAZ/CTX	CTX/CAZ	
	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	TET/CAZ	TET	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Unidentified 1*	TET /CAZ	TET	
		Unidentified 2*	TET/CTX		
		Unidentified 3*	CAZ	TET	
		Unidentified 4*		TET	
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>			TET
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	TET/CAZ/CTX	CAZ	TET/CAZ/CTX
		<i>Azomonas</i>			CTX
	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Rheinheimera</i>		CTX	TET/CAZ/CTX
	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>	TET	TET	TET/CTX
	<i>Vibrionaceae</i>	Unidentified 5*			CAZ
<i>Vibrio</i>		TET/CAZ/CTX	TET	TET/CAZ/CTX	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Algoriphagus</i>			CAZ/CTX
	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>			TET/CAZ/CTX
		<i>Cellulophaga</i>			TET/CAZ/CTX
		<i>Chryseobacterium</i>	TET/CAZ/CTX	TET	
		<i>Elizabethkingia</i>	TET/CAZ/CTX		
<i>Firmicutes</i>	<i>Flammeovirgaceae</i>	<i>Roseivirga</i>			CAZ/CTX
	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	TET		
	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	TET/CAZ/CTX	TET/CAZ/CTX	CAZ/CTX
		<i>Lysinibacillus</i>	CAZ		
		<i>Virgibacillus</i>		CAZ	
	<i>Bacillales XII Incertae</i>				
	<i>Sedis</i>	<i>Exiguobacterium</i>	TET/CAZ/CTX	CAZ/CTX	
	<i>Planococcaceae</i>	<i>Marinibacillus</i>			TET/CAZ/CTX
		<i>Paenisporosarcina</i>		CAZ	
	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>		TET/CAZ	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>		CAZ	
	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>			TET/CAZ/CTX

* Non-identified genus-level OTUs differing among them but affiliated to a family.

Legends to figures

Fig. 1: Percent of resistant cultivable bacteria in water samples from the Lez River (A), Salagou Lake (B), and Etang de l'Or lagoon (C, D) according to culture conditions (temperature and salinity) and antibiotic concentrations. In inserts (top right of graphs), abundance of bacterial community in each sample, in CFU/mL, according to temperature of incubation. TSA: trypticase soy agar; MA: marine agar; CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; TET: tetracycline.

Fig. 2: Concentration of antibiotics inhibiting the growth of 50 % ($c-IC_{50}$) and 90% ($c-IC_{90}$) of the bacterial community. The stars indicated $c-IC_{90}$ over the highest concentration tested. The dotted lines indicate clinical breakpoints for resistance defined by CA-SFM guidance, 2013: in clinical context, if MIC (minimal inhibitory concentration) is over 2mg/L for CTX and 8mg/L for CAZ and TET, it means that studied strain is resistant to the ATB tested.

Fig. 3: Venn diagrams showing the distribution of genera according A) to the type of water and to the culture medium used; B) to the resistance to ATBs.

Fig. 4: Relative abundance of bacterial families in water samples from the Lez River (A), Salagou Lake (B), and Etang de l'Or lagoon (C) according to the selecting ATB and the ATB concentration (means of abundance whatever culture conditions).

Fig. 1

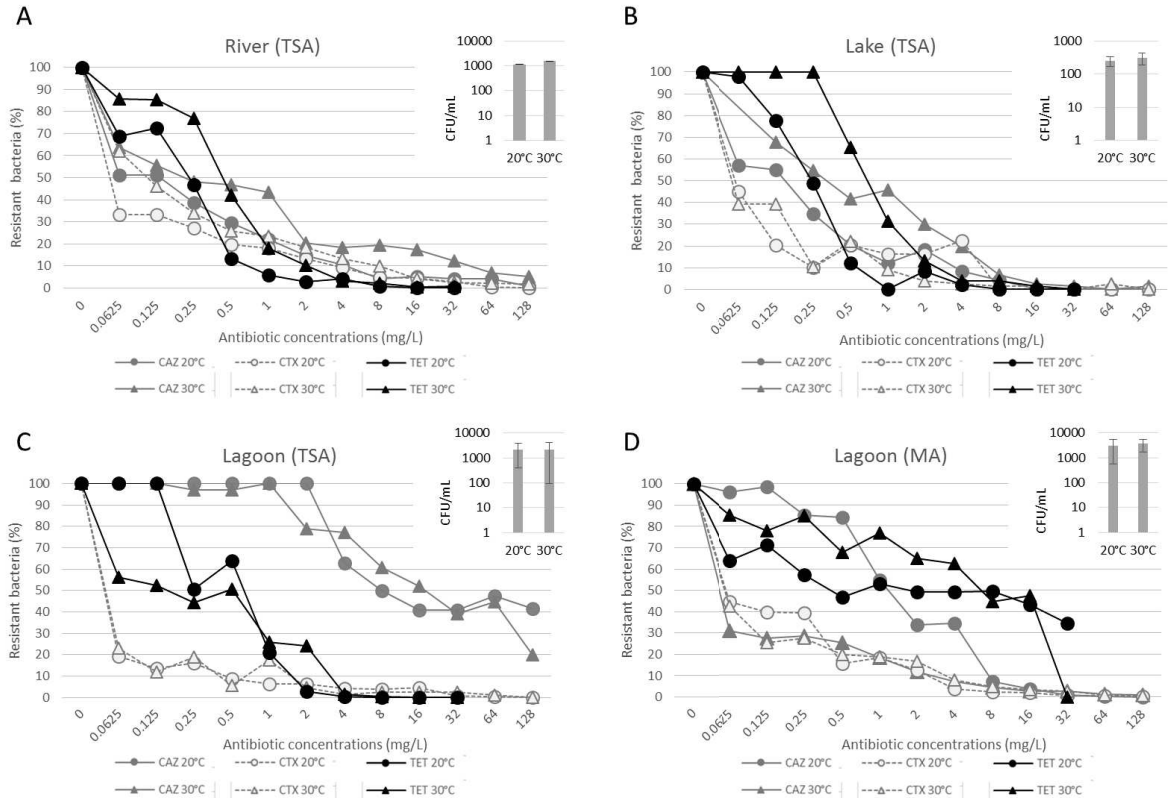


Fig. 2

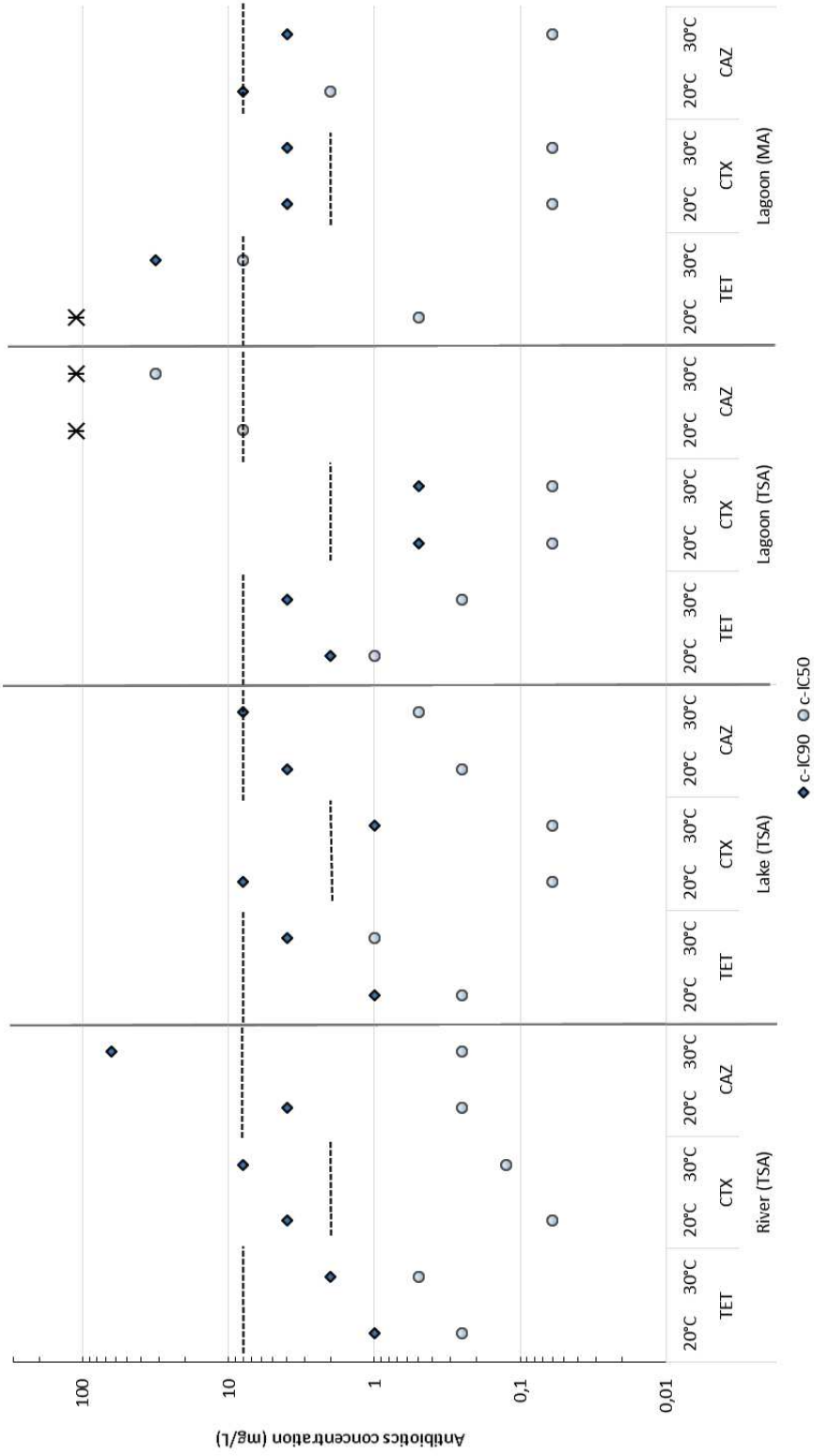
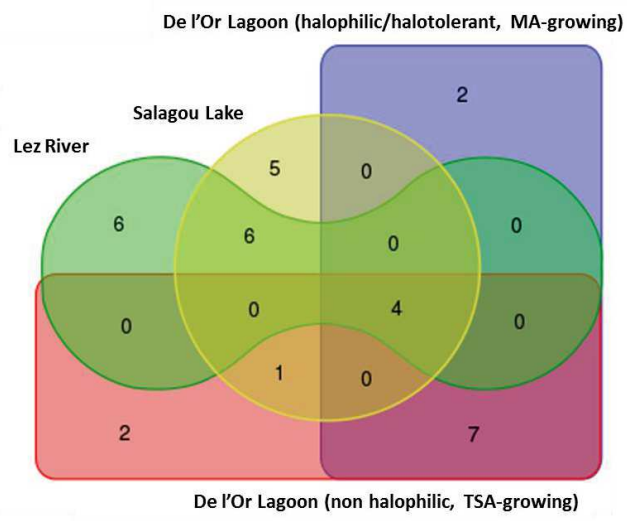


Fig. 3

A



B

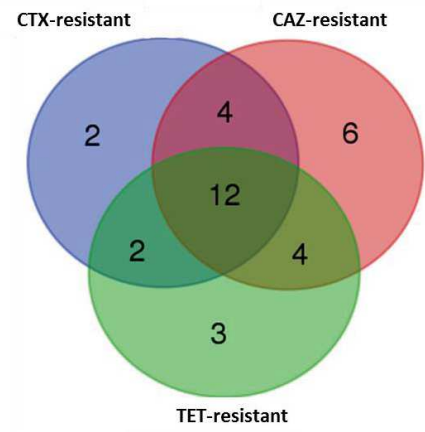
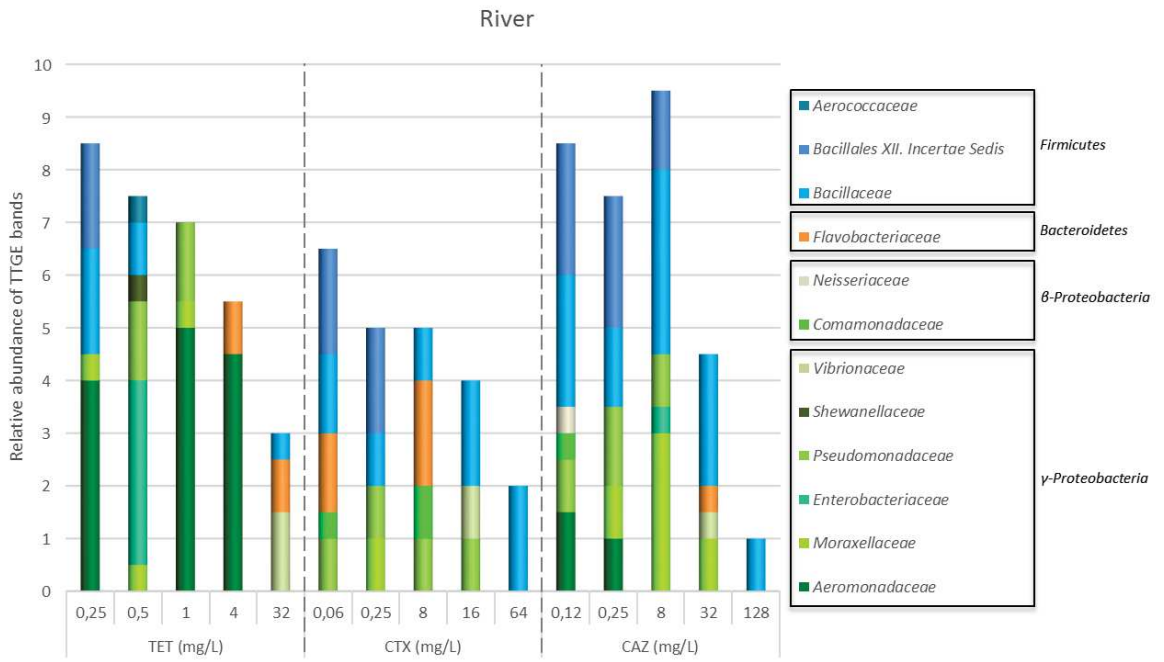
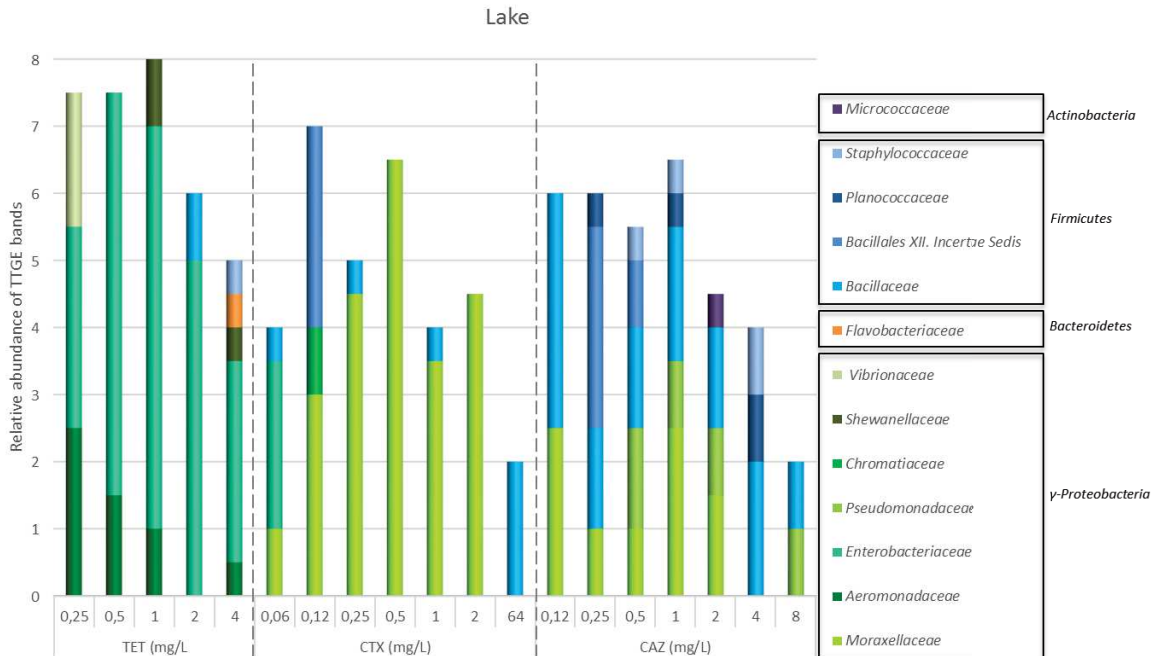


Fig 4

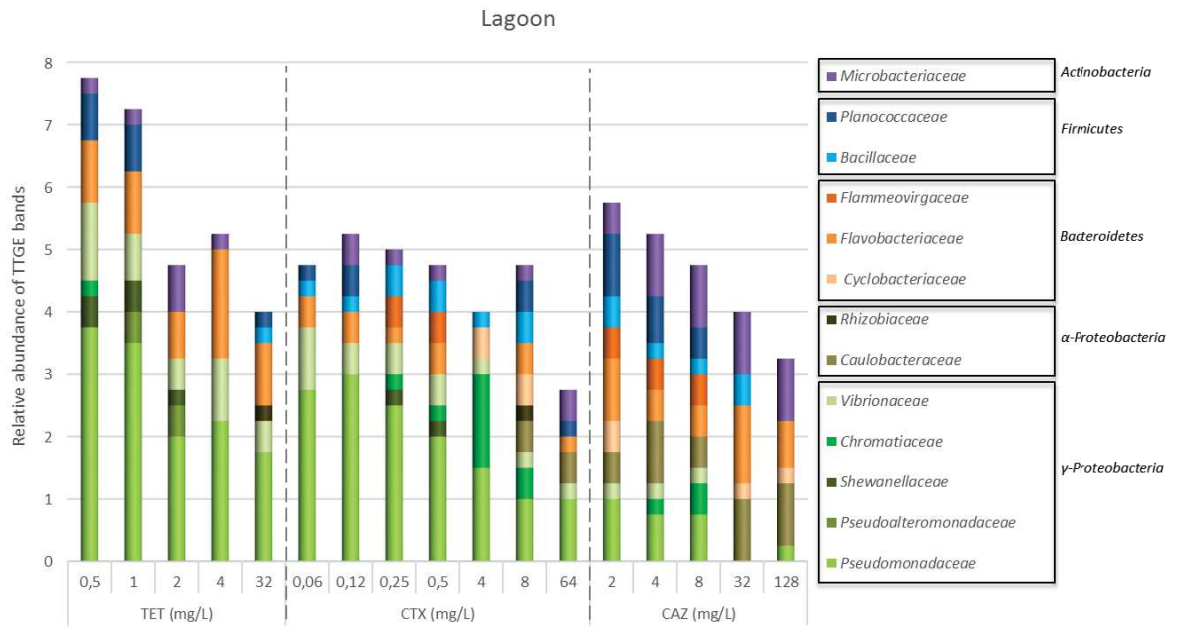
A



B



C



C - De L'Or Lagoon community on TSA medium

Phylum	Famille	20°C															30°C																			
		TET					CTX					CAZ					TET					CTX					CAZ									
		0,5	1	2	4	32	0,06	0,12	0,25	0,5	4	8	64	2	4	8	32	128	0,5	1	2	4	32	0,06	0,12	0,25	0,5	4	8	64	2	4	8	32	128	
Proteobacteria	Caulobacteraceae											1																								
	Rhizobiaceae														1		1																1	1	1	1
Proteobacteria	Chromatiaceae									1	5	2			1	2											1		1	1						
	Pseudoalteromonadaceae			1																																
	Pseudomonadaceae	3	3		5		2	4	4	3					1					5	5	4		5	4	3	3	1	1	1		1	1	1		
	Shewanellaceae	1	1						1																				1							
Bacteroidetes	Vibrionaceae			1																1	1			2	2											
	Cyclobacteriaceae																													1	1					
Firmicutes	Flavobacteriaceae	1	1		2	2	2	2	1	1					1		1			1	1	1	2						1	1				1	2	1
	Bacillaceae														1																					
Actinobacteria	Planococcaceae	1	1											1	1	1				1												1				
	Microbacteriaceae			1	1									1	2	1	1	1									2	1	1				1	1		
	Non-identified	2	1	2	1				1	3	3	3	2	2				2	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	4	3	3	1	1	
	Families number	4	4	3	3	1	2	2	3	3	1	2	0	4	4	4	3	2	4	4	2	1	2	2	2	2	2	3	4	3	2	4	3	4	2	2
	Bands number	8	7	5	9	2	4	6	7	8	8	6	0	6	7	5	3	2	10	10	7	2	8	9	7	5	4	5	4	2	8	6	7	4	3	

D - De L'Or Lagoon community on MA medium

Phylum	Famille	20°C															30°C																			
		TET					CTX					CAZ					TET					CTX					CAZ									
		0,5	1	2	4	32	0,06	0,12	0,25	0,5	4	8	64	2	4	8	32	128	0,5	1	2	4	32	0,06	0,12	0,25	0,5	4	64	2	4	8	32	128		
Proteobacteria	Rhizobiaceae																																			
Proteobacteria	Pseudoalteromonadaceae			1																																
	Pseudomonadaceae	3	3	3			2	2	3	3	1	2	2	1	1	1		1	4	3	1	4	3	4	3	2	1	5	1	1	1					
	Shewanellaceae	1	1	1																																
	Vibrionaceae	3	1	1	1		2	2	2	2	1	1	1	1	1	1			1	1		3														
Bacteroidetes	Cyclobacteriaceae																													1	1			1	1	
	Flammeovirgaceae								1	1				1	1	1																				
Firmicutes	Flavobacteriaceae	2	1	2	3	2								1	1		1			1		1								2	1	1	1	2		
	Bacillaceae								1	1	1	1		1	1		2							1	1	1	1	1		1						
Actinobacteria	Planococcaceae	1					1	1						1	1	1								1		1				1	1					
	Microbacteriaceae			1													2	2			1	1	1								1	1	2	1	1	
	Non-identified	2	2	4	1		1	1	3	3	2	2	3	2	3	1	1	1	2	2	2	3	1	3	2	4	2	4	2	1	1	1	1	2	3	
	Families number	5	5	5	2	1	3	3	4	4	3	3	2	6	6	4	3	2	4	5	2	3	4	2	3	4	2	2	2	2	6	4	3	3	3	
	Bands number	12	9	12	5	2	6	6	10	10	5	6	6	8	9	5	6	4	4	9	9	4	11	7	8	7	8	7	7	4	7	8	5	5	5	7

2. Etude des communautés bactériennes antibiorésistantes dans des rivières en zone urbaine péri-hospitalière

2.1 Introduction

Les nouvelles technologies de la biologie et de l'écologie génèrent des stratégies globales dites « omiques » qui visent à dépasser les approches réductrices réalisées sur les individus isolés des autres membres de leurs communautés et des conditions environnementales. Ces développements technologiques s'accompagnent de nouveaux concepts. Le concept de pathobiome apporte de nombreuses hypothèses ouvrant le champ des recherches en microbiologie et infectiologie. Un pathobiome est une entité biologique complexe impliquée dans des infections, en particulier en favorisant l'émergence d'espèces pathogènes et/ou résistantes. Les conditions biotiques et abiotiques qui influent sur un pathobiome font partie intégrante de ce pathobiome (Romano-Bertrand et al., 2015; Vayssier-Taussat et al., 2014).

La résistance aux agents antimicrobiens peut être considérée comme un facteur de pathogénèse pour de nombreux pathogènes opportunistes qui n'ont pas de facteur de virulence au sens strict du terme. La résistance aux ATBs dans l'environnement n'est pas obligatoirement générée par exposition aux ATBs mais souvent par co-sélection par divers polluants ou par exaptation. Si l'on ajoute que les écosystèmes hydriques sont des hot-spots d'échanges génétiques créant des résistomes, on voit clairement qu'un environnement hydrique pollué peut se comporter comme un pathobiome à l'origine de l'émergence, de la persistance et de la transmission d'un agent infectieux résistant aux sujets exposés.

L'évaluation du risque infectieux lié à l'eau a rencontré de nombreux succès grâce à l'utilisation d'indicateurs de contamination fécale. Une approche globale à l'échelle des communautés, tenant compte des conditions biotiques et abiotiques agissant sur ces communautés, doit aujourd'hui compléter les indicateurs classiques. Ces derniers ont été très efficaces pour évaluer et lutter contre le risque oro-fécal mais restent limités ou inefficaces pour évaluer un risque plurifactoriel complexe comme l'émergence et le succès de bactéries résistantes et multirésistantes (MDR).

Parmi les MDR, les pathogènes humains tel que les *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, etc.), *Acinetobacter baumannii* et les pathogènes hydriques comme *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas* spp. causent de nombreuses infections communautaires et associées aux soins. Les infections causées par les MDR sont associées à une forte augmentation de morbi-mortalité

avec une prolongation des séjours hospitaliers (El Zowalaty et al., 2015; Martín-Loeches et al., 2014; Rhodes et al., 2000). *P. aeruginosa* est à la fois un pathobionte transitoire des microbiotes humains et un autochtone des milieux hydriques, des réseaux d'eau et de la robinetterie. Comme cela a été décrit pour *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa* peut jouer le rôle de plateforme d'échange qui facilite les transferts génétiques entre bactéries humaines et environnementales.

Les approches de communautés conduisent à des études lourdes et difficiles à interpréter. Elles sont souvent basées sur des méthodes indépendantes de la culture, ce qui est difficile à concilier avec la définition même de la résistance qui est phénotypique. Nous avons proposé dans le chapitre précédent une méthode simple qui quantifie la résistance à l'échelle de sous-communautés cultivables tout en décrivant le répertoire taxonomique des espèces présentes. Nous allons poursuivre cette stratégie en l'appliquant à l'eau en milieu urbain.

La plupart des études portant sur la résistance aux ATBs en zone urbaine concernent le traitement des eaux usées en station d'épuration. Les eaux de ruissellement sont moins étudiées du point de vue des communautés résistantes (voir revue de littérature en page 48) alors que leur proximité et leur accessibilité sont des facteurs importants d'exposition des hommes et des animaux en zone urbaine. Les effluents hospitaliers sont aussi largement étudiés car ils contiennent divers polluants d'origine médicamenteuse (résidus d'ATBs ou d'autres produits antimicrobiens) mais aussi de nombreuses bactéries pathogènes. Ces conditions très sélectives facilitent l'émergence de pathogènes MDR (Verlicchi et al., 2012). Les eaux de ruissellement à proximité des hôpitaux et l'influence d'un hôpital sur la qualité de ces eaux sont rarement étudiées en termes de résistance aux ATBs alors que les bactéries MDR de l'hôpital pourraient contaminer l'environnement péri-hospitalier lors de fuites d'effluents ou par ruissellement à partir de surfaces construites imperméables.

Le but de ce travail expérimental est de décrire la structure des communautés bactériennes résistantes. L'abondance et la structure des communautés résistantes seront confrontées aux paramètres hydrologiques et climatiques mais aussi à l'influence de l'urbanisation et/ou de l'hôpital. De plus, nous avons étudié la prévalence des bactéries d'intérêt médical résistantes aux céphalosporines de 3^e génération (cefotaxime, ceftazidime) et aux carbapénèmes dans divers sites d'échantillonnage plus ou moins impactés par l'hôpital. Cette étude a permis la description de deux souches bactériennes hautement résistantes et émergentes particulièrement redoutables en santé humaine et détectées pour la première fois dans une rivière française.

2.2 Stratégie de l'étude

2.2.1 Sites d'échantillonnage

Le travail présenté dans cette partie aborde la question de l'antibiorésistance environnementale en relation avec des activités anthropiques, en particulier urbaines et hospitalières. L'antibiorésistance environnementale est étudiée ici dans une approche territoriale, dans un secteur très limité de la ville de Montpellier, le secteur péri-hospitalier.

Située dans le Sud de la France, la ville de Montpellier est au centre de la métropole. « Montpellier Méditerranée Métropole ». Cette métropole est constituée de 31 communes, compte 427 500 habitants en 2011 (dont 264 538 habitants sur la commune de Montpellier), et est encore en phase de développement (**Fig. 19**) avec une population qui a triplé en 30 ans (1962-2011) (INSEE Analyses Occitanie, 2016). Notons enfin, que les tendances démographiques prévoient un vieillissement de la population (**Tableau 2**) (INSEE, 2012), rendant la population plus vulnérable.

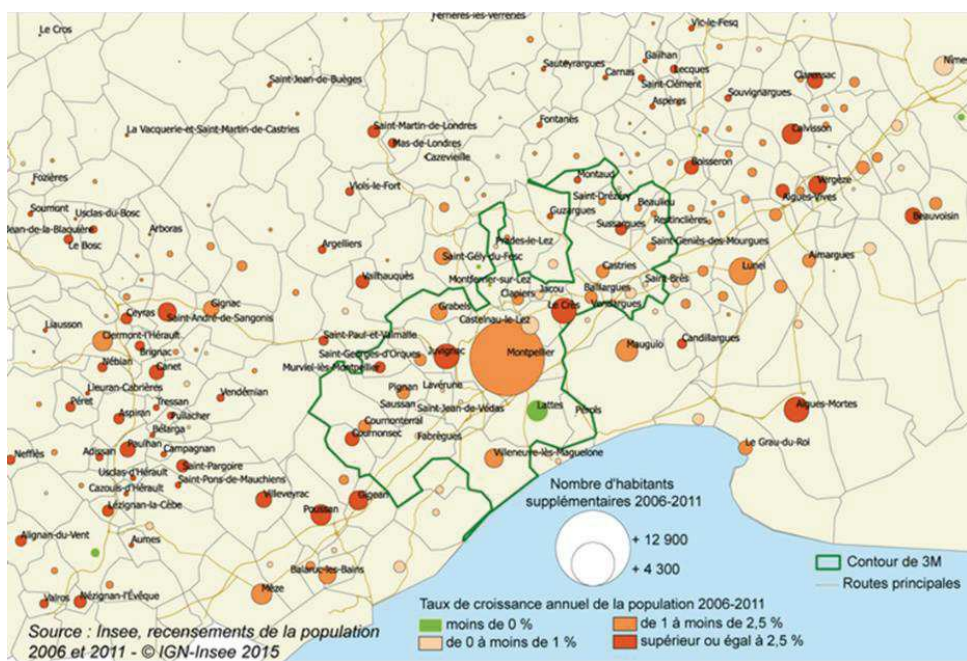


Fig. 19 : Croissance démographique annuelle entre 2006 et 2011 dans Montpellier Méditerranée Métropole et aux alentours (IGN-Insee, 2015)

Tableau 2 : données prévisionnelles d'évolution de la population de l'agglomération de Montpellier (INSEE, 2012)

	2007	2030
Nombre d'habitant	409 000	472 000
Age moyen des habitants	37 ans	40 ans
Nombre d'habitant \geq 75 ans	29 000	50 000
Pourcentage de la population \geq 75 ans	7%	11%

Par ailleurs, Montpellier, situé dans le bassin méditerranéen (**Fig. 21A**) présente un climat typique avec des températures douces l’hiver, un fort ensoleillement et des jours de précipitations peu nombreux. En revanche, les épisodes pluvieux peuvent être diluviens, conduisant à des inondations, généralement entre fin août et décembre mais aussi au printemps (**Fig. 20**). Ces épisodes violents auxquels est soumise la région montpelliéraine sont appelés épisodes méditerranéens ou épisodes cévenols dans le cas particulier où le massif des Cévennes, bloque la progression des masses nuageuses. Les études prenant en compte les changements climatiques ou les changements démographiques s’accordent sur le fait que le bassin méditerranéen constitue un environnement très vulnérables à ces changements, avec un stress hydrique prévisible (Milano et al., 2013).

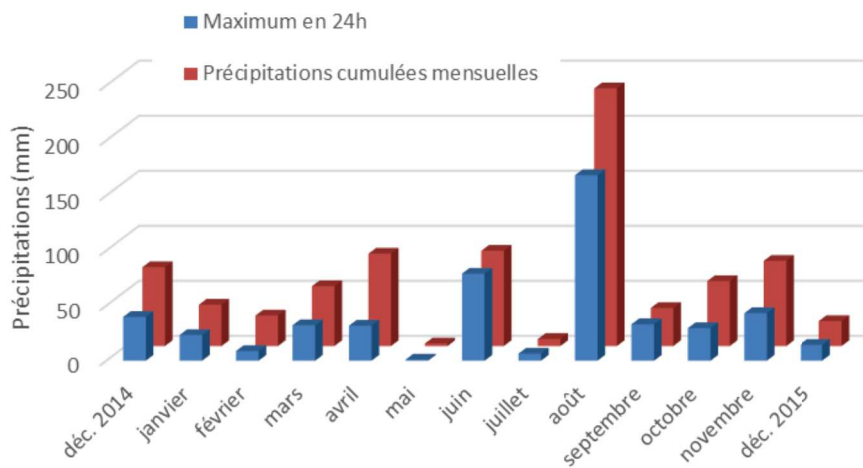


Fig. 20 : profil de précipitations enregistrées à la station météorologique de Montpellier-Fréjorgues pendant la période de prélèvements ; données extraites de (Infoclimat, 2017), station météorologique gérée par Météo-France et située proche de l'aéroport de Montpellier.

Les écosystèmes hydriques de la région montpelliéraine sont soumis à des variations environnementales (anthropiques et climatiques) créant des stress pour les communautés microbiennes. Face à la dissémination de bactéries résistantes à des familles d’antibiotiques majeurs, la connaissance des caractéristiques des écosystèmes microbiens est nécessaire pour appréhender les facteurs de risque environnementaux et urbains favorisant l’émergence et la dissémination de telles antibiorésistances. Ce travail s’intègre dans le thème actuellement prioritaire d’une meilleure gestion de l’antibiorésistance à partir d’une approche naturaliste et territoriale.

Bien que les effluents des réseaux d’assainissement des complexes hospitaliers soient étudiés en particulier en tant que sources de micro-organismes pathogènes et/ou résistants et en terme d’occurrence de gènes de résistance, les zones aquatiques proches des hôpitaux et recevant les eaux de ruissellement d’un hôpital sont peu explorées.

Afin d'évaluer la contribution des eaux de ruissellement de l'hôpital Lapeyronie et de l'hôpital Arnaud de Villeneuve du Centre Hospitalier (CHU) de Montpellier, 4 points de prélèvements ont été définis sur 2 cours d'eau (**Fig. 21B et C**) :

- Le **Font d'Aurelle** est un cours d'eau urbain qui est à la fois aérien et canalisé en sous-sol, sous le CHU. 2 points, distants d'environ 1,3km ont été définis à l'entrée (site dit amont, nommé FAVL pour Font d'Aurelle Avant Lapeyronie) et en sortie (site dit aval, nommé FAPL pour Font d'Aurelle Après Lapeyronie) du tunnel de canalisation. Ce cadre d'une hauteur d'environ 3m et presque 4m de largeur est bétonné et présente une très légère pente générale (0,55cm/m) et débouche sur le bassin de rétention dit de «la Colombière ». Les coordonnées GPS de ces 2 sites sont N43.63741 E003.84389 (FAVP) N43.62711 E003.85316 (FAPL).

- Le **Verdanson** est lui aussi un cours d'eau urbain qui coule à proximité de la zone hospitalière. Il est également aérien et en partie souterrain. 2 points, distants d'environ 1,3km ont été choisis afin d'être dans les conditions les plus proches possible des conditions d'échantillonnage sur le Font d'Aurelle. Le point amont est dans un parc public (Domaine du château d'Ô, coordonnées N43.63222 E003.84091, site VAVL pour Verdanson Avant Lapeyronie). Le Verdanson traverse ensuite une zone résidentielle, le point aval ayant été choisi dans la zone résidentielle, en aval d'une section canalisée (coordonnées N43.62515 E003.85292, site VAPL pour Verdanson Après Lapeyronie).

Ces deux cours d'eau urbains sont des affluents du Lez qui lui-même traverse les eaux des étangs du Prévost et du Méjean et a son embouchure à Palavas les Flots.



Fig. 21 : Présentation des sites d'échantillonnages ; Cartes A) et B) produites sur <https://www.geoportail.gouv.fr/>

Ces 4 points ont été échantillonnés mensuellement en conditions hydrologiques contrastées (**Fig. 22**). L'indice des Précipitations Antérieures (IPA) a été calculé pour chacune des dates de prélèvement (**Tableau 3**). Cet indice caractérise les conditions d'humidité antérieures des sols et la pluviométrie de la période précédant la journée de la campagne terrain. Cet indice est une somme pondérée des précipitations journalières tombées au cours d'une durée antérieure au jour d'observation. La pondération est d'autant plus faible que la précipitation est ancienne (Salles et al., 2015).

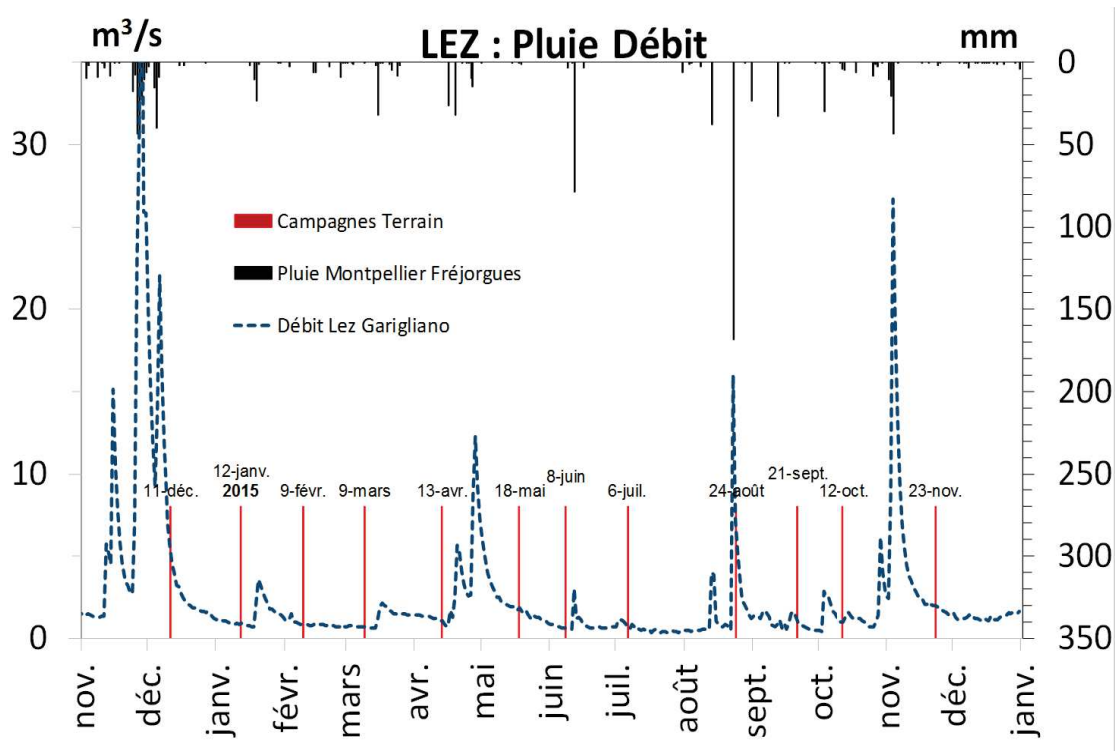


Fig. 22 : hyétogramme et débit journalier du Lez couvrant la période d'échantillonnage ; le débit moyen journalier du Lez est mesuré au niveau de la station hydrométrique Pont-Garigliano gérée par la DREAL Languedoc-Roussillon (<http://www.hydro.eaufrance.fr/stations/Y3204030>). Cette station est située quelques centaines de mètres en amont de la confluence du Lez avec le Verdanson. La pluie journalière mesurée à la station météorologique de Montpellier-Fréjorgues gérée par Météo-France et située proche de l'aéroport de Montpellier (Infoclimat, 2017). Les bâtonnets reportés en rouge et les dates correspondent aux journées des campagnes de terrain.

Tableau 3 : IPA des dates de prélèvements

Date	11-déc.	12-janv.	9-févr.	9-mars	13-avr.	18-mai	8-juin	6-juil.	24-août	21-sept.	12-oct.	23-nov
IPA (mm)	11,4	0	0,5	0,9	0	0,7	0	0	126,5	2,7	6,7	0,1

2.2.2 Choix des ATBs et des résistances étudiés

L'antibiorésistance testée dans cette étude concerne des ATBs choisis du fait de leur importance en médecine humaine que ce soit en termes de consommation ou en termes d'importance en thérapeutique. Les choix ont aussi porté sur la persistance ou non dans l'environnement de l'ATB. Concernant la consommation d'ATB, la région Occitanie est parmi les forts consommateurs français. La moyenne nationale est de 29,9 dose définie journalière pour 1000 habitant et par an (DDJ/1000H/an) contre 31 DDJ/1000H/an en Occitanie et 27 en région Pays de la Loire (Maugat et al., 2016). La consommation est en augmentation depuis 2005 malgré la mise en place de plans nationaux de régulation.

Dans la famille des β -lactamines, l'amoxicilline est la molécule la plus fréquemment prescrite et consommée lors de tout type d'infections de la plus bénigne à la plus grave. Cette molécule fait l'objet d'une surconsommation du fait de sa prescription inadéquate lors des infections ORL d'origine virale. L'amoxicilline est une aminopénicilline obtenue par hémisynthèse qui est hydrolysée par la plupart des β -lactamases, d'où son association fréquente avec un inhibiteur des β -lactamases, l'acide clavulanique. L'augmentation de sa consommation dans les 10 dernières années est particulièrement inquiétante (+30,6% en médecine humaine de ville) et va à l'encontre de toutes les politiques de santé mises en œuvre (voir pénicillines, **Fig. 23**). Autres β -lactamines, les céphalosporines de 3e génération et les carbapénèmes sont considérés comme des ATBs essentiels et souvent de dernière ligne pour le traitement des infections sévères à bacilles à Gram négatif (Paterson and Bonomo, 2005). Ils sont obtenus par héli-synthèse à partir de molécules naturelles. Leur consommation est en augmentation à l'hôpital (**Fig. 21**). Dès leur mise sur le marché, des résistances sont apparues le plus souvent par production d'enzymes comme les β -lactamases à spectre étendu (BLSE ou ESBL), les céphalosporinases et les carbapénémases. Ces enzymes à large spectre d'hydrolyse sont apparues par mutations ponctuelles sur des gènes de β -lactamases classiques comme TEM et SHV (Bradford, 2001). Leur localisation souvent plasmidique favorise leur diffusion par HGT (Baquero et al., 2008). La diffusion rapide des résistances aux céphalosporines de 3e génération et aux carbapénèmes remet en cause l'efficacité de ces antibiotiques et conduit à des impasses thérapeutiques. En conséquence, et malgré la faible persistance des β -lactamines dans l'environnement, notre étude s'est particulièrement intéressée à la résistance aux céphalosporines et aux carbapénèmes.

Nous avons aussi considéré la résistance aux tétracyclines. La résistance aux tétracyclines est plus classiquement considérée dans l'environnement car la molécule persiste. Comme les β -lactamines, les tétracyclines sont obtenues par héli-synthèse à partir de molécules naturelles. Ces antibiotiques sont de moins en moins utilisés en santé humaine et leur utilisation en santé animale est en forte décroissance (**Fig.23**) après une période de surconsommation (Chopra and Roberts, 2001). La résistance aux tétracyclines détectée par quantification des gènes *tet* est considérée comme un bon marqueur d'impact environnemental de l'usage des ATBs (voir revue de littérature page 48).

Enfin, la résistance aux quinolones et fluoroquinolones nous fournit un exemple de résistance aux ATBs synthétiques sans homologues naturels. Les fluoroquinolones sont largement utilisées dans de très nombreuses indications en médecine humaine et animale. C'est la classe d'ATB dont la consommation décroît le plus sur les 10 dernières années (**Fig.23**). Les fluoroquinolones sont éliminées par les urines sous forme inchangée et sont très peu biodégradables dans l'environnement (Kümmerer, 2009). Ainsi, elles sont très peu éliminées par le lagunage en station d'épuration (Lindberg et al., 2006). Ainsi, on considère que 70% des taux de fluoroquinolones persistent dans les boues de stations après traitement et peuvent être libérés dans les sols et les eaux (Golet et al., 2002). L'étude de la résistance aux fluoroquinolones dans l'environnement revêt donc un intérêt majeur.

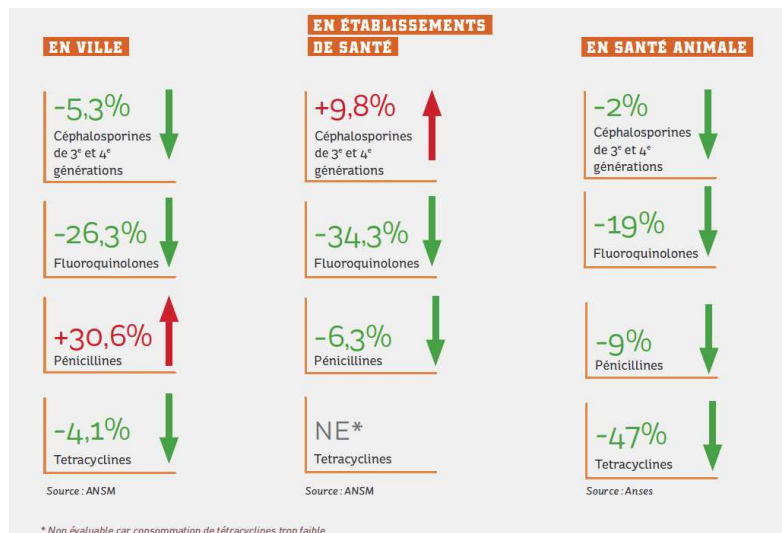
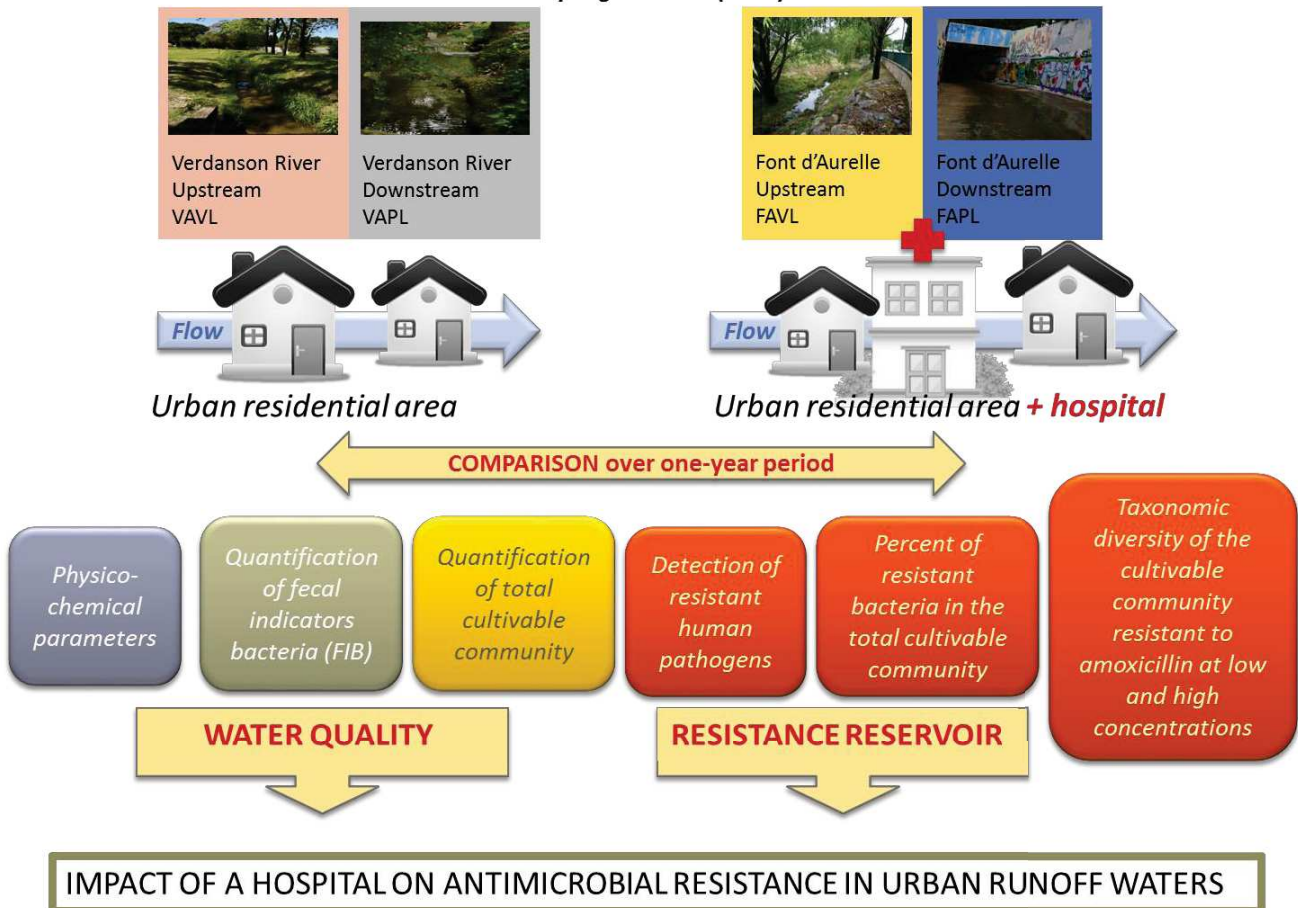


Fig. 23 : Evolution sur 10 ans (2005-2015) de la consommation par molécule en ville, en établissement de santé et en santé animale en France. Seules les principales classes sont considérées (Maugat et al., 2016)

2.2.3 Logigramme de l'étude

4 sites of water sampling in two urban rivers

One sampling a month (n=48)



2.3. Materials and Methods

2.3.1. Sample collection

Two liters of surface water were taken separately from each site of the rivers using sterile glass bottles at depth of 1 cm below the water surface. Samples were kept on ice packs to be transported to the laboratory within 2-3 h for immediate microbial and chemical analysis. Three additional liters of water samples were collected for determination of suspended particulate matter (SPM).

2.3.2. Physico-chemical Analysis

The physico-chemical parameters were measured *in situ* at the time of sampling by previously calibrated automatic probes. Temperature, pH, electrical conductivity and dissolved oxygen concentration (DOC) were determined in the field using the Hach® marked portable probes. Flow rate of surface water was assessed from field measurements based on determination of water flow velocity in transverse section of the water course, and then calculation of the flow rate by combining the geometric measurements (depth of water column, width of water course and water velocity). The measurements were performed using an electromagnetic current meter or for the largest section area, using ADCP (Acoustic Doppler Current profiler). The suspended particulate matter SPM was quantified as soon as possible after arrival to the laboratory. Whatman filter papers (Grade GF/F) of 0.7 µm porosity were weighed on a digital balance (initial weight). One liter of water was filtered through the filter, which was then oven-dried at 100 °C for 3 h. The filter paper was then re-weighed (final weight). The difference between initial and the final weight gives the value of SPM in mg. This experiment was repeated twice for each sampling site.

2.3.3. Quantification of fecal indicators bacteria (FIB)

Total coliforms and *E. coli* were quantified using colilert-18 Quantitray system (IDEXX) according to manufacturer's instructions. To quantify enterococci, water samples (0.1 mL, 1 mL, 10 mL and 100 mL) were filtered through 0.45 µm-pored nitrate cellulose filter (Sartorius), and placed onto Slanetz Bartley agar (Biomérieux, France). Experiments were done in duplicates. Enterococci were enumerated as red colonies that appeared after an incubation at 37 °C for 48 h.

2.3.4. Preparation of a bacterial community suspension

Five hundred milliliters of each water sample were filtered through 0.45 micron-pore-size cellulose sterile filters (Sartorius, Germany). The filter was then inserted in 5 mL sterile water and mixed vigorously by vortexing to remove bacteria from the filter. The obtained bacterial community suspension was plated onto various media (see below).

2.3.5. Cultivation-based approach to study antimicrobial resistance of bacterial communities

For each water sample, the cultivable community was studied by plating 200 μ L of the bacterial community suspensions (undiluted and diluted) on trypticase soy agar (TSA, Difco laboratories) at 22 °C during 48 h. Five antibiotics have been tested: amoxicillin (AMX) (aminopenicillin, β -lactams), cefotaxime (CTX) (third-generation cephalosporin, β -lactams), ceftazidime (CAZ) (third-generation cephalosporin, β -lactams), ofloxacin (OFL) (fluoroquinolones) and tetracycline (TET). TSA plates containing one concentration of one of the five ATB tested were prepared: AMX (64 mg/L, 8 mg/L, 1 mg/L, and 0.0312 mg/L), CTX (64 mg/L, 2 mg/L and 0.0312 mg/L), CAZ (32 mg/L, 8 mg/L, 2 mg/L, and 0.0312 mg/L) OFL (16 mg/L, 1 mg/L, and 0.0312 mg/L) and TET (32 mg/L, 8 mg/L, 0.5 mg/L and 0.0312 mg/L).

Proportions of resistant bacteria among the total cultivable community, expressed as percentages, correspond to the ratio of colony forming units (CFU) counts on ATB-supplemented medium to the CFU counts on ATB-free medium

2.3.6. Selection of resistant human pathogenic bacteria

200 μ L of the bacterial community suspension were plated onto various media used in medical microbiology and selective for MDR bacterial pathogens. Cefotaxime (4mg/L) supplemented MacConkey agar (Mac+CTX 4mg/L) and ceftazidime (4mg/L) supplemented Drigalski agar (Drig+CAZ 4mg/L) were used for the detection of MDR gram-negative bacteria. Ceftrimide agar supplemented with 4mg/L of Ceftazidime (Cet+CAZ 4mg/L) was used for the specific detection of CAZ-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and related species. Plates were incubated for 24 h at 37 °C, except ceftrimide based media which were incubated at 42 °C to select *P. aeruginosa*. Media without antibiotics were used to assess the total growing community on each selective medium (MacConkey, Drigalski and Ceftrimide). The percentages of ATB resistant bacteria were determined after comparison of colony counts on selective medium without antibiotic and on selective medium supplemented with antibiotic.

For the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), the selective chromogenic media chromID® CARBA SMART (bioMérieux, France) was used.

2.3.7. Resistant bacterial community analysis

The composition of the resistant bacterial communities was analyzed using TTGE method. Bacterial DNA was extracted from colonies harvested from TSA media supplemented or not with ATBs, by enzymatic method (MasterPure Gram positive DNA purification kit, Epicentre, France) according to the manufacturer's recommendations. DNA yield was quantified at 260 nm and its purity was estimated by the ratio (OD_{260}/OD_{280}) using spectrophotometer (Eppendorf BioSpectrometer, Hamburg, Germany). Extracts were then diluted to a final concentration of 50 µg/mL.

A 199 bp fragment overlapping the 16S rRNA gene V3 variable region was amplified using the primers HDA1 (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT-3') and HDA2 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'). A 40-bp clamp, named GC (5'CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') flanked the 5' extremity of HDA1 (Michon et al., 2010) in order to form HDA1-GC. PCR mixture (25 µL) contained 1.25 units of Taq DNA polymerase in appropriate buffer (FastStart High Fidelity PCR system, Roche, Meylan, France), 200 µM of dNTPs, 0.2 µM of each primer (Sigma Genosys) and 25 ng of template DNA extract. PCR conditions were as follow: initial denaturation for 2 min at 95 °C, then 35 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 62 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min; with a final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were checked by electrophoresis in a 1.5% agarose gel before TTGE migration in the DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories) as already described (Michon et al., 2010). Briefly, the gels were 16 cm x 20 cm by 1 mm, composed of 16 mL bisacrylamide (40%), 33.6 g of urea, 80 µL of N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 1.6 mL of TAE (Tris/acetate/EDTA) buffer (50X), 36 ml of distilled water and 0.08 g ammonium persulfate (APS), and were run in 1X TAE buffer.

Amplified DNA (6 µL) was loaded on the gel with 6 µL of in-house dye marker (50% sucrose, 0.1% bromophenol blue). The electrophoresis conditions were 46 V for 16 h with an initial temperature of 63 °C and a final temperature of 70 °C corresponding to an increase of 0.4 °C h⁻¹. In order to obtain thin discrete bands, a pre-migration for 15 min at 63 °C and 20 V was done after loading. Pre-migration and migration were performed with additional magnetic shaking in the electrophoresis chamber. Gels were stained for 15 min with 40 µL ethidium

bromide (10 g/L) in 1X TAE buffer, washed for 45 min in 1X TAE buffer, and photographed under UV illumination.

For TTGE band sequencing, bands were excised and washed twice in sterile water and DNA was eluted in 10 mM Tris buffer (pH 8.5). PCR amplification of the 16S rRNA gene V3 region were performed using 1 μ L band eluate, the primers HDA1-HDA2 and the following PCR reaction mix: 25 μ L reaction mixture containing 0.2 μ M of each primer, 200 μ M each dNTP, 2.5 mM MgCl₂ and 1.25 U Taq DNA Polymerase (GoTaq G2 flexi, Promega) in the appropriate 1X buffer. PCR conditions are those described above. PCR products were checked by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and sequenced on an Applied Biosystems automatic sequencer (Genewiz®). Each sequencing chromatograph was visually inspected and corrected. The sequence was analyzed by comparison with Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and RDPII databases (<http://rdp.cme.msu.edu/>) using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and seqmatch programs, respectively. The reference sequence with the highest percentage was used for Operational taxonomic units (OTUS) affiliation. A sequence was affiliated to a species-level OTU when the percent of sequence similarity was above 99.5% as it is recommended (Drancourt et al., 2000). This value is over the recognized cut-off value for the delineation of species (Stackebrandt and Goebel, 1994), but warrants high stringency for species-level OTU affiliation. Between 97.0 and 99.0% identity, the sequence is affiliated to the genus of the reference sequence with the highest percentage. When several species reference sequences match equally, affiliation was done to the genus level.

2.3.8. Bacterial identification

Colonies were selected based on their morphotypes for identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Germany). Identification was satisfactory when the index was >2 for only one species. When MALDI-TOF MS failed to identify isolates, 16S rRNA gene sequencing was performed. One isolated colony was suspended in 50 μ L of sterile distilled water, and the DNA was rapidly extracted by a method involving boiling and freezing (Snelling et al., 1996). The 16S rRNA genes were amplified by PCR using universal sequences primer 27f (5'-GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') as the forward primer and 1492r (5'-CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTACGACTT-3') as the reverse primer (Frank et al., 2008). The PCRs were carried out in 25 μ L of reaction mixture containing 0.2 μ M (each) primer, 200 μ M of deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1 U of Taq polymerase (FastStart High Fidelity PCR

system) in the appropriate reaction buffer (1X), and 0.5 µL of crude DNA extract. Amplification conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 1 min, at 65 °C for 1 min and at 72 °C for 2 min, and a final extension step at 72 °C for 7 min. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis using 1.5% (w/v) agarose in 0.5X Tris-Borate-EDTA buffer at 100 V for 20 min. The gels were visualized and photographed under UV illumination. The PCR amplicons were sequenced on an Applied Biosystems automatic sequencer (Genewiz®) by using the forward primer 27f. Each sequencing chromatograph was visually inspected and corrected. The sequence was analyzed by comparison with Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and RDP-II databases (<http://rdp.cme.msu.edu/>) as already described.

2.3.9. Disk diffusion assay and resistance phenotype

For studying phenotypic antibiotic resistance, disk diffusion assays were performed according to the recommendations of the Committee of the antibiogram of the French society of Microbiology (CA-SFM, 2016). Colonies were suspended in saline to obtain a calibrated inoculum (McFarland standard of 0.5). Bacterial suspension was plated on Mueller-Hinton agar (MHA, Difco Laboratories, USA) and antibiotics discs (BioRad, France) were placed onto the agar medium surface. Cultures were incubated for 24 hours at 37 °C and the inhibition zone diameters were measured. Interpretation was performed according to the recommendations (CA-SFM, 2016). A more comprehensive analysis of resistance phenotype resistance was performed for some strains and was detailed in the article published in the *International Journal of Antimicrobial Agents* (IJAA) “NDM-5-producing-*Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France” presented in page 166 (Almakki et al., 2017).

2.3.10. Screening for resistance genes

Genes encoding OXA-48, VIM, NDM, KPC, SPM and IMP carbapenemases and IntI integrase were screened as already described (Mazel et al., 2000; Poirel et al., 2011). The PCR amplicons were sequenced on an Applied Biosystems automatic sequencer (Genewiz®). In depth analysis of some genes and their genetic environments was detailed in the article “NDM-5-producing-*Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France” presented in page 166 (Almakki et al., 2017).

2.3.11. Statistical analysis, clusterisation and partition

Total and ATB resistant communities CFU counts from culture plates were log transformed and the means were calculated for each site before comparison by explicative statistical tests. Normality of data was tested by Kolmogorov-Smirnov's test and equality of standard deviation by Fisher's test. If data were homogenous, compared by Student test. If data were normal but standard deviations were not, then compared by Welch's test. While non-homogenous data were analyzed by Mann-Whitney test. P values <0.05 were considered significant whereas P<0.01 were very significant and P<0.0001 extremely significant.

Multivariate analysis was carried out to determine the most significant water parameters within a large set of measurements shaping resistant microbial community composition and structure. Principal component analysis (PCA) was performed on centered and scaled data to reduce the large set of data without losing information. Correlations between variables were assessed by using Pearson's correlation coefficient or Spearman correlation coefficient.

Bacterial diversities among species were displayed graphically as dendrogram performed on similarity matrix computed with Dice coefficient, using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) algorithm (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>).

Intercategory correlation was calculated using the Adjusted Wallace Coefficient (AWC) using Comparing Partitions, an online tool for quantitative assessment of partition congruence (<http://www.comparingpartitions.info/>). AWC indicates the probability that two OTUs classified in the same category for a character will also be classified in the same category for another character.

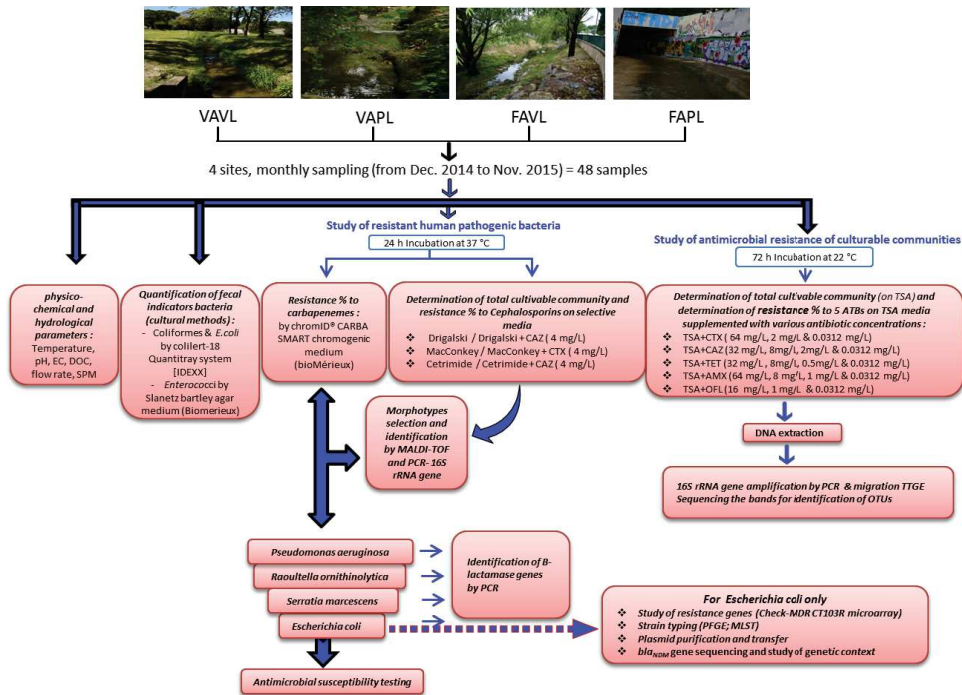


Fig. 24 : Logigramme du protocole expérimental Abbreviated: Electrical conductivity(EC), dissolved oxygen concentration (DOC), suspended particulate matter (SPM), amoxicillin (AMX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), ofloxacin (OFL) and tetracycline(TET), trypticase soy agar (TSA), Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE),Matrix-assisted laser desorption ionization time-flight mass-spectroscopy (Maldi-TOF MS), Operational taxonomic unit(OTUs), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus sequence typing(MLST)

2.4 Physico-chemical variations among sampling sites and dates

Water samples from Font d'Aurette (FA) river had significantly higher values than that from Verdanson river for the following physico-chemical parameters: pH ($P=0.0011$), electrical conductivity ($P<0.0001$), dissolved oxygen concentrations ($P=0.0301$), and flow rates ($P=0.0125$) as shown in **Table 4**. However, these parameters did not change significantly along Font d'Aurette River. By contrast in Verdanson, there is a significant increase in flow rates ($P=0.0186$) and electrical conductivity ($P<0.0001$) values downstream (VAVL) while the values of dissolved oxygen and pH significantly decreased from 10.28mg/L and 7.98 at upstream to 6.63mg/L and 7.70 at downstream ($P=0.0114$ and $P=0.0325$), respectively. Temperature and SPM values had not changed significantly despite its increase from upstream to downstream of the two rivers during the period of the study.

Table 4: Environmental parameter represented as means or mean Logs and standard deviation (S.D) in 4 the studied sites.

		FAVL	FAPL	VAVL	VAPL
Temperature (°C)	Mean (n=6)	11.68	13.25	11.4	13.38
	S.D.	5.19	4.62	5.04	3.66
pH	Mean (n=6)	7.98	8.13 ^a	7.98 ^b	7.7 ^{a,b}
	S.D.	0.19	0.16	0.46	0.17
Electrical conductivity (µS/cm)	Mean(n=6)	877.83 ^a	864.5 ^a	694.5 ^{a,c}	823 ^{a,c}
	S.D.	29.38	33.47	20.6	44.76
Dissolved oxygen (mg/L)	Mean(n=5)	10.57 ^a	9.92	10.28 ^b	6.63 ^{a,b}
	S.D.	2.55	2.12	1.97	0.71
Flow rate (L/s)	Mean(n=6)	2.99 ^a	3.35	1.29 ^{a,c}	3.47 ^c
	S.D.	1.06	1.52	0.26	1.53
Total coliforms/ml	Mean log (n=12)	2.31 ^d	3.49 ^{a,d}	1.8 ^c	2.68 ^{a,c}
	S.D.	1.13	0.77	1.07	0.79
<i>E.coli</i> /ml	Mean log (n=12)	1.53 ^d	2.11 ^d	0.86 ^c	1.73 ^c
	S.D.	1.21	1.12	0.93	0.81
Enterococci/ml	Mean log (n=6)	0.75 ^d	1.54 ^d	0.66	1.34
	S.D.	0.41	0.6	0.86	0.46
SPM	Mean log (n=10)	0.21	0.35	0.06	0.1
	S.D.	0.56	0.71	0.44	0.45

^a: significant differences between values of Font d'Aurette and Verdanson.

^b: significantly decreased values from upstream to downstream of Verdanson.

^c: significantly increased values from upstream to downstream of Verdanson.

^d: significantly increased values from upstream to downstream of Font d'Aurette.

2.5 Dynamics of bacteria in urban rivers

2.5.1 Dynamics of fecal indicator bacteria (FIB) contamination

The count of total coliforms significantly differed between the two rivers but not for other FIB (**Fig. 25A**). All fecal indicator bacteria (FIB) (total coliforms, *E. coli*, and *Enterococci*) were significantly increased in Font d'Aurelle after its course under the hospital (FAPL) where the highest rates of FIB were observed as compared to other sites (**Fig. 25**). For the two rivers, significant increase of FIB was observed for downstream sites: total coliforms and *E. coli* in Verdanson (VAPL) and every FIB in Font d'Aurelle (FAPL) (**Fig. 25A & 25B**). No obvious significant seasonal variations were observed (data not shown).

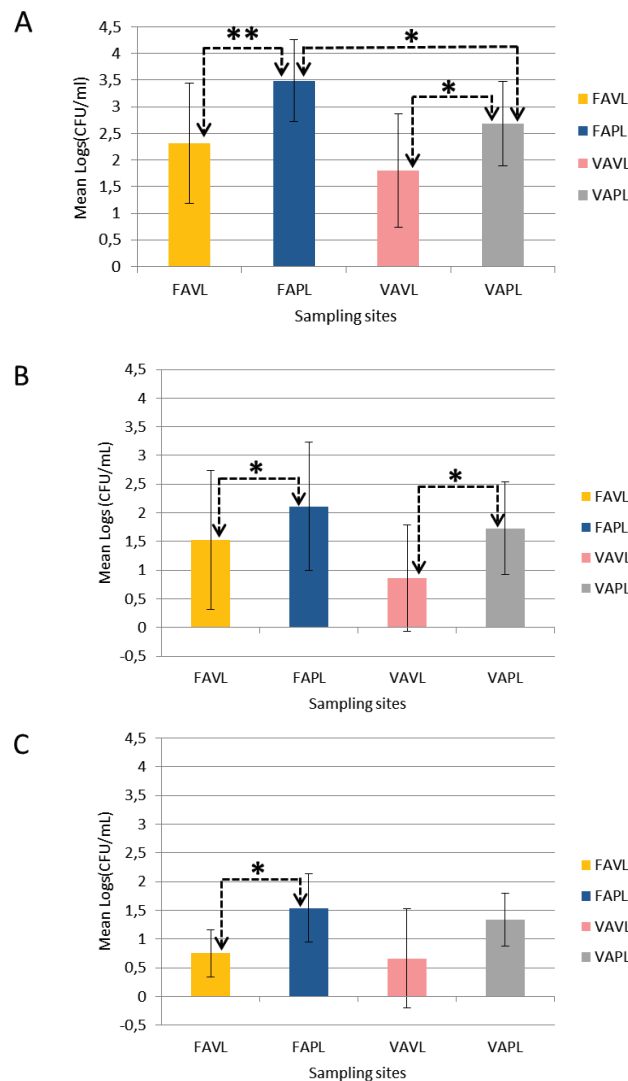


Fig. 25: Abundance of fecal indicator bacteria (FIB) in the 4 sampling sites expressed in mean Log values (CFU/mL). A) total coliforms ; B) *E. coli* ; C) Enterococci. Dashed arrows indicate significant differences (Student test: (*) P values <0.05 and (**) P values <0.01).

2.5.2 Abundance of the cultivable bacterial community

The mean values of cultivable (mesophilic) bacteria in the two rivers showed an increase in CFU between samples collected upstream and downstream. In Font d'Aurette River, about 4.31 Logs were count in upstream site (FAVL) and 5.09 Logs in downstream site (FAPL) (significant difference). The difference between upstream and downstream sites was lower and non-significant for Verdanson: 3.89 Logs upstream (VAVL) and 4.28 Logs downstream (VAPL) (**Fig. 26**). The highest bacterial concentrations were isolated from Font d'Aurette at downstream site (FAPL) after its course under the hospital. These concentrations were significantly higher than upstream samples of the same river ($P < 0.0371$) and downstream samples of Verdanson River ($P < 0.0245$), after its course under urbanized (but not peri-hospital) area.

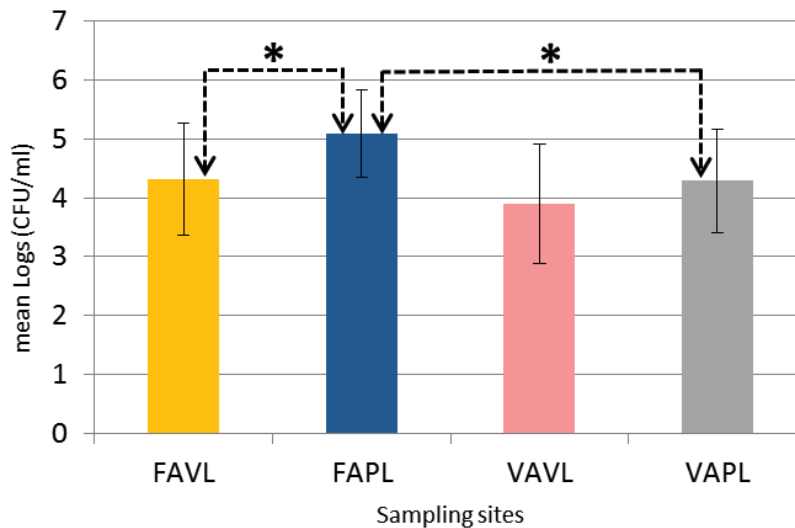


Fig. 26: Distribution of total cultivable bacterial communities expressed in mean log (CFU/ml) in the Font d'Aurette and Verdanson rivers. Whisker: mean \pm standard deviation. Dashed arrows indicate significant differences (Student test: (*) P value < 0.05).

Despite evenly variations according to date of sampling, the abundance of cultivable bacterial communities in the two rivers were higher during warm season (spring and summer) than in cold season (winter and autumn). The highest total bacterial count during both seasons was detected in Font d'Aurette River downstream (FAPL). Significant differences ($P < 0.05$) between the bacterial communities during cold and warm seasons were observed upstream and downstream along Font d'Aurette River and upstream only in Verdanson River. Another significant difference was detected between the total bacterial communities of Font d'Aurette downstream and upstream ($P < 0.05$) during cold season (**Fig. 27**).

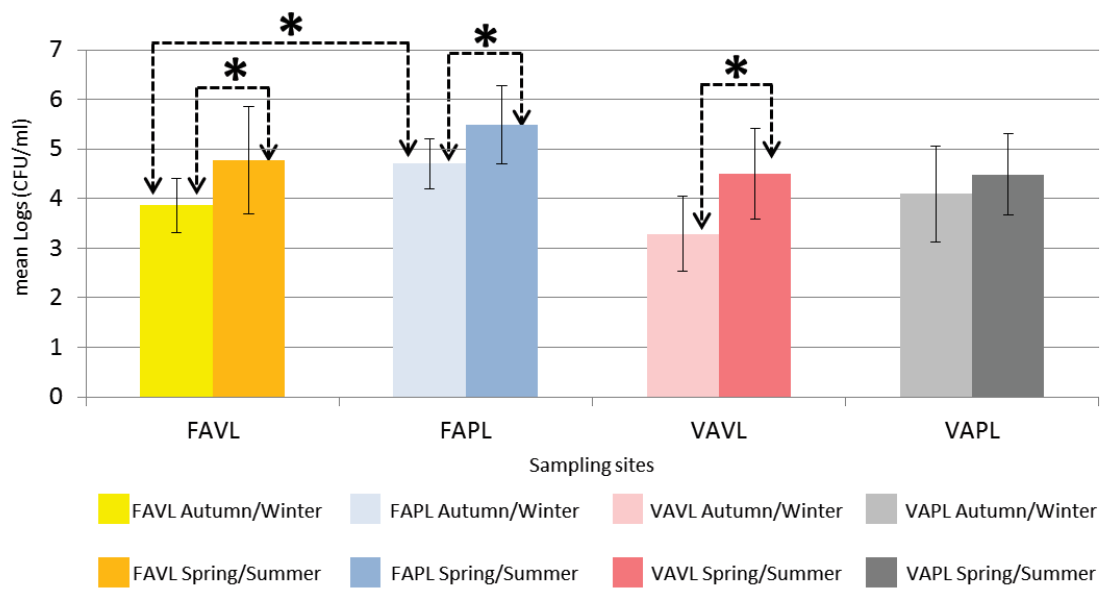


Fig 27: Seasonal variation of total communities in the study area. (*) P values <0.05



Box 1

General assessment of water quality

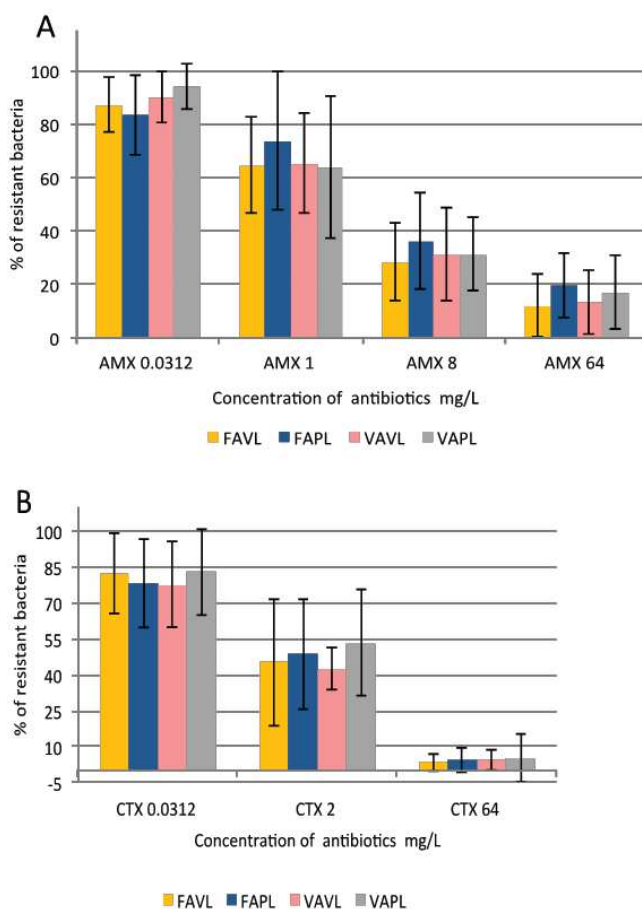
Main results	possible explanation
➤ Downstream of Font d'Aurelle is the most fecally contaminated site	-Additional discharge of fecal matters from the perihospital area into the river by runoff water
➤ Decreased total cultivable bacteria in cold season and increased prevalence in warm season	- Dilution by rainfall and runoff water in cold season. -Enhanced bacterial growth by elevated temperature during warm season.

2.6 Dynamics of resistant bacteria in urban rivers

2.6.1 Abundance and spatial dynamics of resistant communities

We tested all ATBs at 3 or 4 concentrations for community growth. The average percent of cultivable community growing on plates with ATBs were recorded. The lower concentration of ATBs 0.0312 mg/L had a slight decreasing effect on the cultivable community abundance (Fig. 28). This effect was particularly marked for CTX and OFL (Fig. 28B and D). At the critical breakpoint concentrations defining resistance in medicine, the percent of resistant bacteria were particularly high for cefotaxime (47.40% for 2 mg/L), for ceftazidime (34.17% for 8 mg/L) and for amoxicillin (31.79% for 8 mg/L). Finally, one third to half of the cultivable community in the rivers were resistant to β -lactams at a concentration used in therapeutics. The levels of resistance in the rivers were lower for OFL (20.21% for 1 mg/L) and TET (4.16% for 8 mg/L) (Fig. 28).

Finally, about 20% of the cultivable community resisted to the highest concentration of AMX and CAZ (Fig. 28A and C). This rate was lower for other ATBs.



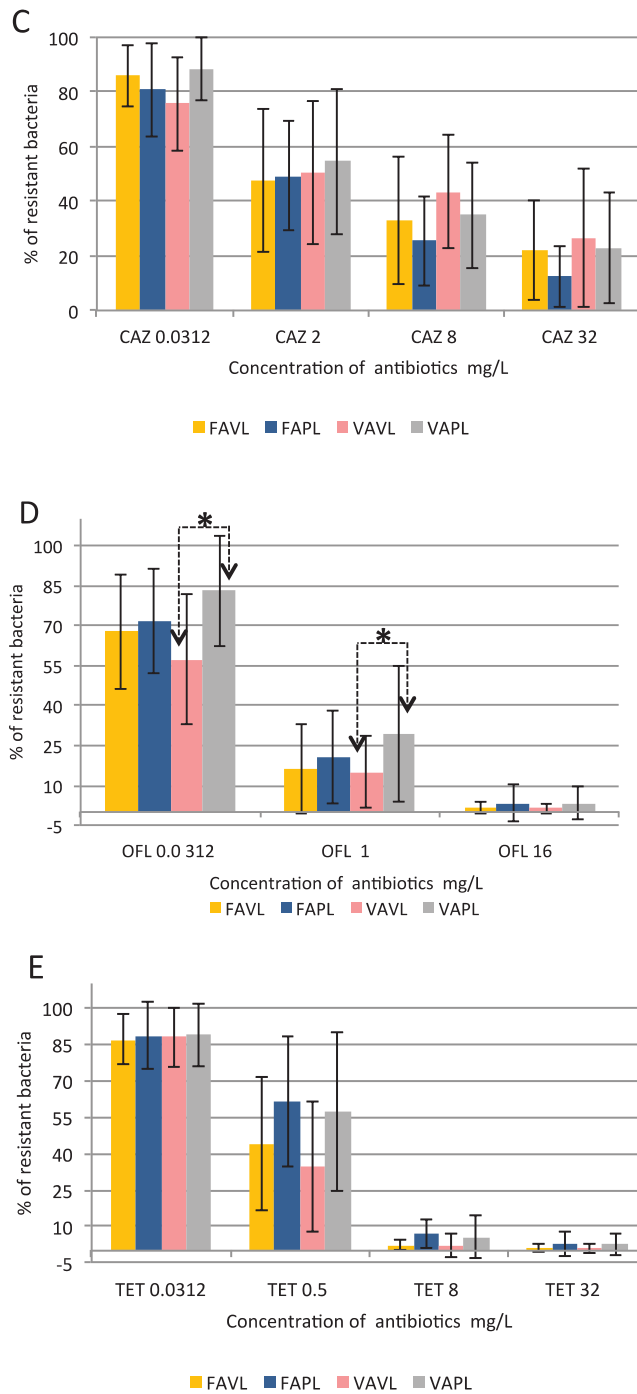


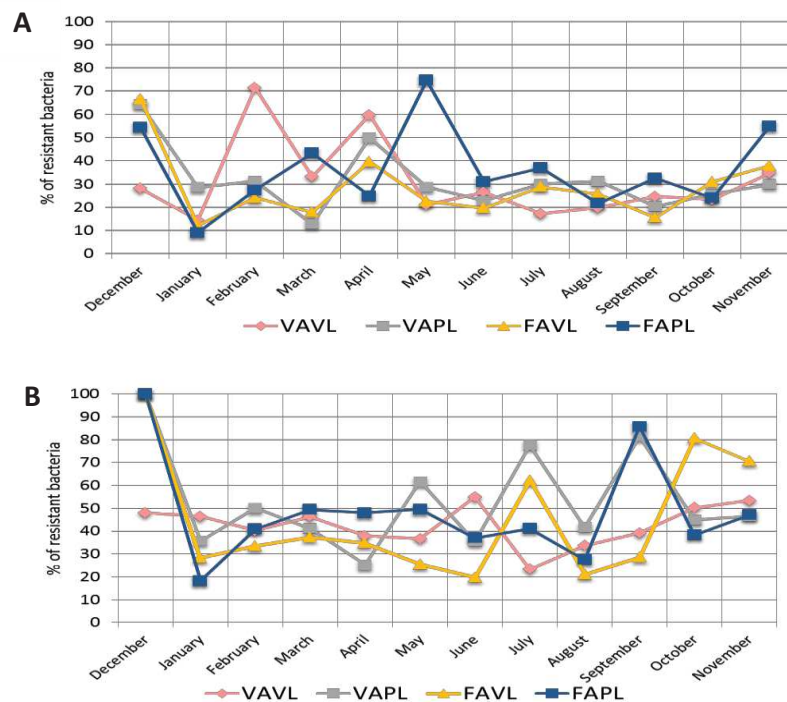
Fig 28: Mean resistance percentages (%) of bacterial communities isolated from Font d’Aurelle and Verdanson Rivers to 5 antibiotics at different concentration during period of 12 months. A) AMX; B) CTX; C) CAZ; D) OFL; E) TET. Whisker: mean± standard deviation. Dashed arrows indicate significant differences (using student and Mann-Whitney tests). P values <0.05.

The overall comparison and the comparison for every ATB concentration showed that there was no significant difference in the rate of ATBs resistance between upstream and downstream sites of the two rivers (**Fig. 28**). The only exception was resistance to OFL, for

which significant differences were observed between upstream (VAVL) and downstream (VAPL) in Verdanson River at the concentrations of 1 and 0.312 mg/L ($P < 0.05$) (**Fig. 28**). Consequently, the influence of the hospital on the overall resistance of the bacterial communities in Font d'Aurelle River water was not observed for any ATB at any concentration.

2.6.2 Temporal and seasonal dynamics of the resistant communities

The annual dynamics of resistant rates were studied for concentrations corresponding to clinical breakpoints (**Fig. 29**). Elevated resistance rates were detected at the beginning of the study in December 2014 for all tested ATBs at most sampling sites. After that, the resistance rates fluctuated during the year, the rate in the 4 sites being either correlated or not (**Fig. 29**). The dynamics of OFL appeared particularly chaotic without predictable tendency but resistance rate to OFL presented dramatic increases in May and June at downstream sites only (**Fig. 29D**). The low rate of TET resistance was observed all over the year with sporadic small increases (**Fig. 29E**). Resistance to some β -lactams such as AMX and CTX presented similar dynamics with sporadic peaks for some sampling sites independently on upstream/downstream locations and on rivers (**Fig. 29A and B**). By contrast, CAZ resistance appeared the most regular with gradual decrease on resistance rate in spring and summer and a re-increase in fall and winter (**Fig. 29C**). Again, this dynamics appeared not depending on upstream/downstream locations and on rivers.



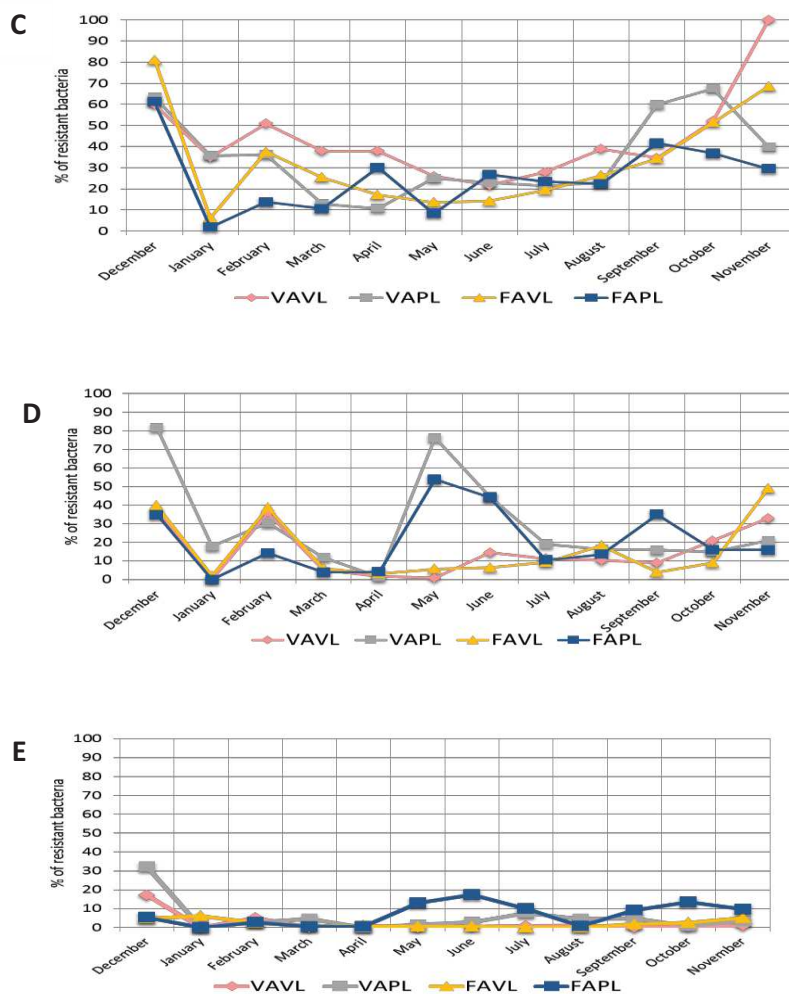
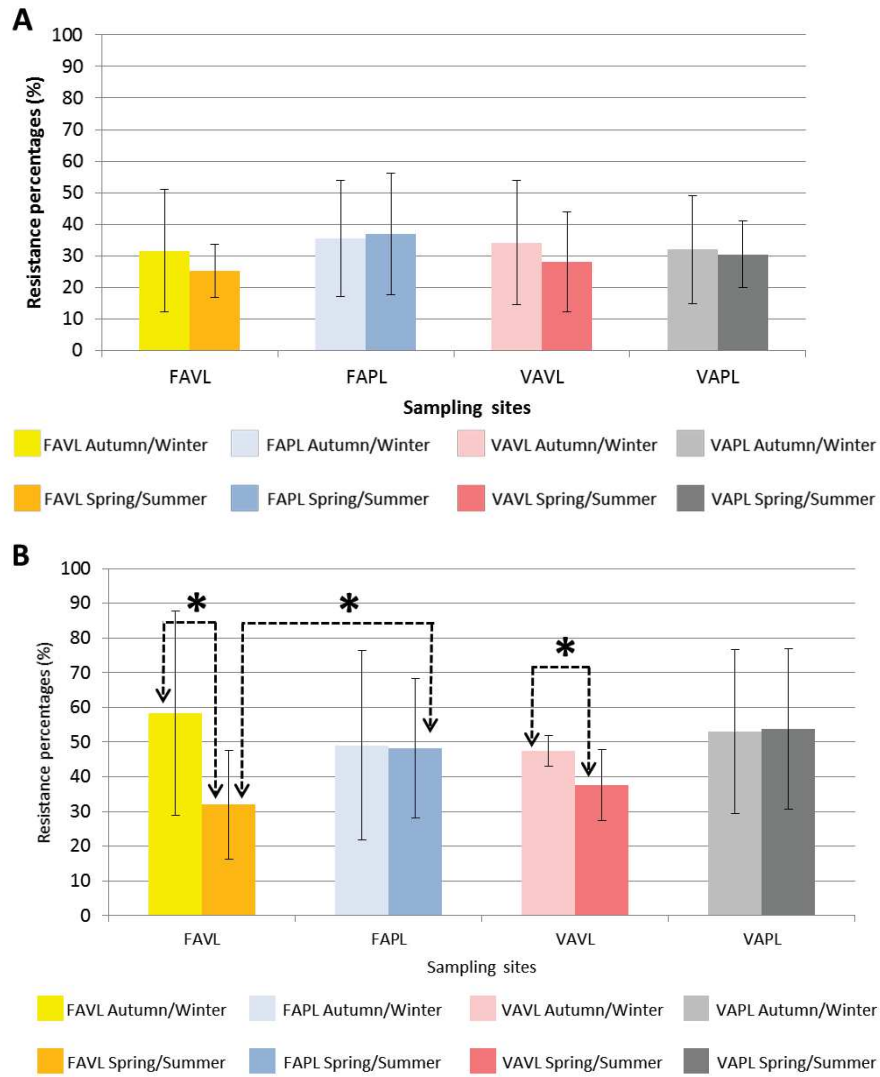


Fig 29: Annual dynamics of resistance percentages in bacterial communities isolated from the 4 sampling sites. Font d’Aurelle upstream (FAVL) and downstream (FAPL); Verdanson upstream (VAVL) and downstream (VAPL); Amoxicillin (AMX) (A), Cefotaxime (CTX) (B), Ceftazidime (CAZ) (C), Ofloxacin (OFL) (D) and Tetracycline (TET) (E).

Results were then analyzed according to seasons: warm season from April to September and cold season from October to March. Higher resistance rates were observed for all ATBs in cold season, except an opposite tendency (not significant) observed for OFL and TET in FAPL. Significant differences ($P < 0.05$) in resistance rates between warm and cold seasons were observed for CTX and CAZ at upstream sites in the 2 rivers. It was also the case for OFL resistance upstream in Verdanson River (VAVL) and for TET resistance upstream Font d’Aurelle River (FAVL) (**Fig. 30D and E**). Significant differences ($P < 0.05$) in resistance rate between upstream and downstream sites were observed in warm season only, for OFL and TET in both rivers and for CTX in Font d’Aurelle River (FA) (**Fig. 30B, D and E**). By contrast, AMX and CAZ resistant communities were not significantly increased from upstream to downstream, whatever the season (**Fig. 30A and C**).

The β -lactams resistant communities isolated downstream of the two rivers and particularly downstream the hospital area (FAPL) had approximately the same rates during warm and cold seasons. No significant differences between seasons were observed for AMX resistance rates in both rivers (**Fig. 30A**).



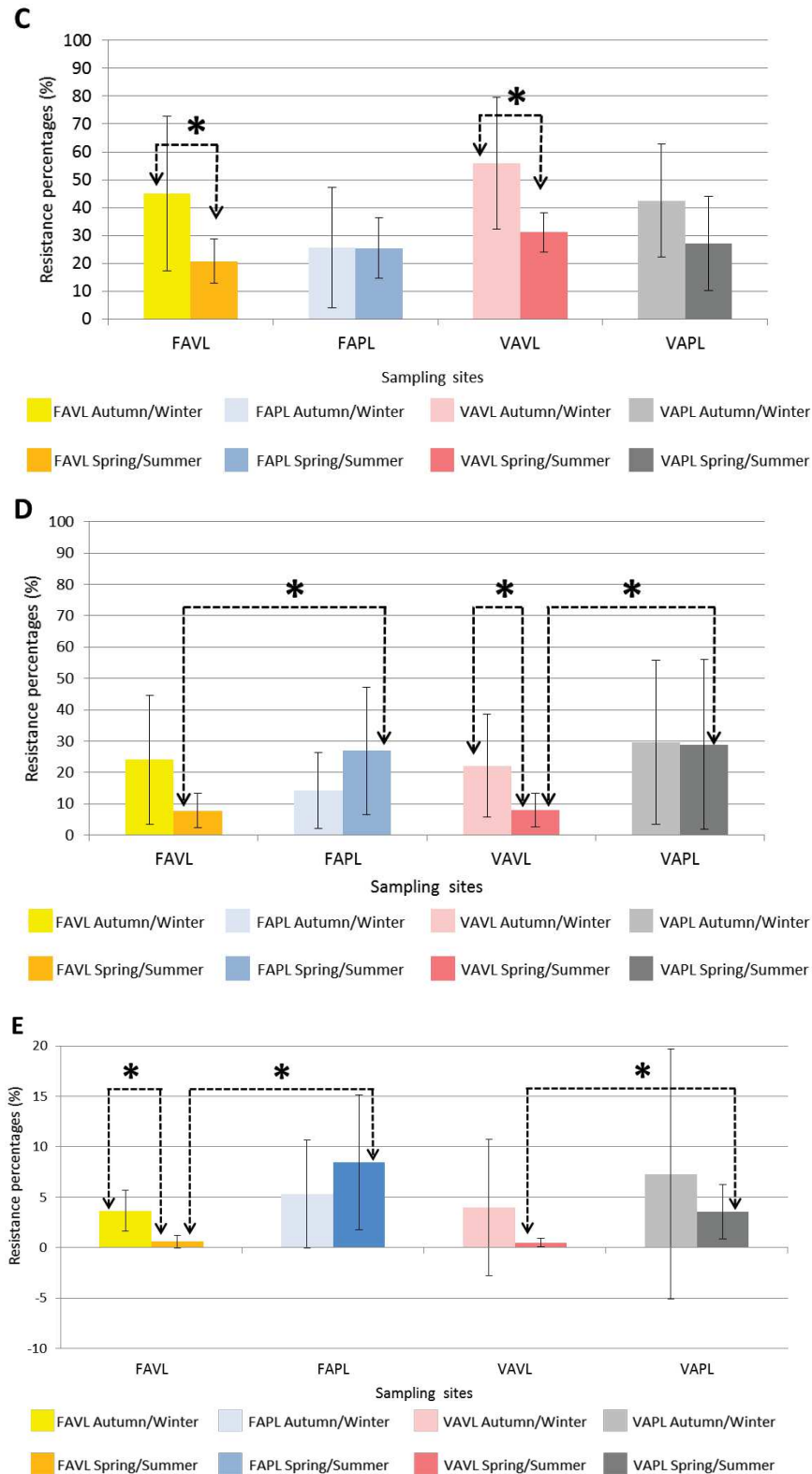


Fig 30: The mean resistance percentages (%) from water samples from Font d'Aurelle and Verdanson rivers during cold season (Autumn/Winter) and warm season (Spring/Summer) for 5 antibiotics: A) Amoxicillin (AMX), B) Cefotaxime (CTX), C) Ceftazidime (CAZ), D) Ofloxacin (OFL) and E) Tetracycline (TET). Whisker: mean \pm standard deviation. Dashed arrows indicate significant difference (using one or two of Mann-Whitney, Student and Welch's tests). P Values < 0.05.



Box 2

General assessment of resistance reservoir

Main results	possible explanation
➤ Decline resistance percentages by increasing the concentrations	<ul style="list-style-type: none">- High concentration kill all susceptible bacteria- Low concentration leads to apparently high resistance
➤ Low susceptibility to β -lactams even at high concentrations	-Wide and inappropriate use of ATBs in the community
➤ High fluoroquinolone susceptibility at very low concentration	-Preserved ATB activity due to low rate of consumption
➤ The two rivers communities had low resistance to Tetracycline	-No agricultural practices and livestock farms
➤ Increased prevalence of resistant bacteria during cold season	<ul style="list-style-type: none">- Increased introduction of resistant bacteria from rainfall and sediment- Increased selection due to increased ATBs consumption
➤ Equal resistance rates to β -lactams during both seasons in both downstreams	- Sustained anthropic pressure during both seasons including hospital

2.6.3. Correlation among the rate of ATBs resistant bacteria, fecal indicator bacteria and environmental parameters

Several Principal Component Analyses (PCA) were applied to determine the most significant water parameters that shaped the ATBs resistant communities in the urban river waters (**Fig. 31**). A PCA on all data from each river was first done (PCA1), revealing in Font d'Aurelle exceptional high values of both total coliforms and *E. coli* quantities in June downstream the river. These 2 values were removed from the PCA in order to increase the representations of all variables (PCA2). Secondly, other PCA were done for each river, removing data on ATBs resistance or FIB (PCA3). The significance of correlation coefficients (Pearson or Spearman) for each relationship between 2 variables was then studied.

Concerning physical and chemical parameters of Font d'Aurelle River water, the 2nd PCA showed that temperature was positively correlated with conductivity and both of them were inversely correlated with dissolved oxygen concentration (**Fig. 31A**, axe 2, vertical). Temperature was negatively correlated with water flow. Only negative correlation coefficients between temperature and dissolved oxygen ($r=-0.657$, $p=0.0105$) and water flow ($r=-0.7903$, $p=0.0002$) were significant.

PCA 1 on variables of Verdanson River (**Fig. 31C**) showed a positive correlation between pH and oxygen on one hand, and flow rate and conductivity on the other hand (**Fig. 31C-axe 1, horizontal**). Both pH and oxygen were negatively correlated with flow and conductivity. These correlations are significant, except between pH, flow rate and conductivity. Correlations of the temperature with other physico-chemical parameters were ambiguous for Verdanson River. Indeed, as seen previously in part 2.3, mean values of conductivity and water flow downstream the river were significantly higher compared to upstream values, whereas dissolved oxygen and pH were lower. This was particularly true in the cold season, and the correlations of the temperature with the other parameters varied in consequence: once positively correlated with flow rates and conductivity and negatively with pH and dissolved oxygen, once inversely correlated with the same factors.

Physical and chemical parameters were correlated to FIB abundances in both rivers as their occurrences were positively correlated with temperature and electrical conductivity values in Font d'Aurelle River (**PCA 3, Fig. 31B-axe 1, horizontal**) and with electrical conductivity and flow rate in Verdanson River (**Fig. 31C-axe 1 horizontal**). In contrast, they were inversely correlated with dissolved oxygen concentration (DOC) in the two rivers (**Fig. 31B and C, axe 1**). In addition to that, pH of water in Verdanson River also negatively influenced the occurrence of FIB (**Fig. 31C, axe1**). The correlation coefficients associated with all these

relationship are mostly significant, but only true in Font d'Aurelle River for total coliform contents.

Considering ATBs resistance, PCA was performed for the concentration corresponding to the clinical breakpoint concentrations (AMX 8 mg/L, CTX 2 mg/L, CAZ 8 mg/L, OFL 1 mg/L and TET 8 mg/L). Environmental parameters of both rivers had no influence on resistant communities, except for the TET resistant community in Font d'Aurelle River, which appeared positively correlated with temperature and conductivity and inversely correlated with dissolved oxygen concentration (DOC) (**Fig. 31A axe 2**). Only the negative correlation with dissolved oxygen was significant ($r=-0.469$, $p=0.045$). In Font d'Aurelle, the rate of TET resistance appeared to be non-correlated with the rates of other ATBs resistance. Except TET, the rates of AMX, CTX, CAZ and OFL resistance were influenced by each other. However, the correlation coefficient of TET resistance with other ATBs resistance appeared to be significant ($p>0.05$ in all cases). The abundance of ATB resistant bacteria appeared to be negatively correlated with *E. coli* count (**Fig. 31A, axe1**), but this correlation was not significant. For Verdanson, the rates of CTX, OFL and TET resistance were also significantly positively correlated with each other, but not with AMX and CAZ resistance (**Fig. 31C, axe2**).

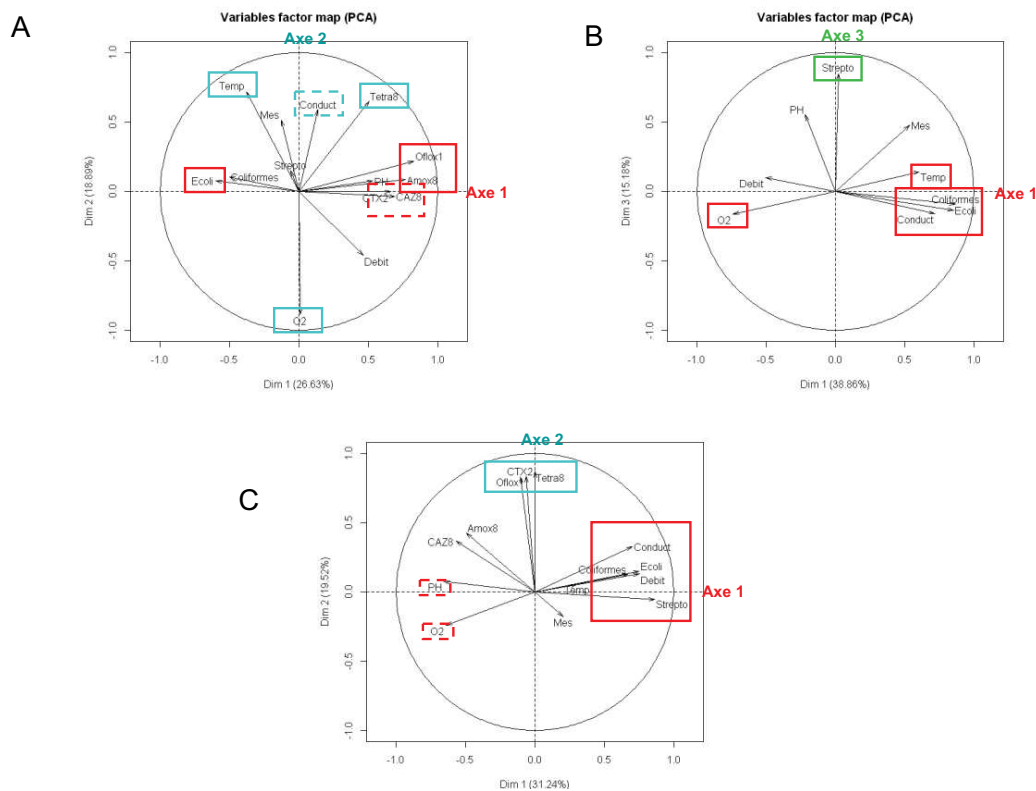


Fig 31: Principal component analysis (PCA) of the most significant water variables and fecal indicator bacterial Community shaping the resistant microbial community composition in Font d'Aurelle river (A & B) and Verdanson river(C) (Tem: temperature; Conduct: conductivity; Amox8: amoxicillin 8 mg/L; CTX2: cefotaxime 2 mg/L, CAZ8: ceftazidime 8 mg/L; Tetra8: tetracycline 8 mg/L; Oflox1: ofloxacin 1 mg/L; Strepto: enterococci; debit: flow rates; Mes: suspended particulate matter)

2.7. Metataxonomy of the river community and river resistant community

16S rRNA-TTGE was performed to determine the taxonomic repertory of the total cultivable bacterial community in urban rivers. A total of 597 TTGE bands obtained whatever the culture conditions were cut and sequenced. Among them, 592 were affiliated to an OTU (**Table 5**) and 5 were non-affiliated due to low quality of sequencing. The diversity index (DI) representing the crude OTU diversity by sample ranged from 2 to 20. In a given site, variations according to the presence and the concentration of AMX were slight, indicating a low vulnerability of the communities vis-à-vis selective pressure of AMX (**Fig. 30**). In each site, the DI evolved concordantly for the total community and for the community growing at low concentration of AMX. The diversity index at higher AMX concentration (8 mg/L) was also related to that of the total community with some sporadic divergences, for instance in the first 3 months of the study in Verdanson downstream (VAPL) (**Fig. Fig.32B**). In conclusion, AMX had slightly impacted the quantitative diversity of the communities. What about qualitative impact.

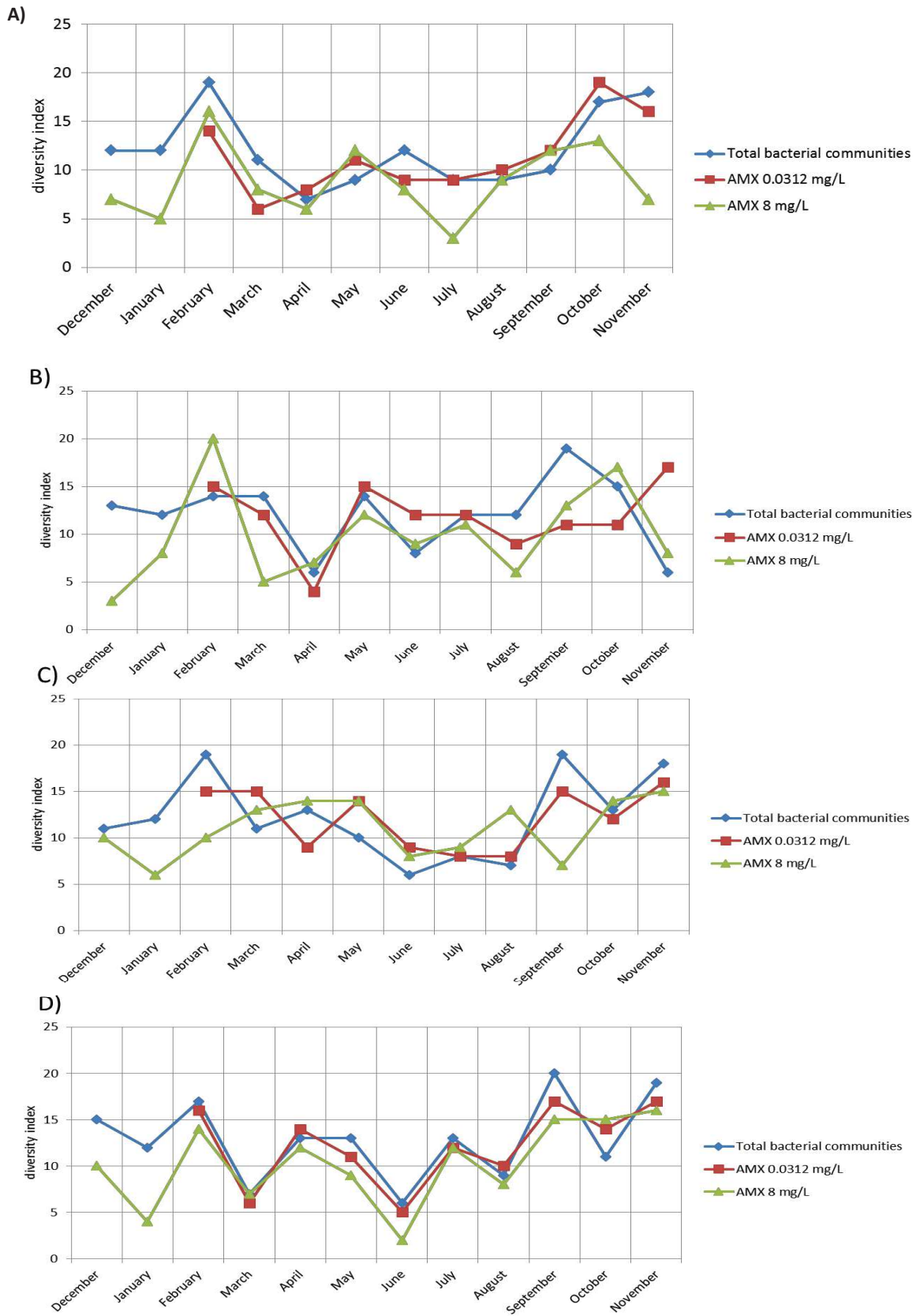


Fig 32: Diversity representation by of OTUs of total and AMX-resistant communities at 0.0312 and 8 mg/L during 12 months period of study A) VAVL; B) VAPL; C) FAVL and D)FAPL

The OTUs were distributed in 13 bacterial families, 30 genera and 71 species. They were equally distributed among sites with about 25% of the OTUs detected in each site. The most frequently detected families at every site were *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Flavobacteriaceae* and *Moraxellaceae*. As shown in **Figure 33**, the rate of every family was rather stable according to river and site. The rate of the dominant family, *Enterobacteriaceae*, increased downstream in Verdanson River (VAPL) as compared to upstream (VAVL) but not in Font d'Aurelle River.

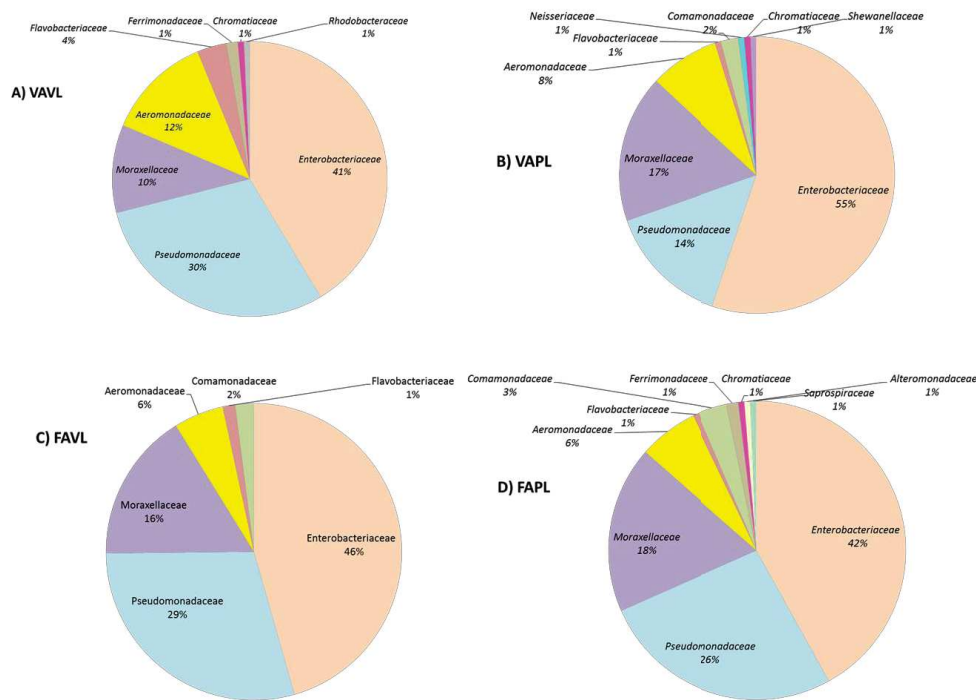


Figure 33: Distribution of bacterial families of the cultivable community according to sampling sites

The species and genera in *Enterobacteriaceae* were distributed among site without obvious particularity. The genera *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Escherichia* dominated the communities. The number of OTUs affiliated to *E. coli* was higher in VAPL than in VAVL as observed for FIB detection but for FAVL and FAPL TTGE repertory was not correlated to FIB detection. Considering *Pseudomonadaceae* and *Moraxellaceae*, the species recognized as the most pathogens (*P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*) were detected in FAPL only while other members of the genera *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were detected in every site (**Table 5**).

Among minority OTUs, members of *Comamonadaceae* and *Chromatiaceae* were detected in all sites except VAVL and FAVL, respectively. Members of the family *Ferrimonadaceae* were detected in VAVL and FAPL only while other OTUs belonged to different families were specific for one site: *Rhodobacteraceae* from VAVL, *Neisseriaceae* and *Shewanellaceae* from VAPL, *Alteromonadaceae* and *Saprospiraceae* from FAPL (**Fig. 33**).

The diversity of the community structure was then studied according to the date, the site of sampling and the condition of growth (no ATB, AMX at low and high concentrations). The results were presented in **Figure 34** for Verdanson River and in **Figure 35** for Font d'Aurelle River. The community structure in the two rivers appeared very diverse and variable.

In Verdanson, UPGMA clusterisation showed 4 main clusters at 40% similarity (**Fig. 34**). Every cluster gathered both upstream and downstream samples even if cluster C3 communities were mainly found downstream and C4 upstream. But within a cluster, sub-clusters were more linked to date or to site. For instances, C2a, b and c were related to dates while C3a, b and c were linked to sampling site (but not C3d). The communities growing with or without AMX were evenly distributed in every cluster, indicating the low impact of this ATB onto the overall community structure (**Fig. 34**).

To the family level (**Fig. 36**), the dynamics of Verdanson River community structure was clearer with various equilibria among enterobacteria, pseudomonads, *Moraxellaceae* and aeromonads according to samples. The increased prevalence of pseudomonads and decrease of enterobacteria was linked to cold season. The impact of AMX in the growth medium on the community structure was not obvious both for family prevalence and OTUs diversity. Only, a slight increase of pseudomonads prevalence in presence of 8 mg/L AMX was observed (**Fig. 36**).

Concerning Font d'Aurelle River (**Fig. 35**), 5 UPGMA clusters were defined at 50% similarity. The community structure was poorly linked to sampling sites, with only the small clusters 2 and 4, which were specific to upstream sites. By contrast the community structures gathered in the large cluster 3 did not corresponded to sampling site, even if sub-cluster level was considered.

To the family level (**Fig. 37**), as observed for Verdanson River the dynamics of Font d'Aurelle River community structure corresponded to various equilibria among enterobacteria, pseudomonads and *Moraxellaceae* according to samples. Aeromonads were less involved in global dynamics than observed in Verdanson. Again, the increase of pseudomonads diversity was roughly linked to cold season. As observed in Verdanson, the impact of AMX added in growth medium on the community structure was not obvious for both family prevalence and OTUs diversity.

Table 5: OTUs identified at the four sampling sites and presented according to their family and their prevalence

Family	VAVL			VAPL			FAVL			FAPL		
	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs
Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i> sp.(12)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (7)	<i>Klebsiella</i> sp. (1)	<i>Enterobacter</i> sp.(16)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	<i>Klebsiella</i> sp. (2)		<i>Escherichia coli</i> (10)	<i>Klebsiella</i> sp. (5)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (7)	<i>Escherichia coli</i> (4)
		<i>Enterobacter</i> sp.(9)	<i>Klebsiella varicola</i> (1)		<i>Escherichia coli</i> (8)	<i>Escherichia hermannii</i> (1)		<i>Enterobacter</i> sp.(8)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (4)		<i>Enterobacter</i> sp.(10)	<i>Escherichia hermannii</i> (1)
			<i>Escherichia coli</i> (2)		<i>Enterobacter aerogenes</i> (7)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)		<i>Citrobacter freundii</i> (4)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)		<i>Citrobacter freundii</i> (7)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (4)
			<i>Enterobacter aerogenes</i> (4)		<i>Citrobacter</i> sp.(7)	<i>Raoultella</i> sp.(1)			<i>Escherichia</i> sp.(2)			<i>Enterobacter cloacae</i> (1)
			<i>Enterobacter cloacae</i> (1)		<i>Citrobacter freundii</i> (7)	<i>Serratia</i> sp.(5)			<i>Enterobacter aerogenes</i> (3)			<i>Enterobacter asburiae</i> (1)
			<i>Raoultella</i> sp. (1)			<i>Serratia proteamaculans</i> (1)			<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1)			<i>Raoultella</i> sp.(1)
			<i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)			<i>Serratia glossinae</i> (1)			<i>Raoultella ornithinolytica</i> (3)			<i>Raoultella ornithinolytica</i> (2)
			<i>Serratia</i> sp. (2)			<i>Proteus</i> sp.(1)			<i>Serratia</i> sp.(2)			<i>Serratia proteamaculans</i> (3)
			<i>Serratia liquefaciens</i> (1)			<i>Pantoea ananatis</i> (1)			<i>Serratia marcescens</i> (1)			<i>Serratia odorifera</i> (1)
			<i>Proteus</i> sp. (1)			<i>Morganella morganii</i> (2)			<i>Cronobacter</i> sp.(1)			<i>Proteus</i> sp.(1)
			<i>Pantoea agglomerans</i> (1)			<i>Rahnella aquatilis</i> (1)			<i>Cronobacter zurichensis</i> (1)			<i>Cronobacter sakazakii</i> (2)
			<i>Citrobacter</i> sp. (1)			<i>Erwinia piriflorigrans</i> (1)			<i>Pantoea</i> sp.(3)			<i>Cronobacter turicensis</i> (2)
			<i>Citrobacter freundii</i> (1)			<i>Ewingella</i> sp. (2)			<i>Citrobacter</i> sp.(3)			<i>Salmonella enterica</i> (1)
			<i>Yersinia frederiksenii</i> (1)			<i>Ewingella americana</i> (1)			<i>Yersinia enterocolitica</i> (2)			<i>Pantoea</i> sp.(5)
			<i>Yersinia massiliensis</i> (1)			<i>Kluyvera</i> sp.(1)			<i>Rahnella</i> sp.(1)			<i>Pantoea agglomerans</i> (1)
			<i>Yersinia rohdei</i> (1)			<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)			<i>Rahnella aquatilis</i> (2)			<i>Citrobacter</i> sp.(4)
			<i>Rahnella aquatilis</i> (1)			<i>Kluyvera ascorbata</i> (1)			<i>Plesiomonas shigelloides</i> (2)			<i>Yersinia frederiksenii</i> (2)
			<i>Pectobacterium carotovorum</i> (1)			<i>Lelliottia amnigena</i> (3)			<i>Pectobacterium</i> sp.(1)			<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)
			<i>Erwinia rhapontici</i> (2)			<i>Pantoea</i> sp.(4)			<i>Pectobacterium carotovorum</i> (1)			<i>Kosakonia</i> sp.(1)
			<i>Erwinia piriflorigrans</i> (3)						<i>Erwinia</i> sp.(1)			<i>Kluyvera</i> sp.(1)
			<i>Kluyvera</i> sp.(1)						<i>Erwinia chrysanthemi</i> (2)			<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)
			<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)						<i>Kluyvera</i> sp.(1)			<i>Kluyvera ascorbata</i> (1)
		<i>Pluribacter pyrinus</i> (1)						<i>Kluyvera ascorbata</i> (1)				
		<i>Lelliottia amnigena</i> (1)						<i>Lelliottia amnigena</i> (1)				
Total No. of OTUs n (%)	Enterobacteriaceae 60 (41%) ^a			Enterobacteriaceae 80 (55%) ^b			Enterobacteriaceae 67 (46%) ^d			Enterobacteriaceae 65 (42%) ^e		
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp. (37)		<i>Pseudomonas putida</i> (1)	<i>Pseudomonas</i> sp.(13)		<i>Pseudomonas fragii</i> (4)	<i>Pseudomonas</i> sp.(30)	<i>Pseudomonas fragii</i> (6)	<i>Pseudomonas putida</i> (1)	<i>Pseudomonas</i> sp.(25)	<i>Pseudomonas fragii</i> (9)	<i>Pseudomonas putida</i> (2)
			<i>Pseudomonas viridiflava</i> (1)			<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (1)			<i>Pseudomonas viridiflava</i> (2)			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)
			<i>Pseudomonas lurida</i> (1)			<i>Pseudomonas lurida</i> (2)			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (4)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)
			<i>Pseudomonas korensis</i> (1)			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)						<i>Pseudomonas montellii</i> (2)
			<i>Pseudomonas ottidisi</i> (1)									
			<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (1)									
Total No. of OTUs n (%)	Pseudomonadaceae 43 (30%) ^a			Pseudomonadaceae 21 (14%) ^b			Pseudomonadaceae 43 (29%) ^d			Pseudomonadaceae 41 (26%) ^e		
Moraxellaceae		<i>Acinetobacter</i> sp.(9)	<i>Acinetobacter junii</i> (1)	<i>Acinetobacter</i> sp.(12)		<i>Acinetobacter junii</i> (1)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (13)	<i>Acinetobacter</i> sp.(10)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (1)	<i>Acinetobacter</i> sp.(16)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (10)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)
			<i>Acinetobacter johnsonii</i> (3)			<i>Acinetobacter johnsonii</i> (4)						<i>Moraxella</i> sp. (1)
			<i>Acinetobacter lwojii</i> (1)			<i>Acinetobacter lwojii</i> (3)						
			<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (1)			<i>Acinetobacter guillouiae</i> (2)						
						<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (2)						
					<i>Perlucidibaca</i> sp.(1)							
Total No. of OTUs n (%)	Moraxellaceae 15 (10%) ^a			Moraxellaceae 25 (17%) ^b			Moraxellaceae 24 (16%) ^d			Moraxellaceae 28 (18%) ^e		

^{a,b,d,e} Number and (%) of family-level OTUs among (145, 145, 147, and 155) total OTUs in VAVL, VAPL, FAVL, and FAPL respectively.

Table 5: OTUs identified at the four sampling sites and presented according to their family and their prevalence (continued)

Family	VAVL			VAPL			FAVL			FAPL		
	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs	> 10 OTUs	5-10 OTUs	1-5 OTUs
<i>Aeromonadaceae</i>		<i>Aeromonas</i> sp.(10) <i>Aeromonas popoffii</i> (7)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)		<i>Aeromonas</i> sp.(6)	<i>Aeromonas veronii</i> (2) <i>Aeromonas hydrophila</i> (2) <i>Aeromonas popoffii</i> (2)			<i>Aeromonas</i> sp.(5) <i>Aeromonas veronii</i> (1) <i>Aeromonas hydrophila</i> (1) <i>Aeromonas schubertii</i>		<i>Aeromonas</i> sp.(7)	<i>Aeromonas media</i> (2) <i>Aeromonas hydrophila</i> (1)
Total No. of OTUs n (%)	<i>Aeromonadaceae</i> 18 (12 %) ^a			<i>Aeromonadaceae</i> 12 (8%) ^b			<i>Aeromonadaceae</i> 8 (6%) ^d			<i>Aeromonadaceae</i> 10 (6%) ^e		
<i>Flavobacteriaceae</i>			<i>Flavobacterium</i> sp.(4) <i>chryseobacterium</i> sp.(1)			<i>chryseobacterium</i> sp.(1)			<i>Flavobacterium</i> sp.(2)			<i>Elizabethkingia</i> sp. (1)
Total No. of OTUs n (%)	<i>Flavobacteriaceae</i> 5 (4 %) ^a			<i>Flavobacteriaceae</i> 1 (1%) ^b			<i>Flavobacteriaceae</i> 2 (1%) ^d			<i>Flavobacteriaceae</i> 1 (0.6%) ^e		
<i>Comamonadaceae</i>						<i>Comamonas</i> sp. (1) <i>Comamonas testosteroni</i> (1) <i>Variovorax</i> sp.(1)			<i>Comamonas</i> sp. (1) <i>Comamonas testosteroni</i> (1) <i>Verminephrobacter eiseniae</i> (1)			<i>Comamonas</i> sp. (3) <i>Comamonas jiangduensis</i> (1) <i>Acidovorax anthurii</i> (1)
Total No. of OTUs n (%)				<i>Comamonadaceae</i> 3 (2%) ^b			<i>Comamonadaceae</i> 3 (2%) ^d			<i>Comamonadaceae</i> 5 (3%) ^e		
<i>Ferrimonadaceae</i>			<i>Ferrimonas</i> sp.(1) <i>Ferrimonas marina</i> (1)									<i>Ferrimonas balearica</i> (1) <i>Ferrimonas gelatinilytica</i> (1)
Total No. of OTUs n (%)	<i>Ferrimonadaceae</i> 2 (1 %) ^a									<i>Ferrimonadaceae</i> 2 (1%) ^e		
<i>Neisseriaceae</i>						<i>Iodobacter</i> sp.(1)						
Total No. of OTUs n (%)				<i>Neisseriaceae</i> 1 (1%) ^b								
<i>Chromatiaceae</i>			<i>Rheinheimera tangshanensis</i> (1)			<i>Rheinheimera pacifica</i> (1)						<i>Rheinheimera pacifica</i> (1)
Total No. of OTUs n (%)	<i>Chromatiaceae</i> 1 (1 %) ^a			<i>Chromatiaceae</i> 1 (1%) ^b						<i>Chromatiaceae</i> 1 (1%) ^e		
<i>Alteromonadaceae</i>												<i>Microbulbifer maritimus</i> (1)
Total No. of OTUs n (%)										<i>Alteromonadaceae</i> 1 (1%) ^e		
<i>Shewanellaceae</i>						<i>Shewanella</i> sp.(1)						
Total No. of OTUs n (%)				<i>Shewanellaceae</i> 1 (1%) ^b								
<i>Saprosiraceae</i>												<i>Saprosira</i> sp.(1)
Total No. of OTUs n (%)										<i>Saprosiraceae</i> 1 (1%) ^e		
<i>Rhodobacteraceae</i>			<i>Rhodobacter</i> sp.(1)									
Total No. of OTUs n (%)	<i>Rhodobacteraceae</i> 1 (1 %) ^a											

a,b,d,e Number and (%) of family-level OTUs among (145, 145, 147 , and 155) total OTUs in VAVL, VAPL, FAVL, and FAPL respectively.

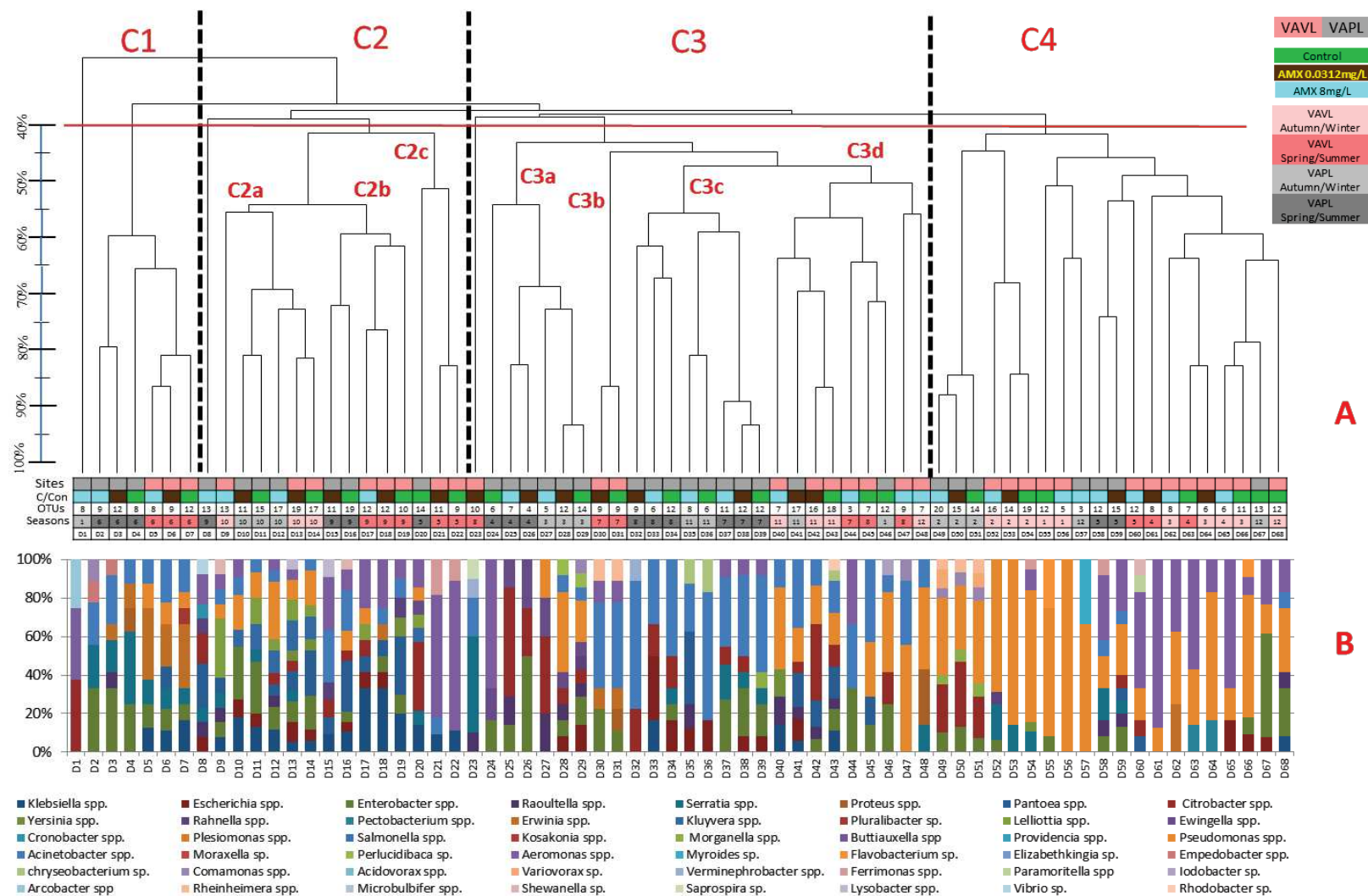


Fig. 34: A) UPGMA clusterisation of Verdanson River community profiles defined to the genus level and compared to sampling sites, to AMX concentration, to diversity index (crude number of OTUs) and to months/seasons. Clusters were defined at 40% similarity and between 50 and 60% similarities for sub-clusters. B) The Verdanson River community diversity presented in % of every genera forming the community with the conditions of culture and sampling specified in A); C/Con = control/concentration; Number in season case = month on the year; D = TTGE type

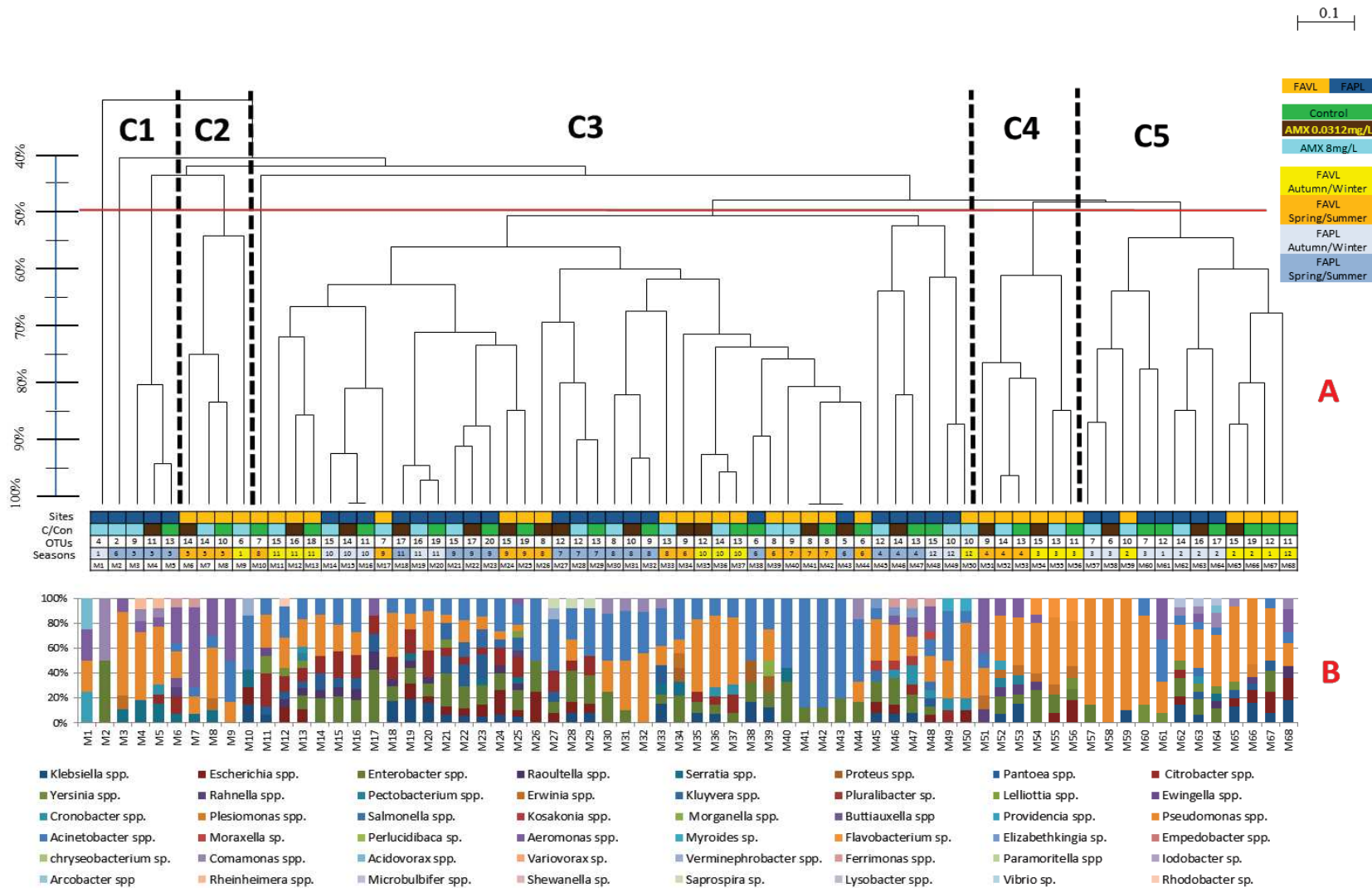


Fig. 35: A) UPGMA clusterisation of Font d'Aurelle River community profiles defined to the genus level and compared to sampling sites, to AMX concentration, to diversity index (crude number of OTUs) and to months/seasons. Clusters were defined at 50% similarity. B) The Font d'Aurelle River community diversity presented in % of every genera forming the community with the conditions of culture and sampling specified in A). C/con = control or AMX concentration; Number in season case = month on the year; D = TTGE type



Fig 36: Annual dynamics of family diversity of AMX resistant cultivable communities in Verdanson River. Distribution by family of OTUs growing A) without ATB selection, B) with 0.0312 mg/L of AMX and C) with 8 mg/L of AMX

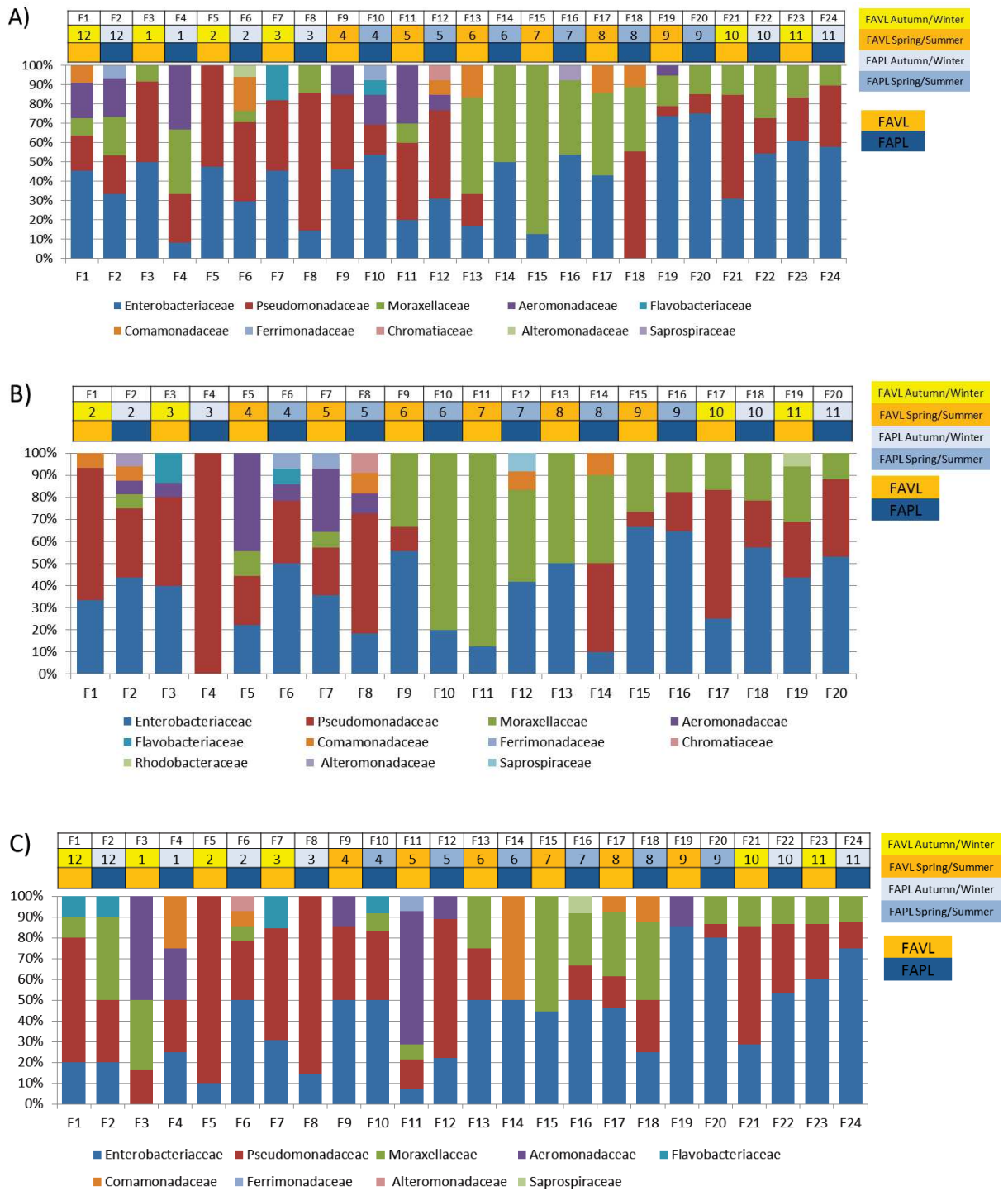


Fig 37: Annual dynamics of families diversity of AMX resistant cultivable communities in Font d'Aurelle River. Distribution by family of OTUs growing A) without ATB selection, B) with 0.0312 mg/L of AMX and C) with 8 mg/L of AMX



Box 3

General assessment of diversity of Amoxillin resistant community

Main results	possible explanation
<p>➤ Amoxillin variably impacted the total cultivable community during the study period</p>	<p>- TTGE allow analysis of major components of the bacterial community and any bacteria of low quantity cannot be evident on TTGE profile. As antibiotic impacts on the total bacterial community compositions regardless of their quantity, low quantity resistant bacteria could then become a major component in the OTUs.</p>

The resistance patterns of the communities appeared unrelated to UPGMA clusterisation. For instance, the clusterisation at 75% similarity defined several cluster among which very diverse resistance level was observed (**Fig. 38**). All communities showed multi-resistance (resistance to more than 3 ATBs) with highest frequency of resistance to CTX followed by CAZ and AMX whereas resistance to OFL was rare and to resistance TET was exceptional. The community isolated from downstream of Verdanson River (VAPL) in December (12) displayed the highest frequency of resistance to most ATBs. The determination of Adjusted Wallace Coefficient (AWC) among the parameters presented in Figure 38 showed no congruence except for API and the season, as awaited. Particularly, no congruence was observed between resistance profiles and sampling conditions (data not shown).

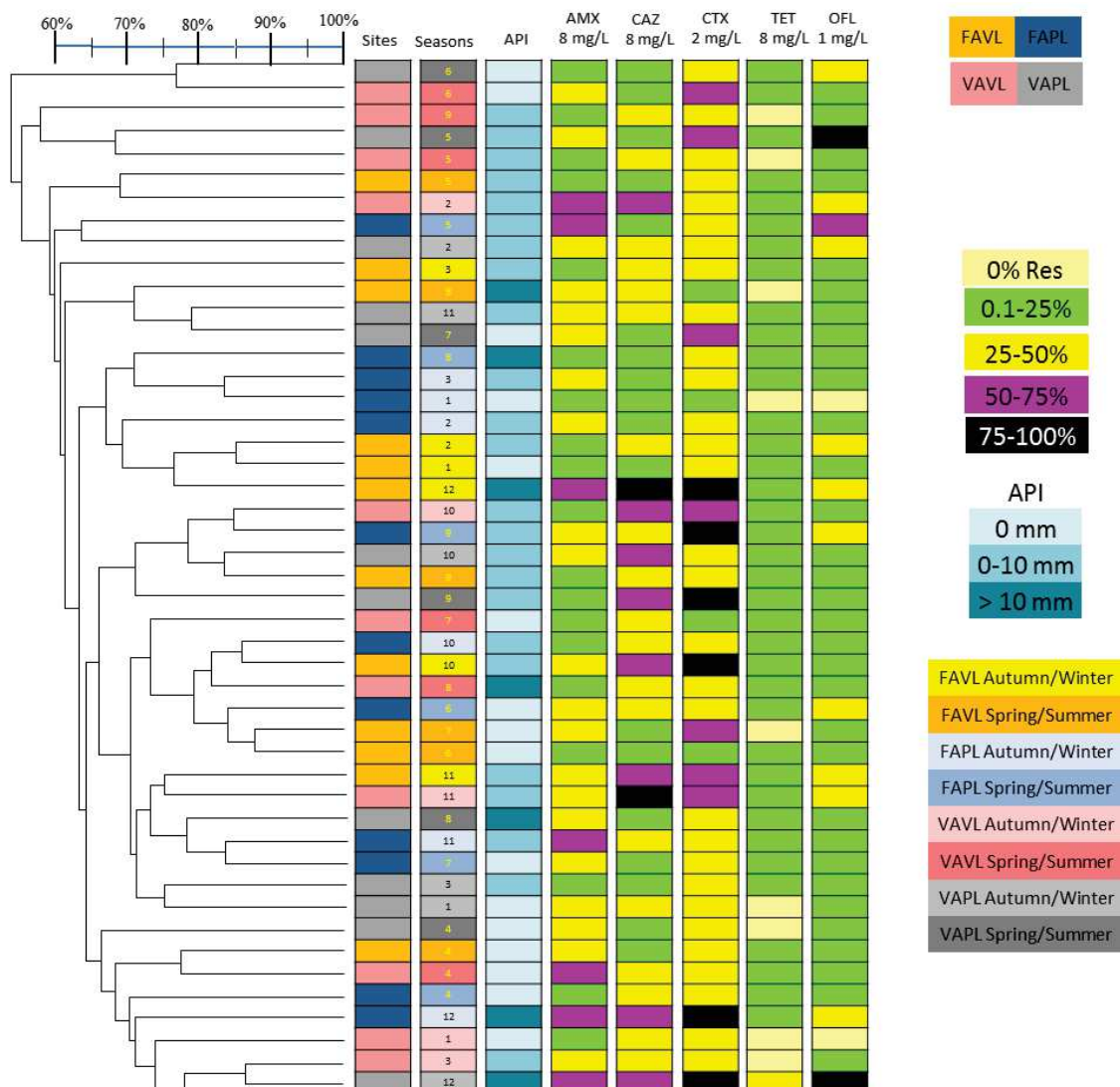


Fig. 38: UPGMA clusterisation of cultivable communities growing without ATB and compared to the resistance rate observed for the same communities against the 5 ATBs at the concentration of critical clinical breakpoints. The dashed red line corresponded to 75% similarity.

2.8. Occurrence of pathogenic bacteria resistant to third generation cephalosporin and carbapenem in urban river: qualitative and quantitative assessment

2.8.1. Occurrence of resistant bacteria follow-up during one year

Forty-eight water samples collected monthly from December 2014 to November 2015 were analyzed for the presence of ATBs resistant gram-negative bacteria. Of these 48 samples, 45 samples (94%) contained bacteria able to grow on Drig+CAZ 4 mg/L (**Fig. 39**).

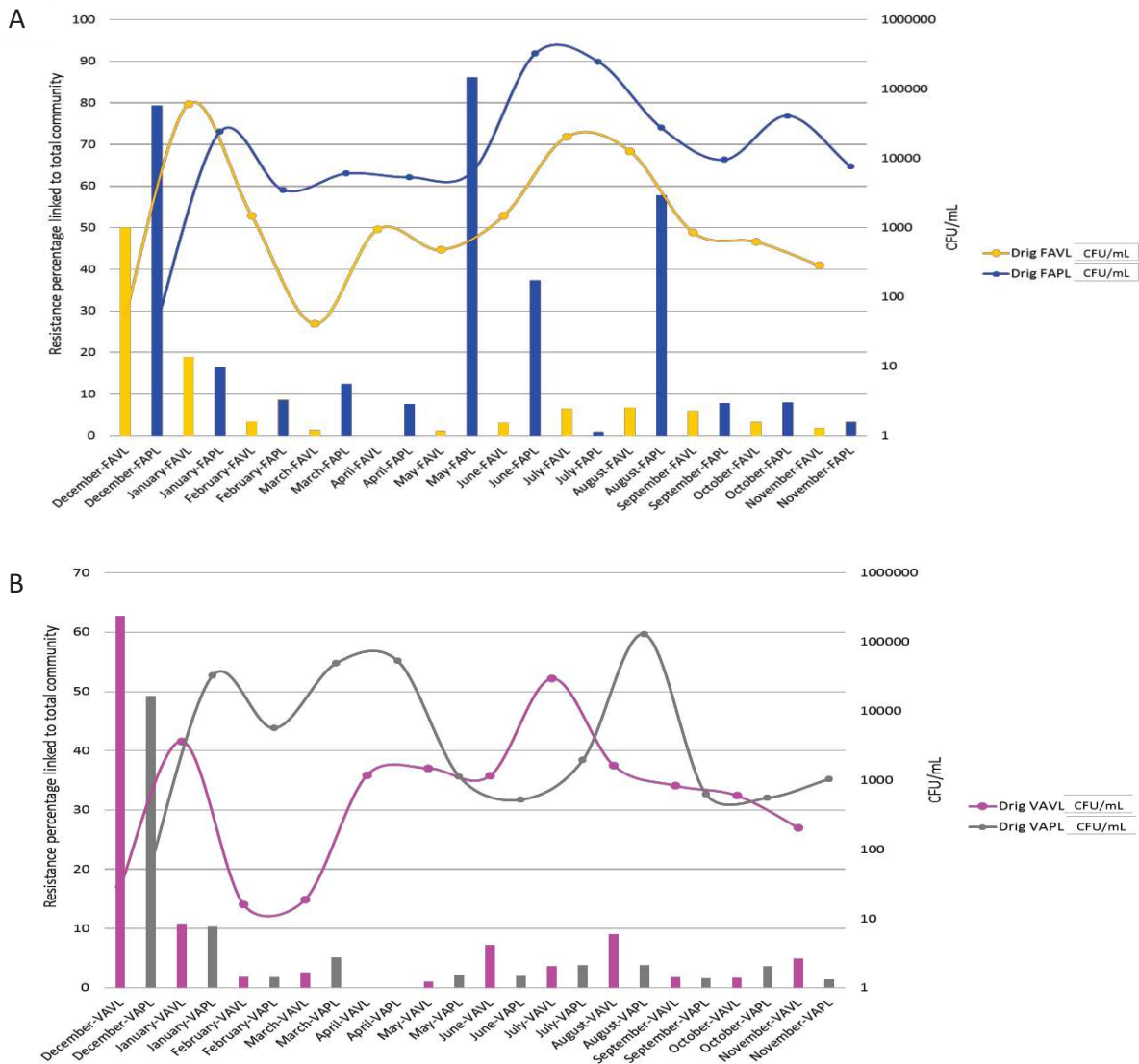
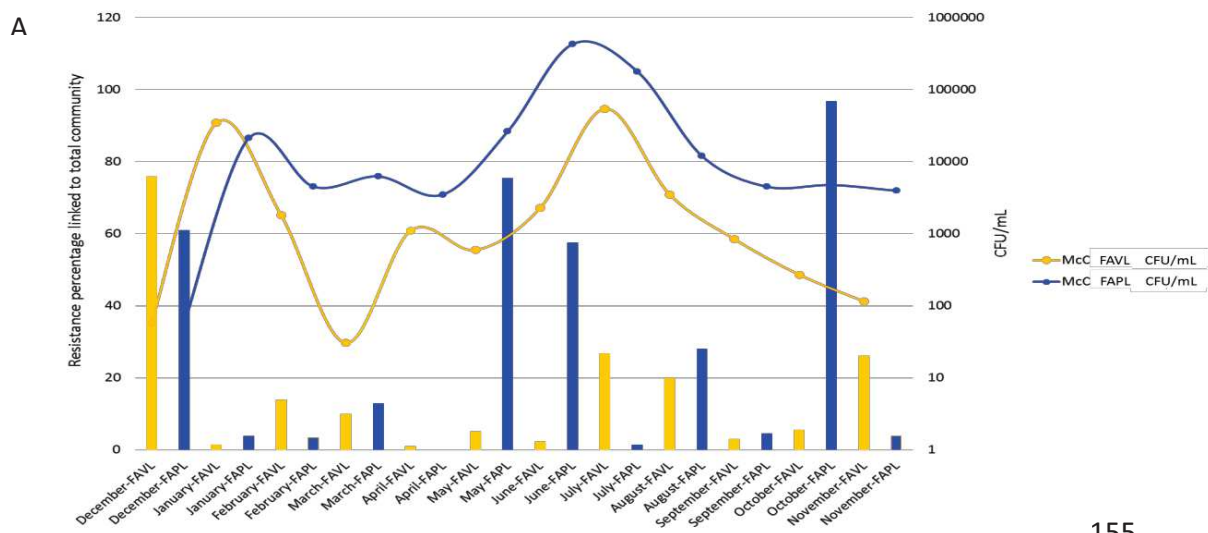


Fig 39: Percentage of bacteria resistant to CAZ among gram-negative bacteria growing onto drigalski (Drig) medium (A) in Font d'Aurelle upstream (FAVL) and downstream (FAPL) (left Y-axis), and (B) in Verdanson upstream (VAVL) and downstream (VAPL) (left Y-axis). Concentration of gram-negative cultivable bacteria growing on Drigalski medium (CFU/mL) (right Y-axis).

The number of resistant isolates grown on Drig+CAZ 4 mg/L medium was under 10% of the total isolates for most samples in all sites. However, some higher rates (> 50% of the community selected on Drigalski) of resistant pathogens were observed quasi exclusively in samples from FAPL site, i.e. in the downstream site of the river flowing just under the hospital. For instance, rates of CAZ resistant isolates in FAPL reached 86%, 79% and 58% at May, December and August samples, respectively. In April, resistant gram-negative bacteria were isolated from FAPL sample but none from the 3 other sites (**Fig. 39**). High rate of resistance in the Verdanson (63%), flowing at distance of the hospital, was observed only once on December at the upstream site (VAVL). Significant differences were found in terms of number of resistant bacteria counted on Drig + CAZ between upstream (FAVL) and downstream sites (FAPL) of Font d’Aurette River ($p=0.0056$) while the difference was not significant ($p>0.1$) between upstream (VAVL) and downstream (VAPL) sites in Verdanson. Finally, percentages were significantly different between the 2 Font d’Aurette sites ($p=0.0072$) and the 2 downstream sites ($p=0.01$) while percentages were not significantly different between the 2 Verdanson sites ($p>0.5$ or the 2 upstream sites ($p>0.5$).

Forty-five samples out of 48 (93%) were positive on Mac+CTX 4mg/L media (**Fig. 40**). Resistant gram-negative bacteria isolated from Mac+CTX media, ranged $\leq 10\%$ to 20% of the total selected community for most months. However, rates of more than 50% appeared evenly scattered among the sites and time. The results were not fully similar to those obtained with Drig+CAZ 4 mg/L medium but again significant differences were found between upstream (FAVL) and downstream (FAPL) values from Font d’Aurette River in terms of resistant bacteria number ($p=0.0332$) but no significant difference was found for Verdanson River values ($p>0.5$) or for percentages values.



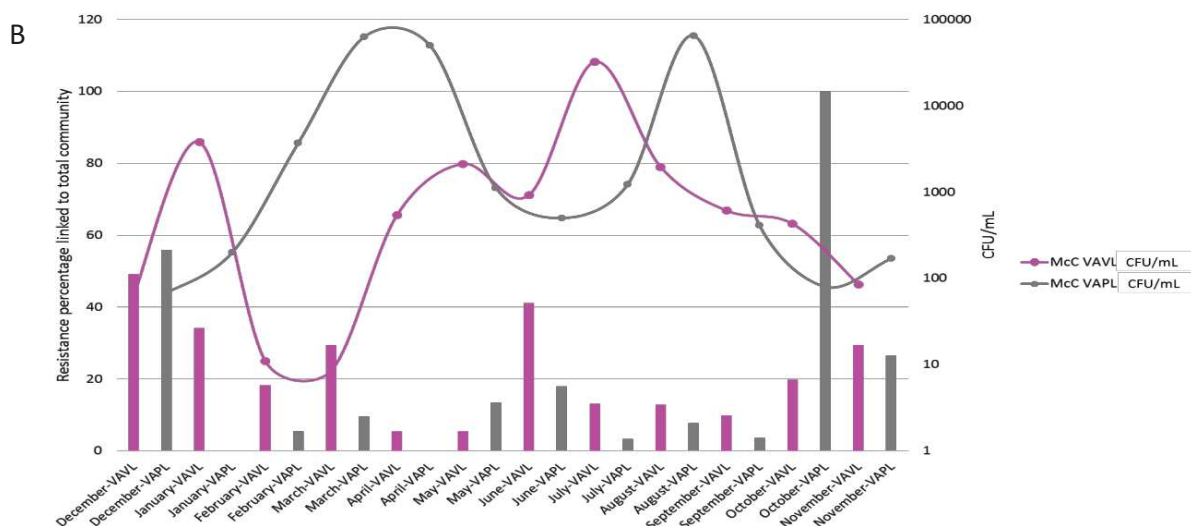


Fig 40: Percentage of bacteria resistant to CTX among gram-negative bacteria growing onto MacConkey (McC) medium (A) in Font d'Aurelle upstream (FAVL) and downstream (FAPL), and (B) in Verdanson upstream (VAVL) and downstream (VAPL) (left Y-axis). Concentration of gram-negative cultivable bacteria growing on MacConkey medium (CFU/mL) (right Y-axis).

Cetrimide agar medium incubated at 42 °C was used to preferentially isolate *P. aeruginosa* strains. All samples from FAPL contained bacteria that grown with these cultural conditions (counts ranged 15-76 CFU/mL) in contrast to the three other studied sites for which collectively 10 samples (25%) revealed no growth on Cetrimide agar (**Fig 41**).

The growth was totally inhibited by CAZ for 45% of samples whatever the sampling site. Twelve samples out of 40 (30%) were positive on Cet+CAZ 4 mg/L (**Fig. 41**). Among them, 8 were from FAPL and collected all over the year. The 4 positive samples from Verdanson River were collected exclusively in August and September. The resistance rates detected from the 4 positive-samples from Verdanson River ranged from <10% to ≥30%. These rates were relatively higher than those from Font D'Aurelle River, which ranged from 0.1% to 4%.

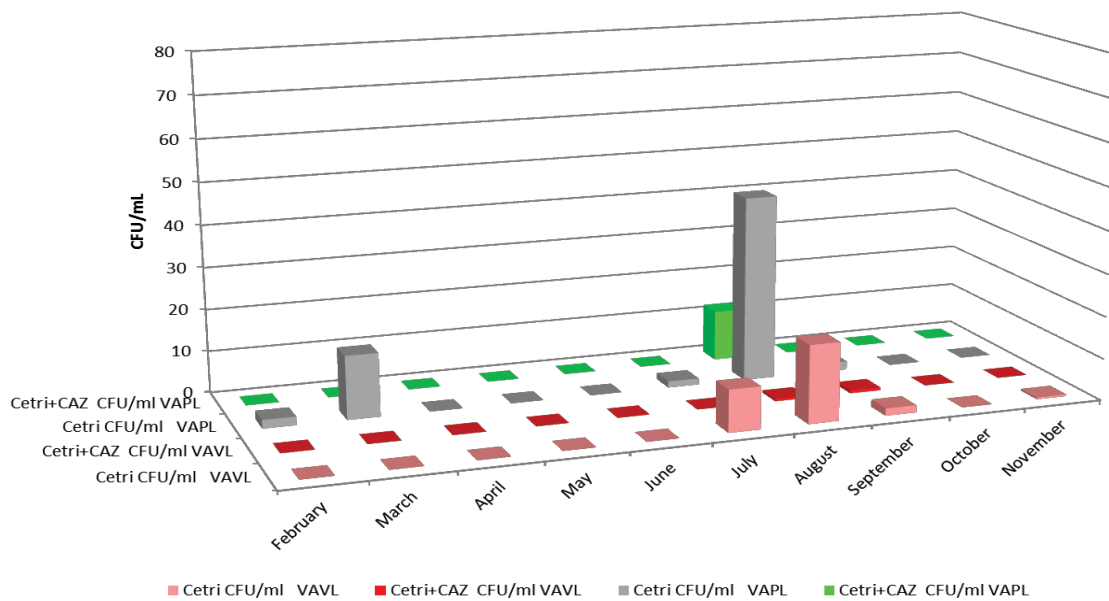
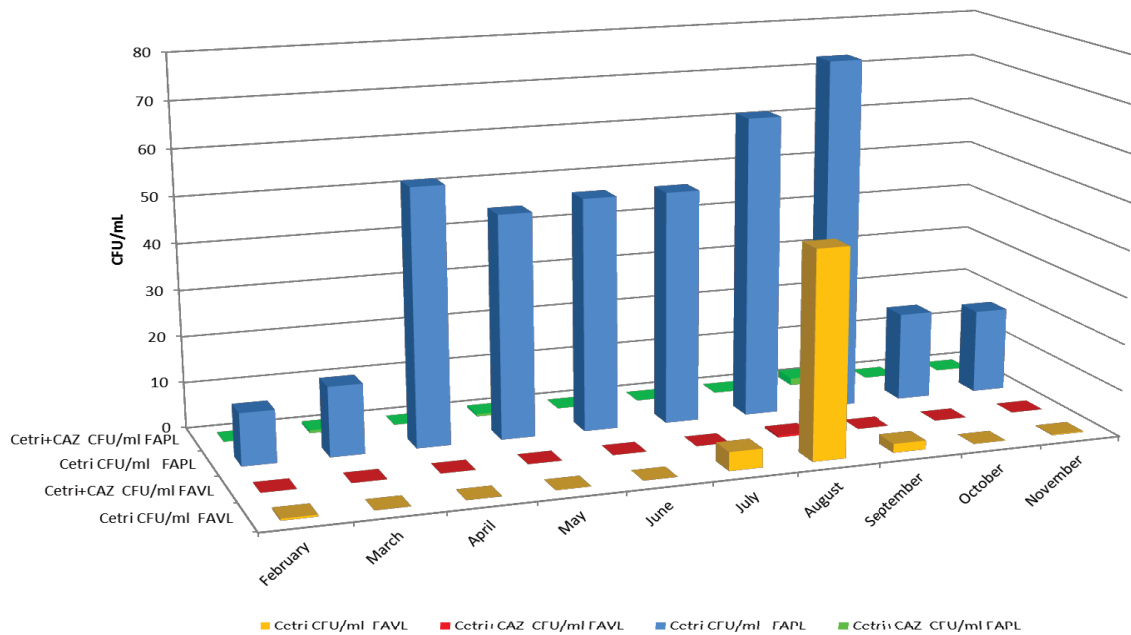


Fig 41: concentration of bacteria growing on cetrимide medium and on cetrимide supplemented with CAZ (A) from FAVL and FAPL and (B) from VAVL and VAPL

Forty-seven and 46 samples out of 48 (98% and 96%) contained bacteria growing on CARB/OXA media, and thereby considered as resistant to carbapenems (**Fig 42**). The number of total resistant isolates on CARBA medium was nearly 2-5 folds higher than those grown on OXA medium for most of the samples from all sites (**Fig 42**).

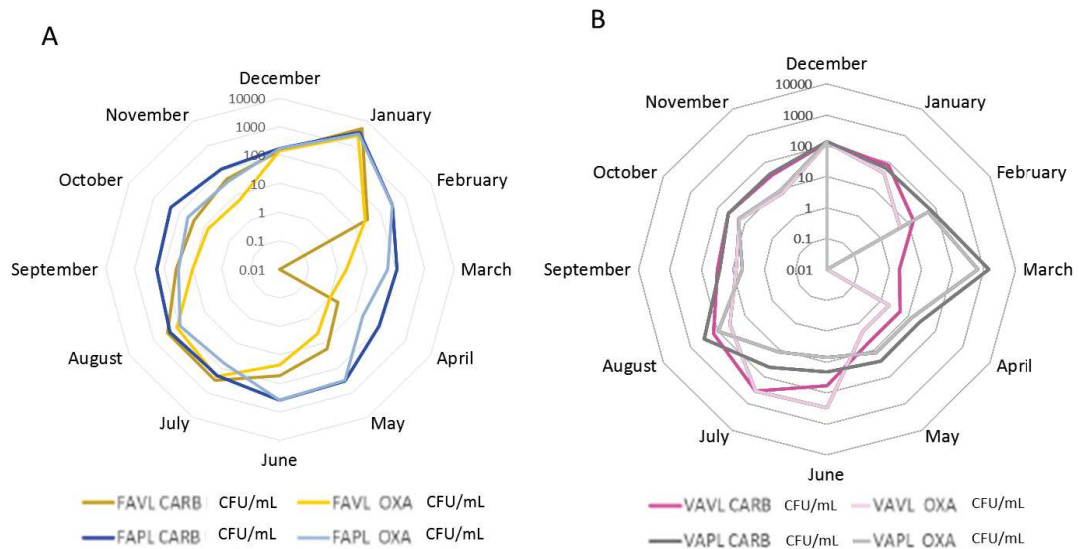


Fig 42: Carbapenem resistant community isolated from Font d’Aurelle (A) and Verdanson (B) rivers grown on CARBA/OXA media during 12 months.

In general, number of carbapenem resistant bacteria isolated downstream in Font d’Aurelle River (FAPL) was higher than upstream (FAVL) for almost the entire year (**Fig. 42**). Profiles were not such marked with Verdanson samples.

2.8.2. Identification of resistant bacteria follow-up during one year

Based on their morphotypes, 663 colonies were selected and isolated. Among them, 535 bacteria were identified by MALTI-TOF method, but in some cases this approach failed. Then, 117 isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing but 11 isolates remained unidentified.

Of these, 357 isolates (54%) were from Font d’Aurelle River, of which 133 isolates from upstream site and 224 from downstream site. 295 bacteria were isolated from Verdanson: 150 isolates were from upstream and 145 from downstream (**Table 6 to 10**).

Table 10: Numbers and names of the strains according to the sampling sites and the dates, identified by MALDI-TOF MS and/or 16S rRNA gene (green cases) and isolated from chromID® OXA-48 media

	VAVL											VAVL											FAVL											FAPL																																										
	December	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November																												
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	1			1				3	1						1	1	1			1	1			2	2			1		1			1																1		1	1	2	1															2						
<i>Pseudomonas koreensis</i>																																																							1	1																				
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>																																																																												
<i>Pseudomonas putida</i>							4	2	1											3								1					1																																											
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>						1					1					1			1														1																					2																						
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>																																																																												
<i>Pseudomonas montellii</i>								2																				1						1				1																																						
<i>Pseudomonas mossellei</i>																																																																												
<i>Pseudomonas cichorii</i>																																																																												
<i>Pseudomonas fulva</i>									1																																																																			
<i>Pseudomonas atitidis</i>									1																																																																			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>																																																																												
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>			1	1																																																																								
<i>Pseudomonas veronii</i>													1																																																															
<i>Aeromonas</i> sp.																																																																												
<i>Aeromonas media</i>	1							2																																																																				
<i>Aeromonas veronii</i>									1																																																																			
<i>Aeromonas hydrophila</i>																																																																												
Undetermined																																																																												
<i>UFC/ml (OXA)</i>	130	40	5	0	2	2	300	337	38	8	17	7	140	0	51	640	13	13	7	12	100	5	18	9	146	2540	25	2	1	4	22	221	121	40	7	6	170	3000	307	52	20	304	382	65	92	31	45	35																												

Species belonging to *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* and *Aeromonadaceae* families represented 86% and 85% of total number of species identified from Drig+CAZ and Mac+CTX medium, respectively. Among them, important causative agents of HAI were detected, as examples *Klebsiella*, *E. cloacae* and *P. aeruginosa* from Verdanson, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Acinetobacter baumannii* and *P. aeruginosa* from Font d'Aurelle (**Table 6 and 7**).

Cetrimide medium incubated at 42°C was chosen to select *Pseudomonas aeruginosa*. This species was identified only twice, in Font d'Aurelle water (**Table 8**). Some *Enterobacteriaceae* like *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lelliottia* or *Raoultella* grown on this selective medium but also rare *Aeromonas* and one *Achromobacter*.

The bi-plate chromogenic CARBA-Smart medium was used to screen for carbapenemase- and OXA-48- producing *Enterobacteriaceae*, respectively on CARB and OXA side. On CARB side, only 3 *Enterobacteriaceae* were identified, all from FAPL: 2 *Escherichia coli* strains (in August and September), 1 *Raoultella ornithinolytica* strain (in May) and 3 *Serratia marcescens* strains (in November) (**Table 9**). Eighteen different species belonging to the genus *Pseudomonas* were identified, including *P. aeruginosa*. Other bacteria growing on this media were *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Stenotrophomonas* and *Sphingobacterium*. On OXA plate, only 2 genera were isolated, *Pseudomonas* with 13 different species and *Aeromonas* with 3 species (**Table 10**).

2.8.3. Study of resistant bacteria of clinical interest

Resistance profile of isolated *Enterobacteriaceae* (n=6) and *Pseudomonas aeruginosa* (n=20) was investigated. *E. coli* strains (n=2) harbored *bla*_{NDM-5} gene (Almakki *et al.*, 2017). *Raoultella ornithinolytica* (n=1) showed a multidrug phenotype, including a resistance to ertapenem. To determine if this strain was producer of metallo- β -lactamase (MBL), the association of Imipenem or Meropenem with EDTA was tested. Non-increased diameters indicated the absence of such enzyme. In PCR experiments, we detected the gene *bla*_{KPC} encoding KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Phenotypic resistance of *Serratia marcescens* strains (n=3) was ambiguous. They presented a ESBL phenotype unaffected by EDTA suggesting that they did not produced metallo- β -lactamase while they grew onto CARBA in the Carbasmart® medium. PCR was negative for *bla*_{KPC} gene.

Antibiogram was performed on 20 *P. aeruginosa*, using 16 ATBs disks (**Table 11**). Eighteen of the 20 strains were sensitive to all tested ATBs but presented an intermediate susceptibility to aztreonam, according to EUCAST recommendations (EUCAST, 2016). The 2 remaining

strains (B64 isolated in July from Font d’Aurelle and B14 isolated in November from Verdanson) were multiresistant to 10-12 ATBs including 3 carbapenems (Doripenem, imipenem and meropenem) (**Table 11**). B64 strains harbored *bla*_{VIM-4} gene on a class-1 integron. Enzyme conferring resistance to B14 isolate was not identified. PCRs were negative for VIM, NDM, Oxa-48, KPC, SPM and IMP encoding genes and for Class 1 integron.

Table 11: Antibioresistance profile of the 20 *P. aeruginosa* strains

		Ticarcillin	Ticarcillin-clavulanate	Piperacillin	Piperacillin-tazobactam	Cefepime	Ceftazidime	Meropenem	Imipenem	Doripenem	Aztreonam	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Netilmicin
FAPL	C5 (April)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B62 (July)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B63 (July)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B64 (July)	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	S	S	R	R	R	R
	B70 (July)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B82 (November)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B84 (November)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B95 (November)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B99 (November)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
FAVL	B6 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B6 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
VAPL	B42 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B47 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B48 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B51 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B51 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
VAVL	B61 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B66 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B67 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B68 (August)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
	B14 (November)	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	R	R	I	R	S	S



Box 4

General assessment pathogenic bacteria resistant to third generation cephalosporin and carbapenem

Main results	possible explanation
➤ High rate of resistant gram-negative bacteria in Font d'Aurelle downstream to hospital	- important hospital role in the highly resistant emerging bacteria in peri-hospital urban waters

2.9. NDM-5-producing-Escherichia coli in an urban river in Montpellier, France



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Letter to the Editor

NDM-5-producing *Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France

Sir,

The emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* is a critical concern in antimicrobial chemotherapy. Among the carbapenemases, New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) enzymes have displayed rapid worldwide spread from their first and main geographical reservoirs, i.e. the Indian subcontinent, The Balkans and Middle East regions. The 16 NDM variants (<http://www.lahey.org/studies/>) were mainly identified in isolates from colonised or infected patients and from the hospital environment [1]. In Europe, NDM-producing bacteria from non-human sources have been described only once, i.e. an NDM-1-producing *Salmonella* from a wild bird [2]. Environmental isolation of bacteria carrying *bla*_{NDM} genes is scarce outside the Indian subcontinent, being reported from sewage water in Vietnam [3] and drinking water in Canada [4]. Here we report the isolation of two NDM-5-producing *Escherichia coli* isolates from a French urban river, the first report of such a strain in the environment in Europe.

In August and September 2015, two *E. coli* strains (B26 and B28) were isolated on chromID[®] CARBA SMART medium (bioMérieux) from water sampled at the same site in the midstream of Font d'Aurelle River running through the city of Montpellier, France. Both isolates were non-susceptible to β -lactams (cefepime, ceftazidime, ceftaxime) and were susceptible to aztreonam and meropenem. Results of the carbapenem disk diffusion and combined

disk assays are given in Table 1 and showed the production of a metallo- β -lactamase (MBL) by both strains. The double-disk synergy test indicated extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production by strain B26 only. The Check-MDR CT103[®] microarray (Check-Points) identified the *bla*_{NDM} gene in both strains as well as additional β -lactamase genes *bla*_{TEM-1} and *bla*_{SHV-5} in strain B26 (Table 1). Sequencing of the *bla*_{NDM} gene and flanking regions (accession nos. **KY434019** and **KY434020**) showed that both strains harboured the *bla*_{NDM-5} variant with the characteristic substitutions Val/Leu at 88 and Met/Leu at 154. As already described for the genetic environment of *bla*_{NDM-1}, the insertion sequence IS_{Aba125} (truncated) and the bleomycin resistance gene *ble*_{MBL} were identified upstream and downstream the *bla*_{NDM-5} gene, respectively. Strains B26 and B28 were susceptible to aminoglycosides, quinolones, fluoroquinolones, tetracycline, chloramphenicol, fosfomycin and trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), an atypical profile as NDM-producers are almost systematically known to carry associated resistance determinants [1]. Both strains exhibited indistinguishable pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns following *Xba*I DNA macrorestriction and belonged to the same sequence type (ST636) (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). This is the first report of *E. coli* ST636 harbouring *bla*_{NDM-5}. Plasmid DNA extracted from strains B26 (pB26) and B28 (pB28) using a NucleoSpin[®] Plasmid Kit (Macherey-Nagel) was used in transformation experiments using One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). The transformants T26 and T28 exhibited resistance to all carbapenems (Table 1), and T26 did not produce an ESBL. Southern blotting of PFGE gels and hybridisation with a *bla*_{NDM} digoxigenin-labelled probe

Table 1

Phenotypic and genetic features of two *bla*_{NDM-5}-positive *Escherichia coli* strains (B26 and B28) isolated from water sampled at the same site in the Font d'Aurelle River (Montpellier, France) and their transformants (T26 and T28)^a

	Antimicrobial agent	Isolate B26	Isolate B28	T26 transformant (harbouring plasmid pB26)	T28 transformant (harbouring plasmid pB28)
Mean \pm S.D. carbapenem inhibitory diameter (mm) (<i>n</i>) ^b	IPM	22.8 \pm 2.9 (5)	22.2 \pm 2.9 (5)	15.3 \pm 2.08 (3)	15.0 \pm 1.73 (3)
	ETP	22.6 \pm 1.7 (5)	22.4 \pm 2.3 (5)	16.0 \pm 3.61 (3)	16.0 \pm 3.00 (3)
	MEM	24.2 \pm 1.1 (5)	23.6 \pm 2.2 (5)	16.3 \pm 3.51 (3)	17.7 \pm 4.51 (3)
	DOR	24.2 \pm 1.3 (5)	24.2 \pm 1.9 (5)	17.3 \pm 4.62 (3)	17.3 \pm 4.73 (3)
	EIP	28.0 \pm 1.2 (5)	28.4 \pm 0.9 (5)	28.3 \pm 2.08 (3)	30.3 \pm 1.53 (3)
	EME	28.8 \pm 2.6 (5)	27.3 \pm 2.5 (5)	30.0 \pm 5.66 (3)	31.5 \pm 4.95 (3)
MIC (mg/L) ^c	IPM	2	3	16	8
	ETP	1	0.5	16	16
	MEM	1	0.75	16	6
	DOR	1	1.5	16	6
Co-harboured β -lactamase genes		<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-5}	None	None	None
<i>bla</i> _{NDM} -carrying plasmid		IncX3	IncX3	IncX3	IncX3
Co-carried plasmid		pFIA/B	N/D	N/D	N/D

S.D., standard deviation; *n*, number of replicates; IPM, imipenem; ETP, ertapenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; EIP, imipenem + EDTA; EDTA, ethylene diamine tetra-acetic acid; EME, meropenem + EDTA; MIC, minimum inhibitory concentration; N/D, not determined; EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

^a Transformation experiments using One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen).

^b Inhibition zone diameter breakpoints proposed by EUCAST (2017): DOR, susceptible (S) \geq 24 mm, resistant (R) $<$ 21 mm; ETP, S \geq 25 mm, R $<$ 22 mm; and IPM and MEM, S \geq 22 mm, R $<$ 16 mm.

^c EUCAST (2017) MIC breakpoints: DOR, S \leq 1 mg/L, R $>$ 2 mg/L; ETP, S \leq 0.5 mg/L, R $>$ 1 mg/L; and IPM and MEM, S \leq 2 mg/L, R $>$ 8 mg/L.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.003>

0924-8579/© 2017 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

revealed a labelled band of identical size in both strains and transformants. Successful conjugative transfer of *bla*_{NDM} was achieved into non-competent tetracycline-resistant *E. coli* XL1-blue MRF' (Stratagene). PCR-based replicon typing and the restriction profile following digestion with *EcoRI* and *HincII* (New England Biolabs) showed that the plasmids belonged to the IncX3 incompatibility group and were sized 40–50 kbp. A pFIA/IB plasmid was also carried by strain B26 (Table 1). *bla*_{NDM-5} genes located on conjugative IncX3 plasmids of 40–50 kbp have been previously reported in isolates from patients in India, China, Australia or in other countries after travel to India [5].

The origin of NDM-producing *E. coli* in an urban river remains uncertain. No human infection or carriage involving NDM-5-producing bacteria had been reported in the Montpellier area before and during the study period. The river sampling site is located near to the hospital in Montpellier, but hospital effluents are unlikely to contaminate the river because they are fully collected in a wastewater treatment plant that is geographically unrelated to the studied watershed. The role of runoff from hospital buildings deserves to be assessed because one of the sampling campaigns was performed 5 days after an intense storm water event. Another hypothesis is that NDM-5-producing *E. coli* were carried by animals nesting in the riverbanks. In particular, migrating or non-migrating birds are known to be reservoirs of resistant enterobacteria [2] and the sampling site is located near a storm water retention pond where ducks and other birds nest. The isolation 1 month apart in the same site of two strains of NDM-5-producing *E. coli* ST636 with identical PFGE patterns but different plasmid and ESBL gene content argues either for the persistence of ST636 in the environment as already reported for some genotypes or for the re-introduction of this ST by a particular host. In both cases, the loss of ESBL and the persistence of NDM-5-encoding genes in strains with the same housekeeping genetic background suggest a lower fitness cost associated with the *bla*_{NDM-5}-carrying plasmid than the *bla*_{SHV-5}-carrying one, or strong unknown selective conditions in the urban river.

Detection and possible persistence of *E. coli* carrying *bla*_{NDM-5} on a transmissible plasmid in an anthropised but not heavily polluted French urban river underline the importance of environmental investigations to understand and control the spread of highly resistant emerging bacteria.

Funding: This work was supported by funding provided by the LabEx DRIHMH, Observatoire hommes-milieus (OHM) 'Littoral méditerranéen' and by a doctoral fellowship from Campus France [grant no. 776694G to AA]. Multilocus sequence typing (MLST) data used are publicly available at <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>, which is currently supported by a grant from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC).

Competing interests: None.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol* 2013;62:499–513.
- [2] Fischer J, Schmoger S, Jahn S, Helmuth R, Guerra B. NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2954–6.
- [3] Isozumi R, Yoshimatsu K, Yamashiro T, Hasebe F, Nguyen BM, Ngo TC, et al. *bla*_{NDM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1383–5.
- [4] Fernando DM, Tun HM, Poole J, Patidar R, Li R, Mi R, et al. Detection of antibiotic resistance genes in source and drinking water samples from a First Nations Community in Canada. *Appl Environ Microbiol* 2016;82:4767–75.
- [5] Zhu Y-Q, Zhao J-Y, Xu C, Zhao H, Jia N, Li Y-N. Identification of an NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 167 in a neonatal patient in China. *Clin Rep* 2016;6:29934.

Ayad Almakki ¹

Equipe 'Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements',
UMR 5569 HydroSciences Montpellier,
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université de Montpellier, Montpellier, France
Department of Clinical Laboratory Science, College of Pharmacy,
University of Basrah, Basra, Iraq

Alexandra Maure ¹

Equipe 'Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements',
UMR 5569 HydroSciences Montpellier,
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université de Montpellier, Montpellier, France

Alix Pantel

Service de Microbiologie, CHU Caréméau,
Nîmes University Hospital, Nîmes, France
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,
UFR de Médecine, Université de Montpellier, Nîmes, France

Sara Romano-Bertrand

Equipe 'Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements',
UMR 5569 HydroSciences Montpellier,
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université de Montpellier, Montpellier, France
Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU Montpellier,
Hôpital St Eloi, Montpellier, France

Agnès Masnou

Equipe 'Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements',
UMR 5569 HydroSciences Montpellier,
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université de Montpellier, Montpellier, France

Hélène Marchandin

Equipe 'Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements',
UMR 5569 HydroSciences Montpellier,
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université de Montpellier, Montpellier, France
Service de Microbiologie, CHU Caréméau,
Nîmes University Hospital, Nîmes, France

Estelle Jumas-Bilak

Patricia Licznar-Fajardo *

Equipe 'Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements',
UMR 5569 HydroSciences Montpellier,
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université de Montpellier, Montpellier, France
Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU Montpellier,
Hôpital St Eloi, Montpellier, France

* Corresponding author.

Equipe 'Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements',
UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université de Montpellier, UMR 5569 HydroSciences Montpellier,
15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, France.
Fax: +33 (0)4 11 75 94 63.

E-mail address: patricia.licznar-fajardo@umontpellier.fr
(P. Licznar-Fajardo)

24 March 2017

12 April 2017

¹ These two authors contributed equally to this work.

Complement of the article “NDM-5-producing Escherichia coli in an urban river in Montpellier, France”

2.9.1 Materials and Methods

Bacterial isolates and identification

From December 2014 to November 2015, water samples were collected monthly at the same site in Font d'Aurelle River (GPS coordinates: N43.62712471051107, E3.8532008528545703) running through the city of Montpellier, France (about 264.000 inhabitants). Five hundred milliliters were filtered through 0.45 micron-pore-size cellulose sterile filters (Sartorius, Germany). The filter was then inserted in 5 mL sterile water and *vortexed vigorously to remove bacteria from the filter. Fifty microliters of this suspension were plated on chromID® CARBA SMART medium* (bioMérieux, France).

Identification was performed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Bruker Daltonics, Germany).

Antimicrobial susceptibility testing

Diffusion assays were performed and interpreted according to EUCAST breakpoints (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) for disks (BioRad, France) and E-Test (bioMérieux). Combined disk assay (imipenem or meropenem associated with EDTA, (Bio-Rad)) was performed following the *manufacturer's* instructions. Mann-Whitney test was used to define statistical significant differences between inhibitory zone diameters.

Resistance gene and genetic environment characterization

Check-MDR CT103® microarray (Check-Points, The Netherlands) was used as recommended to detect the most clinically relevant β -lactamase genes harboured by carbapenem-resistant strains.

*bla*_{NDM} and flanking sequences were amplified and sequenced as previously described. Sequences were deposited to GenBank database under KY434019 and KY434020 accession numbers.

Molecular comparison of strains

Genomic DNA prepared in agarose plugs was digested with *Xba*I (NewEngland Biolabs, USA) and analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as already described. Gels were transferred onto a Nytran N Super-Charge nylon membrane (Schleicher and Schuell, Germany) by vacuum blotting in 20X Saline-Sodium Citrate buffer. A *bla*_{NDM} digoxigenin-labelled probe was obtained by PCR performed on NDM-positive-isolates as described before with a dNTP mixture containing 0.1 mM digoxigenin-dUTP (Roche, Swiss). Probe hybridization was detected using anti-digoxigenin-labelled-antibody and NBT/BCIP colour detection kit (Roche).

Multilocus sequence typing (MLST) was performed using the Achtman *E. coli* MLST scheme (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

Plasmid experiments

Plasmid DNA was extracted using the NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Germany).

One shot TOP10 chemically competent *E. coli* cells were transformed (Invitrogen, USA) and transformants were selected on Tryptic Soy (TS) Agar (Difco, USA) supplemented with ceftazidime (4 mg/L). β -lactamase gene content of transformants was studied by Check-MDR CT103[®] microarray.

Transfer of *bla*_{NDM} was attempted into tetracycline-resistant *E. coli* XL1-blue MRF' strain (Stratagene, USA) by liquid mating-out assays at 37 °C. 0.5 mL of donor and recipient bacteria in logarithmic-phase-culture were added to 4 mL of TS broth and incubated 18h without shaking at 37 °C. Transconjugants were selected on TS agar supplemented with imipenem (4 mg/L) and tetracycline (15 mg/L) (Sigma-Aldrich, Germany).

Replicons FIA, FIB, FII, HI1, HI2, L/M, A/C, X1 to X4 and R representative of some major incompatibility groups were searched by PCR-based typing method as already described.

Plasmid size was estimated after *Eco*RI and *Hinc*II (NewEngland BioLabs) digestion.

2.9.2 Results

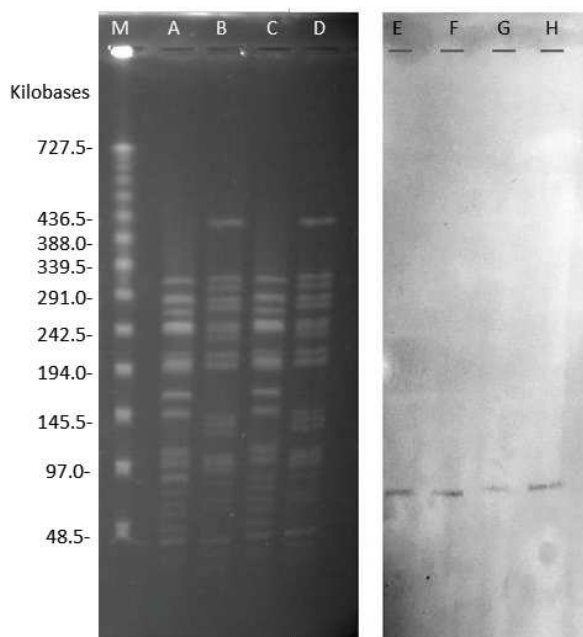


Fig. 1: PFGE profiles of the *E. coli* genomes and localization of the *bla*_{NDM-5} gene
Lanes: M, Lambda PFG ladder (New England BioLabs); A, *E. coli* isolate B26 ; B, TOP10 strain harbouring pB26 plasmid (T26 strain); C, *E. coli* isolate B28 ; D, TOP10 strain harbouring pB26 plasmid (T28 strain); E, F, G, H, hybridization of lanes A, B, C, D with a *bla*_{NDM}-specific probe.

2.10. Discussion

Most studies of hospital impact on antibiotic resistance occurrence and dissemination in the environment are focused on hospital wastewater (Sadowy and Luczkiewicz, 2014), the runoff contamination by hospital settings being less studied. Our selection of sites from a river flowing under a hospital and a related control river allowed the assessment of hospital runoff. We applied a polyphasic approach that considered both classical parameters and an original approach of antimicrobial resistance. The data were analyzed by PCA and by comparison between sites. The study also allows the description of resistance to antibiotics in the surroundings of a city hospital, which has been scarcely published.

PCA showed that water temperature was significantly correlated with conductivity which could be explained by increasing evaporation by elevated temperature leading to increased mineralization and enhanced conductivity as showed in previous studies (Patil et al., 2012; Sinha, 2015). Both temperature and conductivity were inversely correlated with DOC. This seems contradictory because long day duration and prolonged exposure to sunlight in summer should lead to enhanced photosynthesis by plants or phytoplankton and then DOC augmentation in summer. However, the increased temperature also result in excessive degradation of dissolved oxygen resulting in low DOC. This is accepted by (Usharani et al., 2010) which found that DOC was negatively correlated with all the studied physico-chemical parameters. Temperature was negatively correlated with water flow in contrast to other studies (Wang et al., 2016). PCA of FIB data and water parameters showed a significant direct correlation with temperature and electrical conductivity due to the influencing effect of increased temperature on the bacterial growth. This was accepted by results of other studies (Paule-Mercado et al., 2016; Sinha, 2015). However, PCA showed an inverse correlation of FIB population with dissolved oxygen concentrations of the two rivers which occur mainly due to consumption of dissolved oxygen by bacterial metabolic activities, a finding also was observed by (Sinha, 2015). Flow rate and temperature were previously found to be the main influencing factors of bacterial community in river water (Wang et al., 2016). PCA of resistant communities showed that AMX, CTX, CAZ, and OFL resistant communities from Font d'Aurette and CTX, OFL and TET resistant communities from Verdanson were correlated to each other probably due to co-selection mechanisms. Significant correlation among resistant strains to the same tested ATBs was also observed (Holvoet et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Comparison between sampling sites was then performed. Both Font d'Aurette river and Verdanson rivers are located within low urbanized area and do not receive any waste water

treatment effluents so that stormwater and surface runoffs are considered the major contributor of their water contents. Water quality measurement revealed that all sites of study had alkaline water. The most elevated pH value detected from downstream of Font d'Aurelle (FAPL) is suggestive of urban pollution (Rashid and Romshoo, 2013) and is consistent with the highest total FIB in Font d'Aurelle River downstream (FAPL) and the higher concentrations of bacteria. The decrease of dissolved oxygen in downstream sites might indicate increased biological activities. Finally, Font d'Aurelle waters after their passage under hospital buildings can be considered the most contaminated studied site by both chemical and biological contaminants. This suggests the river contamination from the peri-hospital area surface runoff especially as the hospital wastewater effluents had no connections to the studied rivers. The significant higher bacterial counts downstream of Font d'Aurelle than downstream of Verdanson River, which is located in parallel in the same urbanized area had excluded the urbanization impact on bacterial abundance in the former. The significant higher contamination of FAVL by resistant bacteria is also demonstrated herein. This confirmed the influence of the hospital on bacterial resistance rate. To our knowledge, such an effect of runoffs from hospital settings on river water quality is demonstrated herein for the first time. We can exclude the cross contamination of runoff water by hospital effluent and sewage water thanks to the surveillance of the hospital networks frequently performed by the hospital staff during the study.

The comparison among samples also demonstrated seasonal variations. Peaks of resistant bacteria count were observed in December, may, august and November mainly in downstream sites and mainly after hospital in FAPL. These peaks corresponded to overflow events (see hyetogram in Figure 20). The resistance to cetrimide is very frequent mainly from April to September in the site after hospital (FAPL). Cetrimide is a mixture of different quaternary ammonium salts used in culture medium to select bacteria of the genus *Pseudomonas*. The first hypothesis is that pseudomonads are more prevalent in FAPL. It is not the case in our metataxonomic study and moreover the prevalence of pseudomonads is higher in winter while cetrimide resistant bacteria prevalence is higher in warm season. The second hypothesis is the contamination of hospital runoffs by quaternary ammonium compounds (QAC) that select resistant bacteria in FAPL. QAC has been described to change microbial community structures in the environment (Oh et al., 2013).

Seasonal variation in antibiotics resistant bacterial communities is more apparent in upstream of the two rivers during cold season. This is rather paradoxical because bacterial community abundance generally increases during warm season due to increased biological

activities by the increased temperature (Ma et al., 2016). Higher resistance to antibiotics among aquatic bacterial communities may be attributed to high ATBs consumption for treating infections, which is increased in cold season or may be due to increased bacterial load in the rivers from rainfalls and runoffs water. High resistance rates during cold season has been well documented elsewhere (Mohanta and Goel, 2014).

β -lactams resistant communities isolated from downstream of the two rivers particularly during warm season presented similar rates to that during cold season due to continuous introduction of these resistant bacteria into the river from both residential and hospital area. This confirms the wide-spread of β -lactams producers including ESBL producers in both human and environment (Alam et al., 2013; Ash et al., 2002). Indeed, high resistance rates to β -lactams is linked to high selection pressure as β -lactams are widely used as first line ATBs in treating infections both in household and hospitals (Fair and Tor, 2014). The low stability and persistence of β -lactams in environment (Christensen, 1998; Yin et al., 2013) suggests that resistance in rivers is due to the spread of resistant bacteria selected in human rather than *in situ* selection. However, the low environmental persistence could be compensated by the continuous introduction of β -lactams into water related to their global overuse. Another possible source of β -lactams resistant bacteria is from sediment particularly as sediment contains highly diverse ESBL producing bacteria and ESBL genes (Lu et al., 2010).

Low ofloxacin resistance was detected from water samples possibly due to two reasons: first, fluoroquinolones are synthetic compounds and natural resistance is unexpected (Hooper, 2001). Second, fluoroquinolones are rapidly adsorbed to soil so that bacteria from water samples are suggested not to be under high selective pressure due to low persistency of ofloxacin in water environment (Cisar et al., 2014). Consequently, the peaks of OFL resistance observed in May at downstream site are probably linked to the accidental passage of effluent water in rivers during the over flood event. Low tetracycline resistance rates were expected as our study area has no agricultural practices where tetracycline is mainly used in veterinary medicine, rarely in human medicine and never used in hospital medicine. Increased tetracycline resistance rates were detected in water impacted by agricultural runoffs (Yin et al., 2013; Zhang et al., 2009). Resistance rates similar to that observed in our study were detected from hospital wastewater (Alam et al., 2013).

The most frequently isolated resistant bacteria belonged to *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Flavobacteriaceae* and *Moraxellaceae* as most of them are indogenous to fresh water environment. In earlier studies, natural and acquired β -lactams resistance among *Enterobacterial* and *Aeromonas* isolates was estimated at about

10%, which was coherent with our findings (Goñi-Urriza et al., 2000). Certain species which are known clinical pathogens such as *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* were isolated from FAPL only reinforcing the conclusion about the role of the hospital in river contamination.

Ceftazidime and cefotaxime supplemented Drigalski and MacConkey media and carba® are classically used in clinical contexts to detect multidrug resistant gram-negative pathogens in human fecal carriage. Herein, these media are used to screen for environmental gram-negative bacteria resisting to 3th generation cephalosporins and carbapenems on the same basis than performed in clinical context. We found that culturable resistant pathogens were more prevalent in Font d'Aurelle River especially downstream of the hospital. The case of *P. aeruginosa* is particularly interesting. In a recent study, concentration of *P. aeruginosa* in urban river had been measured, ranging from 2 to 25 CFU/100 mL (Suzuki et al., 2013). Here, until about hundred times more colonies growing on cefrimide medium, either in Verdanson and in Font d'Aurelle rivers, but most of these strains does not belong to the pathogenic species *P. aeruginosa*. It can be surprisingly to isolate so few *P. aeruginosa* strains in aquatic environment but recent studies on water from rivers found the same result. For example, a study on Danube water allowed the identification of only 2 *P. aeruginosa* strains among 520 *Pseudomonas* sp. isolated (Kittinger et al., 2016). In Japanese river, 3% of *P. aeruginosa* was detected to be resistant to carbapenems or multidrug resistant (Kittinger et al., 2016; Suzuki et al., 2013), rate lower than in our study where the percentage reach 10%. It has been reported that presence of *P. aeruginosa* are linked with altered water quality due to human activities (Suzuki et al., 2013) and above all to proliferation in premise plumbing systems (Falkinham, 2015).

Beside other MDR pathogens, the detection of *E. coli* producing NDM-5 carbapenemase in a French urban river is surprising and worrisome. We propose this description for publication as an emerging epidemiological alert. The origin of river contamination by such extremely resistant emerging bacteria deserve to be explore in depth in order to understand its human-to-environment cycle, thereby controlling and avoiding its epidemiological success. The role of hospital as reservoir of multidrug resistant human pathogens is well documented within the hospital and away from the hospital through wastewater (Alam et al., 2013; Dzidic and Bedeković, 2003) but for the first time herein, in a river flowing near a hospital. In Montpellier, the hospital waste effluents are completely separated from the two studied urban rivers. The most acceptable explanation for the hospital impact on water contamination are by surface runoffs from the hospital buildings or uncontrolled

contamination with hospital waste. Another explanation is that the river might be contaminated by excretions of regional rodent animals (rats and mice) and birds. The latter hypothesis is particularly suggested because a stormwater retention pond inhabited by several migrating and non-migrating birds is located in the study area. However, the 4 sites of sampling are probably equally impacted by bird feces. Multi-resistant bacteria had been isolated previously from fresh feces of urban Pigeons (da Silva et al., 2012) and in Gulls in the region of Montpellier (Aberkane et al., 2016).

Conclusion

The detection of considerable quantities of β -lactams resistant bacteria in the studied rivers sends warning messages about the wide dissemination of resistance to these important therapeutic compounds and the following risk on public health which resulted mainly due to inappropriate use of ATBs.

Presence of increased resistance in water sources located within peri-hospital environment without being connected to hospital wastewater suggested that hospitals can significantly contaminate the freshwater environment by land runoffs in addition to effluents.

Future investigations of the ATBs residues concentrations and origin tracking of pathogens in these two urban rivers and the main streams of city of Montpellier are necessary to completely assess the role of a hospital in surface water contamination in a developed country. Moreover a complementary genetic study for searching antibiotic resistant genes is needed to accurately assess the antibiotic resistance occurrence and risk of dissemination.

**Journée des doctorants de l'IM2E
Montpellier, 20 mars 2015**

Suivi des communautés bactériennes résistantes aux antibiotiques dans des eaux urbaines à proximité du centre hospitalier de Montpellier

Almakki A., Jumas-Bilak E., Licznar-Fajardo P.

Les pressions anthropiques exercées sur les écosystèmes aquatiques en modifient le fonctionnement et impactent sur la dynamique des micro-organismes qui les composent. Ces écosystèmes deviennent alors des lieux d'évolution rapide des communautés microbiennes pouvant permettre l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. La lutte contre l'émergence et la dissémination des résistances aux antibiotiques passe par une meilleure connaissance des réservoirs de communautés microbiennes résistantes, notamment des écosystèmes proches de l'homme. Les effluents d'eaux usées des hôpitaux, sources de micro-organismes pathogènes et résistants, sont traités. Toutefois, la contamination des zones aquatiques naturelles par les eaux de ruissellement à proximité des hôpitaux est peu étudiée.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le niveau de résistance des communautés bactériennes cultivables et leur biodiversité -en se focalisant particulièrement sur les bactéries pathogènes et multirésistantes-, dans deux cours d'eau prenant leur source dans l'agglomération de Montpellier et traversant des zones urbanisées similaires : le Font d'Aurette qui est canalisé sous l'hôpital et le Verdanson qui coule à distance de l'hôpital.

Deux sites de prélèvement ont été définis sur le Font d'Aurette, en amont et en aval de l'hôpital, afin d'étudier l'impact de l'activité hospitalière sur les communautés bactériennes. Les données obtenues pour 2 sites de prélèvements définis sur le Verdanson seront le témoin de l'impact de l'activité urbaine, hors hôpital. Les échantillons d'eau sont analysés par i) dénombrement du niveau de contamination d'origine fécale (colimétrie), ii) détermination des pourcentages de communautés cultivables résistantes à 3 concentrations de céfotaxime, ceftazidime, tétracycline, amoxicilline et ofloxacine, iii) description du microbiote cultivable résistant par analyse du gène de l'ARNr 16S (PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis) et iv) recherche de bactéries pathogènes multi-résistantes par culture sur milieux sélectifs spécifiquement utilisés pour la recherche de portage de bactéries multi-résistantes chez les patients.

Sur 2 campagnes de prélèvement, la colimétrie varie de 2.10^4 à 7.10^6 UFC/100mL. Elle peut varier d'un facteur 400 entre deux campagnes pour un même site alors qu'elle ne varie au maximum que d'un facteur 20 entre les sites amont et aval d'un même cours d'eau, lors de la même campagne. De nombreux isolats environnementaux sont sélectionnés sur les milieux utilisés pour la détection des bactéries multi-résistantes et/ou productrices de carbapénèmases. On observe une sélection de sous-communauté résistance γ compris pour des concentrations très faibles d'antibiotiques (0,0312 mg/L de cefotaxime ou d'ofloxacine par exemple). Les niveaux de résistance des communautés diffèrent selon les sites, un jour donné. Par exemples, 27 à 70% de la communauté résiste à 8 mg/L d'amoxicilline, 3 à 32% résiste à 8 mg/l de tétracycline.

Ces premiers résultats montrent une forte présence de coliformes et de bactéries multirésistantes dans les cours d'eau urbains. L'impact des antibiotiques sur les communautés cultivables, variable selon les sites, montre que notre approche est discriminante pour l'étude des communautés résistantes dans l'environnement. Les résultats des campagnes poursuivies durant une année seront confrontés aux données d'épidémiologie de la résistance en médecine humaine et vétérinaire pour mieux préciser le risque sanitaire associé au résistome environnemental urbain.

Suivi des communautés bactériennes résistantes aux antibiotiques dans des eaux urbaines à proximité du centre hospitalier de Montpellier

A. Almkaki¹, E. Jumas-Bilak^{1,2}, P. Licznar-Fajardo¹

¹Équipe PhySE (Pathogènes Hydriques Santé Environnements), UMR 5569 HydroSciences Montpellier, Université de Montpellier ; ²Département d'hygiène hospitalière, CHRU de Montpellier, Montpellier, France

Introduction et objectifs

Les pressions anthropiques exercées sur les écosystèmes aquatiques en modifient le fonctionnement et impactent sur la dynamique des micro-organismes qui les composent. Ces écosystèmes deviennent alors des lieux d'évolution rapide des communautés microbiennes pouvant permettre l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. La lutte contre l'émergence et la dissémination des résistances aux antibiotiques passe par une meilleure connaissance des réservoirs de communautés microbiennes résistantes, notamment des écosystèmes proches de l'homme. Les effluents d'eaux usées des hôpitaux, sources de micro-organismes pathogènes et résistants, sont traités. Toutefois, la contamination des zones aquatiques naturelles par les eaux de ruissellement à proximité des hôpitaux est peu étudiée.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le niveau de résistance des communautés bactériennes cultivables et leur biodiversité et de suivre ces paramètres au cours du temps. Nous nous focaliserons particulièrement sur les bactéries pathogènes et multirésistantes, dans deux cours d'eau prenant leur source dans l'agglomération de Montpellier et traversant des zones urbanisées similaires : le Font d'Aurelle qui est canalisé sous l'hôpital, et le Verdanson qui coule à distance de l'hôpital.

Méthodes

Des échantillons d'eau sont prélevés tous les mois, en amont et en aval du centre hospitalier Lapeyronie de Montpellier sur le Font d'Aurelle :

- Site Font d'Aurelle avant l'hôpital Lapeyronie (FAVL)
- Site Font d'Aurelle après l'hôpital Lapeyronie (FAPL)

et sur le Verdanson :

- Site Verdanson amont (VAVL)
- Site Verdanson aval (VAPL)



Pour chaque échantillon d'eau :

1) Utilisation du kit ColiCount® (Idexx) pour déterminer le niveau de contamination d'origine fécale



2) Mise en culture sur milieu TSA + antibiotique pour déterminer le niveau de tolérance des communautés cultivables vis-à-vis de différents antibiotiques

TSA supplémenté avec chacun des antibiotiques testés : céftazidime, céftazidime/tétraacycline, amoxicilline et ofloxacine
3 concentrations testées



Incubation 72 h à 22°C



- Dénombrement des colonies
- Rapport nombre d'UFC (Unités Formant Colonies) sur milieu avec ATB / nombre d'UFC sur milieu sans ATB, calcul du pourcentage de tolérance par rapport à la communauté totale

3) Analyse du gène de l'ARNr 16S par PCR-TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis) pour décrire le microbiote cultivable total et tolérant en fonction de l'antibiotique testé et de la concentration utilisée



- Prélèvement des communautés bactériennes
- Extraction d'ADN
- PCR ARN16S (région V3) et migration TTGE



- Découpage des bandes
- Séquençage des amplicons pour identification des OTUs (Operational Taxonomic Unit)
Caractérisation des communautés bactériennes totales et tolérantes

4) Utilisation des milieux sélectifs spécifiquement utilisés à l'hôpital pour rechercher le portage de bactéries multi-résistantes et pour rechercher les entérobactéries productrices de carbapénémases

Milieu Drigalski + Cefazidime (4 mg/l)
Milieu MacConkey + Cefotaxime (4 mg/l)
Milieu chromogène CARBA SMART® (biomerieux)



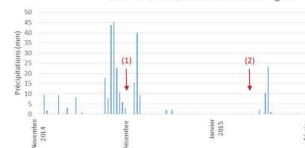
Incubation 24h à 37°C

Sélection de morphotypes, identification par Maldi-TOF ou séquençage 16S, antibiogramme, ...

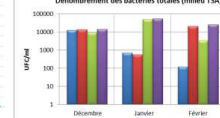


Résultats des 3 premières campagnes de prélèvements

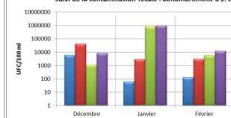
Pluviométrie et dates d'échantillonnages



Dénombrement des bactéries totales (milieu TSA)



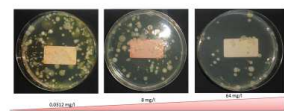
Suivi de la contamination fécale : dénombrement d'E. coli



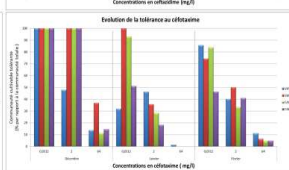
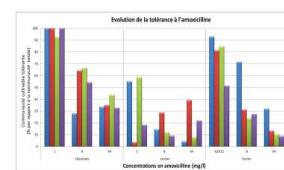
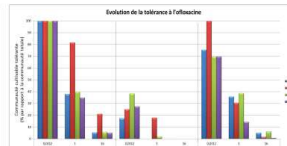
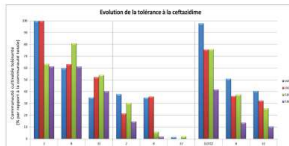
Les campagnes de prélèvements à un rythme mensuel permettront un suivi dynamique de la charge bactérienne totale des eaux circulant dans l'environnement péri-hospitalier. Le dénombrement de la bactérie *E. coli* donne des indications sur la qualité sanitaire des eaux.

Pour les 3 campagnes réalisées, nous observons des variations à la fois dans le temps et selon les sites avec une contamination fécale généralement moins élevée au point de prélèvement amont (AVL), comparativement au point aval (APL).

Ces données devront être confirmées et seront mises en relation avec des données hydroclimatiques et hydrologiques (Température de l'eau, débit, ...).

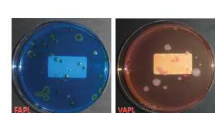


Exemple de communautés cultivables (FAPL) obtenues en présence d'amoxicilline

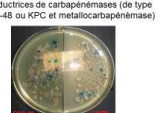


Le niveau de résistance des communautés bactériennes est évalué par le pourcentage de bactéries se développant sur des milieux sélectifs, en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. Pour chaque condition expérimentale, une diminution du nombre UFC est globalement observée avec l'augmentation de la concentration en antibiotique, suggérant de manière générale une sensibilité de la communauté bactérienne aux 5 antibiotiques testés. Cependant, différentes tendances sont observées en fonction de la date de prélèvement et du site prélevé : globalement, les communautés bactériennes cultivées à partir des eaux collectées en janvier sont plus sensibles que celles provenant des eaux de décembre et février. Par exemple, les communautés du Verdanson n'étaient pas inhibées avec 0,5 mg/l de tétracycline en janvier alors que moins de 10% de la communauté résistait à cette faible concentration en janvier. Par ailleurs, il est intéressant de noter que de faibles concentrations d'antibiotiques (0,0312 mg/l) peuvent inhiber jusqu'à 70% de la communauté bactérienne (ofloxacine sur le prélèvement de janvier). Les techniques de culture bactérienne permettant l'étude phénotypique de la résistance des communautés sera complétée par une approche moléculaire qui permettra de caractériser les communautés bactériennes résistantes.

Exemple de communautés bactériennes cultivables sélectionnées sur milieux sélectifs : Drigalski-CAZ (4 mg/l) et MacConkey-CTX (4 mg/l)

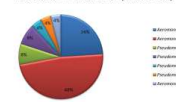


Exemple de communauté sélectionnée sur milieu chromogène CARBA SMART, utilisé pour le dépistage des entérobactéries productrices de carbapénémases (de type OXA-48 ou KPC et metallo-carbapénémase)

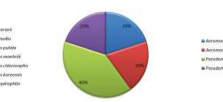


Les morphotypes isolés sur les milieux sélectifs utilisés en clinique pour rechercher les bactéries multirésistantes seront identifiés. Par exemple, la majorité des isolats identifiés à partir du milieu CARBA SMART (sites FAPL et FAVL, février) sont *Aeromonas* sp. et *Pseudomonas* sp. L'identification des autres morphotypes sera poursuivie et certaines espèces, connues en pathologie humaine seront plus particulièrement caractérisées (Antibiogrammes, recherche de gènes de résistance ou d'éléments génétiques mobiles, ...)

Espèces identifiées (n = 23) sur milieu OXA48 Prélèvement FAPL de février (n total > 200)



Espèces identifiées (n = 5) sur milieu CARB Prélèvement FAVL de février (n total = 156)



Conclusions

Ces premiers résultats montrent une forte présence de coliformes et de bactéries multirésistantes dans les cours d'eau urbains. L'impact des antibiotiques sur les communautés cultivables, variable selon les sites, montre que notre approche est discriminante pour l'étude des communautés résistantes dans l'environnement. Les campagnes poursuivies durant une année sont complétées par une caractérisation de l'eau : débit, pH, température, matières en suspension, ... et les résultats seront confrontés aux données d'épidémiologie de la résistance en médecine humaine et vétérinaire pour mieux préciser le risque sanitaire associé au pathobiotome et au résistome environnemental urbain.



Résistome environnemental urbain : impact d'un centre hospitalier (Montpellier – France)

Thibaut Guillou, Ayad Almakki, Christian Salles, Jean-Louis Perrin, Marie-George Tournoud, Thomas Mosser, Agnès Masnou, Patrick Monfort, Estelle Jumas-Bilak, Patricia Licznar-Fajardo

Différentes composantes du cycle urbain de l'eau transitent par une combinaison de réseaux (réseau hydrographique, réseau d'eaux pluviales, réseau d'alimentation en eau potable, réseau d'assainissement, ...) qui constitue un environnement privilégié pour les interactions microbiennes. Il est aujourd'hui clairement établi que les pressions anthropiques exercées sur les écosystèmes aquatiques en modifient le fonctionnement et impactent la dynamique des micro-organismes qui les composent. Ces écosystèmes deviennent alors des lieux d'évolution rapide des communautés microbiennes pouvant permettre l'émergence et la dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques, préoccupation actuelle majeure de santé publique. Le contrôle de ces pathologies infectieuses passe par une meilleure connaissance des réservoirs de communautés microbiennes résistantes, notamment des écosystèmes proches de l'homme.

Les effluents des réseaux d'assainissement des complexes hospitaliers sont étudiés en particulier en tant que sources de micro-organismes pathogènes et résistants et en terme d'occurrence de gènes de résistance^(1,2) alors que les zones aquatiques proches des hôpitaux et potentiellement contaminées par des eaux de ruissellement sont peu étudiées⁽³⁾.

Dans cette étude, la zone atelier est constituée de deux cours d'eau urbains prenant leur source dans l'agglomération de Montpellier : le Font d'Aurette canalisé sous le centre hospitalier et le Verdanson voisin qui draine une zone urbaine essentiellement résidentielle. Deux points de prélèvement sont définis sur chaque cours d'eau pour étudier l'impact de l'activité hospitalière et de la zone urbaine hors hôpital sur les communautés bactériennes. Simultanément à une collecte mensuelle d'échantillons de la colonne d'eau, des mesures de débit et de paramètres physico-chimiques sont réalisées. Le niveau de résistance des communautés bactériennes cultivables et leur biodiversité sont étudiés par une méthode originale associant culture (sur milieux supplémentés en antibiotiques) et approche moléculaire (PCR-*Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TTGE) du gène de l'ARNr 16S). En parallèle, nous suivons la dynamique d'indicateurs de contamination fécale (colimétrie) et d'indicateurs d'antibiorésistances : isolats sélectionnés sur milieux sélectifs (Drigalski, Mac-Conkey, cétrimide) ou chromogènes (CARB-OXA48, Biomerieux, sélectifs pour le dépistage des entérobactéries productrices de carbapénémases).

Les premiers résultats montrent une forte présence de bactéries multirésistantes dans les cours d'eau urbains, en particulier au niveau des points aval suggérant un effet de l'activité urbaine. Les niveaux de résistance des communautés bactériennes aux 5 antibiotiques testés (Amoxicilline, Cefotaxime, Cefotaxime, Ofloxacine et Tétracycline) diffèrent selon les sites et la date de prélèvement sans qu'il se dégage clairement un effet de l'activité hospitalière. Notons que pour certains prélèvements, de faibles concentrations d'antibiotiques peuvent inhiber une grande proportion de la communauté bactérienne : par exemple 0,0312 mg/L de cefotaxime peut inhiber jusqu'à 54% de la communauté totale cultivable. Au contraire, certaines communautés sont résistantes, même à de fortes concentrations d'antibiotiques (par exemple 52% d'une communauté testée peut résister à 32mg/L de ceftazidime).

Les campagnes seront poursuivies durant une année et les résultats seront confrontés aux données d'épidémiologie de la résistance en médecine humaine et vétérinaire. Des isolats environnementaux sélectionnés sur les milieux utilisés pour la détection des bactéries multi-résistantes et/ou productrices de carbapénémases seront identifiés et caractérisés en terme de résistance (aspects phénotypiques et génétiques) pour mieux préciser le risque sanitaire associé au résistome environnemental urbain. De plus, cette approche permettra d'évaluer l'impact des caractéristiques écosystémiques et des conditions climatiques et hydrologiques locales sur le niveau de résistance des communautés bactériennes.

⁽¹⁾ Alam MZ *et al.*, Incidence and transferability of antibiotic resistance in the enteric bacteria isolated from hospital wastewater. *Braz J Microbiol.* 2014 Jan 15;44(3):799-806.

⁽²⁾ Varela AR *et al.*, Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system *Water Res.* 2014 May 1;54:327-36.

⁽³⁾ Aujoulat *et al.*, Multidrug resistant *Rhizobiales* in an urban river around a hospital in Montpellier, France, 3rd International symposium on the environmental dimension of antibiotic resistance (EDAR3), May 2015, Wernigerode, Germany

Résistome environnemental urbain : impact d'un centre hospitalier (Montpellier – France)



Thibaut Guillou¹, Ayad Almakki¹, Christian Salles², Jean-Louis Perrin², Marie-George Tournoud², Thomas Mosser¹, Agnès Masnou¹, Patrick Monfort¹, Estelle Jumas-Bilak^{1,3}, Patricia Licznar-Fajardo¹

¹ UMR 5569 HydroSciences Montpellier, équipe Pathogènes Hydriques Santé Environnements, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France

² UMR 5569 HydroSciences Montpellier, équipe Pollutions Urbaines et Hydrologie, Place Eugène Bataillon CCMSE, 34095 Montpellier Cedex 5, France

³ Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU Montpellier, 80 Avenue Augustin Fliche, 34090 Montpellier

à la mémoire de Thomas, notre collègue, notre ami.

Introduction

Les multiples pressions anthropiques associées à l'environnement urbain influencent le fonctionnement des écosystèmes aquatiques et la dynamique des micro-organismes qui les composent. Les contraintes exercées sur les communautés microbiennes peuvent aboutir à l'émergence et la dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques, préoccupation majeure de santé publique. Les effluents des réseaux d'assainissement des complexes hospitaliers sont étudiés en tant que sources de micro-organismes pathogènes et/ou résistants et en tant que réservoir de gènes de résistance^[1,2] alors que les zones aquatiques proches des hôpitaux et potentiellement contaminées par des eaux de ruissellement sont peu étudiées^[3].

Objectifs et méthode

Objectif : étudier la dynamique temporelle du niveau de résistance aux antibiotiques et de la diversité des communautés bactériennes cultivables dans des eaux urbaines différemment influencées par les eaux de ruissellement d'un centre hospitalier.

Zone atelier : 2 cours d'eau urbains voisins et parallèles avec observations amont et aval :

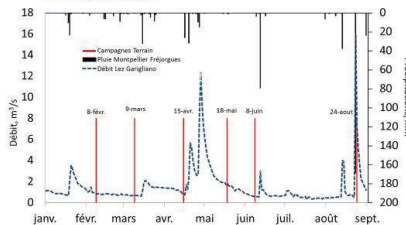
- Font d'Aurelle canalisée sous le centre hospitalier (amont (FAVL) et aval (FAPL) du centre hospitalier)
- Verdanson drainant une zone urbaine (amont (VAVL) et aval (VAPL) d'une zone résidentielle)

Méthode : prélèvement mensuel de la colonne d'eau et analyse associant techniques culturales (sur milieux sélectifs et/ou milieux supplémentés en amoxicilline, céfotaxime, ceftazidime, ofloxacine ou tétracycline) et approche moléculaire (PCR-Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE), région hypervariable V3 du gène de l'ARNr 16S).

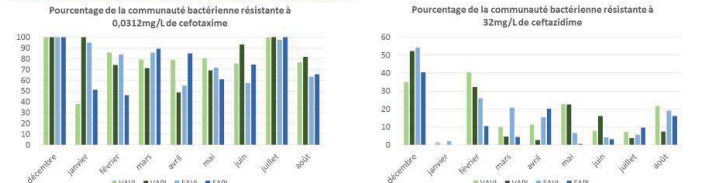


Résultats, discussion

Conditions hydrométéorologiques sur la période d'échantillonnage :



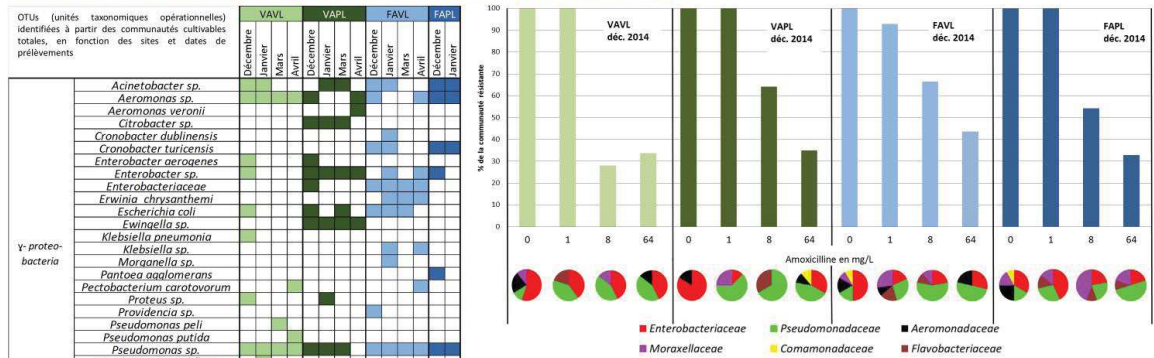
Niveaux de résistance des communautés bactériennes cultivables déterminés par culture sur des milieux sélectifs contenant des concentrations croissantes d'antibiotiques :



De faibles concentrations d'antibiotiques peuvent inhiber plus de 50% de la communauté bactérienne et ainsi conduire à un déséquilibre des communautés.

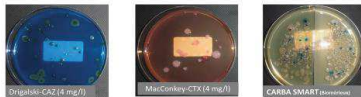
Certaines communautés sont peu inhibées par de fortes concentrations en antibiotique, ce qui montre le haut niveau de résistance de certaines bactéries dans les cours d'eau urbains.

Exploration de la richesse des communautés cultivables totales ou résistantes par approche moléculaire (TTGE) :



- Majorité des OTUs identifiées dans les communautés cultivables = γ -proteobactéries (29/33)
- Variation spatio-temporelle du nombre d'OTUs : de 4 à 11 OTUs
- Des genres à fort impact médical, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacter* et *Pseudomonas* retrouvés quel que soit le site de prélèvement
- *Morganella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Iodobacter* et *Myroides* spécifiques d'échantillon
- 6 familles majoritairement représentées dans les communautés totales et résistantes
- Richesse de la communauté bactérienne cultivable variable selon la concentration en amoxicilline
- Augmentation de la richesse en *Pseudomonadaceae* et réduction de la richesse en *Enterobacteriaceae* corrélées au taux d'amoxicilline.

Etude du risque sanitaire associé aux communautés résistantes dans l'environnement urbain : sélection d'isolats environnementaux sur milieux de cultures utilisés à l'hôpital



Majorité des isolats sélectionnés sur milieu CARBA SMART (milieu utilisé pour la détection d'isolats cliniques producteurs de carbapénémases) = *Aeromonas* sp. et *Pseudomonas* sp.

- Références :
- [1] Alam et al., Braz J Microbiol, 2014
 - [2] Varela et al., Water Res, 2014
 - [3] Asquith et al., EMBO symposium, 2015

Conclusions, perspectives

- ☑ Communauté résistante riche et dynamique dans le temps et l'espace
- ☑ Variations spatiales des communautés résistantes sans corrélation avec l'apport du ruissellement hospitalier
- ☑ 1^{ère} exploration du niveau de résistance aux antibiotiques de communautés hydriques dans l'environnement péri-hospitalier de Montpellier, avec notamment mise en évidence d'un haut niveau de résistances aux céphalosporines (céfotaxime et ceftazidime), antibiotiques à fort usage médical. La résistance aux céphalosporines est un phénomène émergent conduisant à de nombreux échecs thérapeutiques.
- ☞ Caractérisation des espèces connues en pathologie humaine : antibiogrammes, gènes de résistance... et confrontation aux données d'épidémiologie régionales de la résistance.
- ☞ Confrontation des résultats aux mesures de débit/paramètres physico-chimiques/suivi d'indicateurs de contamination fécale pour une évaluation de l'impact des caractéristiques écosystémiques locales sur le résistome environnemental.

Campagnes d'observations de la qualité chimique et bactériologique des eaux en amont et aval d'activités anthropiques
 ⇒ meilleure connaissance des communautés microbiennes résistantes des écosystèmes proches de l'homme
 ⇒ contribution à la lutte contre l'émergence des bactéries multirésistantes.

3. Etude de l'antibiorésistance et des communautés bactériennes dans l'aquifère karstique du Lez

Impact of hydrogeological functioning on bacterial communities in a Mediterranean karst system

En annexe de l'étude portant sur l'antibiorésistance en zone urbaine et à titre de comparaison, nous proposons une étude portant sur la ressource en eau alimentant la ville de Montpellier. Cette ressource est d'origine karstique et appartient au bassin versant de la ville de Montpellier. Au-delà de la comparaison entre les eaux karstiques et les eaux urbaines du même continuum, cette étude présente une certaine originalité car l'antibiorésistance à l'échelle des communautés n'a jamais été décrite dans un système karstique méditerranéen.

3.1. Contexte de l'étude

La gestion active de l'aquifère karstique¹ du Lez permet l'alimentation en eau potable de la ville de Montpellier depuis le milieu du 19^{ème} siècle. En effet, initialement (18^{ème} siècle), l'eau était amenée depuis la source Saint Clément jusqu'au réservoir du Peyrou par un aqueduc. Un prolongement de quelques kilomètres permettra en 1859 d'augmenter le débit, en exploitant la source du Lez (Desbordes, 2010; Maréchal et al., 2013). À cet aqueduc utilisé jusqu'en 1983 succèdera l'installation de conduits et de pompes. Ces installations ont permis d'optimiser l'alimentation en eau potable de Montpellier qui repose aujourd'hui encore sur l'aquifère du Lez (aire de recharge de la source du Lez d'environ 188 km² (Leonardi et al., 2012). Le débit journalier moyen est aujourd'hui d'environ 1000 L/s pour l'alimentation en eau potable et 160 L/s en débit réservé pour l'écoulement du Lez (**Fig. 43A**). Du fait d'un climat méditerranéen très contrasté, les flux d'eau alimentant l'aquifère sont qualitativement différents en période de basses et hautes eaux (**Fig. 43B**).

¹ aquifère karstique : structure géologique dont la double porosité permet des écoulements de flux et le stockage d'eau

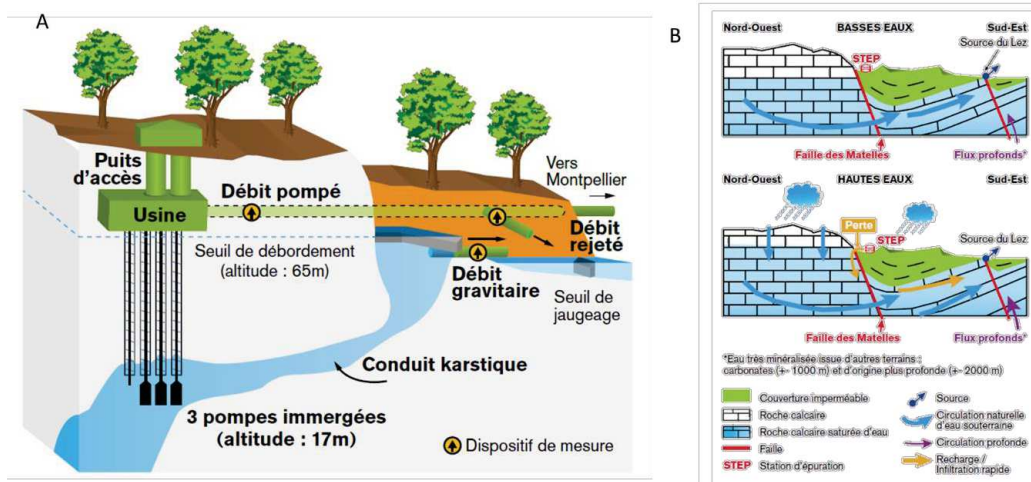


Fig. 43 : Système de pompage à la source du Lez (A) et flux alimentant l'aquifère du Lez en conditions climatiques contrastées : basses eaux et hautes eaux (B) ; figures de (Batiot-Guilhe et al., 2012; Maréchal et al., 2012).

Outre la variabilité de fonctionnement liée aux conditions climatiques, le fonctionnement de cet aquifère est complexe en termes de flux en raison de sa nature karstique (milieu hétérogène) (Fig. 44). Le site expérimental du Terrieu permet l'étude hydrodynamique et hydrochimique de l'aquifère à l'échelle locale. Situé sur le bassin d'alimentation de la source du Lez, ce site comprend 22 forages répartis sur 0,5 km² environ qui permettent l'étude des interactions et des échanges entre les éléments capacitifs (blocs fissurés et fracturés) et transmissifs (fractures, drains) (Jazayeri Noushabadi et al., 2011).

Les roches carbonatées très fracturées et karstifiées de cet hydrosystème permettent un transfert très rapide des eaux de surface vers l'aquifère. L'eau potable alimentant Montpellier est donc un mélange d'eaux profondes et d'eaux d'infiltration rapide. Les eaux d'infiltration peuvent être de qualité dégradée par les activités anthropiques (agricoles, stations d'épuration (STEP),...), altérant ainsi les eaux souterraines. On parle alors de vulnérabilité des aquifères karstiques, ce qui représente la sensibilité des eaux souterraines à la contamination par des activités anthropiques, du fait des caractéristiques (hydro)géologiques l'aquifère.

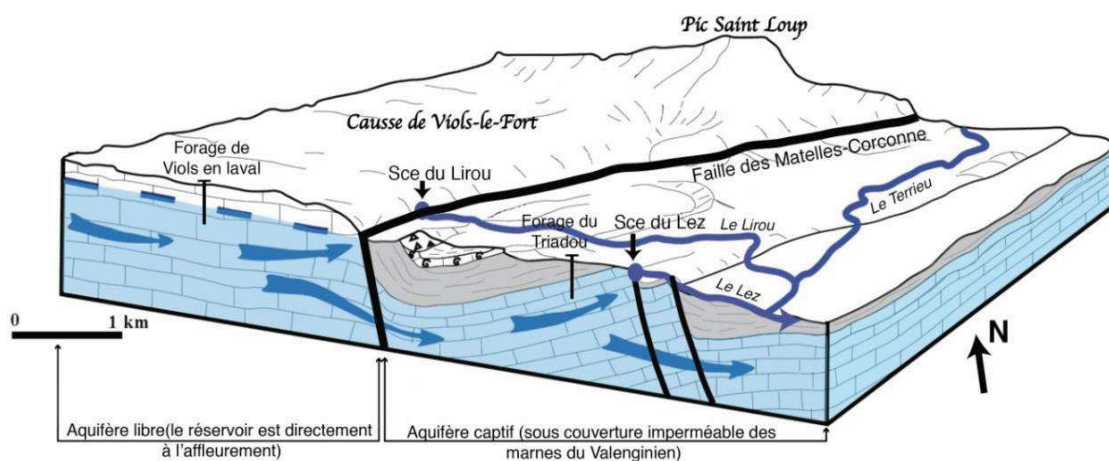


Fig. 44 : Schéma de l'aquifère du Lez. Bleu = zone saturée ; Gris : formations imperméables ; figure de (Maréchal et al., 2014)

Malgré l'importance des micro-organismes dans le fonctionnement des écosystèmes, les communautés microbiennes de l'aquifère du Lez et l'influence des conditions hydrochimiques et hydroclimatiques sur leur structure restent totalement inconnus. De plus, la capacité de l'aquifère du Lez à représenter un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques n'a jamais été évaluée. Il paraît alors pertinent de vérifier, en différents points et/ou compartiments de l'aquifère du Lez et sous différentes conditions hydroclimatiques, si la dynamique et le profil d'antibiorésistance des communautés bactériennes et le fonctionnement hydrodynamique du système karstique étudié sont liés en termes de flux bactériens, hydrochimiques et hydriques.

Née d'une collaboration entre microbiologistes, hydrochimistes et hydrogéologues, cette étude est focalisée sur l'aquifère du Lez (**Fig. 45**). L'objectif est d'étudier l'influence i) des structures hydrogéologiques (par exemple de type « drain » à temps de transfert très court ou « matrice » à temps de transfert long) ; ii) des conditions hydro-climatiques (hautes eaux avec contribution importante d'eau d'infiltration rapide / basses eaux avec contribution d'eau à plus long temps de séjour) ; iii) des caractéristiques hydrochimiques des eaux (niveau de minéralisation, présence de marqueurs de contamination anthropique, etc...) sur les communautés bactériennes en termes de structure et de niveau de résistance. L'alimentation en eau potable de l'agglomération montpelliéraine provenant très majoritairement de l'aquifère du Lez, une interprétation des résultats pourra être faite en termes de risque sanitaire.

Ce travail collaboratif étant encore en cours, les résultats présentés sont partiels.

Personnes ayant participé à ce travail, par ordre alphabétique : A. Almakki, C. Batiot-Guilhe, X. Durepaire, M. Héry, H. Jourde, E. Jumas-Bilak, V. Leonardi, P. Licznar-Fajardo A. Masnou, A. Molina Porras, V. de Montety, C. Roure, J.L. Seidel

Abstract

Karstic groundwater is particularly vulnerable to anthropogenic contaminations due to fast transfer from the surface through direct flow paths. Karst features thus play a crucial role in interconnecting surface and subsurface ecosystems, which may contribute to the circulation of antimicrobial-resistant bacteria. Microbial community in karst groundwater as well as the potential role of groundwater for the emergence and the dissemination of antimicrobial resistance is still poorly documented despite the relevance for human health.

This work focuses on the role of karstic aquifer as a potential reservoir for antimicrobial resistance in a Mediterranean area subjected to a high water demand. The Lez aquifer is a typical Mediterranean karst aquifer, which supplies drinking water to the city of Montpellier. The aims of this study were to evaluate the diversity and the antibiotic resistance level of bacterial communities in the Lez aquifer, and to establish relationship with the hydrogeological, hydrochemical and hydrological features of the aquifer.

Since April 2014, the Lez spring was sampled during middle, low and very low flows and intense flood event, for hydrochemical (major and trace elements, Total Organic Carbon, dissolved gases) and microbiological analyses (exploration of total, culturable and resistant bacterial communities). Minimal antibiotic concentrations inhibiting 50% of the whole culturable community were determined (c-IC₅₀).

We observed that the resistance level to antibiotics (Amoxicillin, Ceftazidime, Cefotaxime, ofloxacin and tetracycline) varies according to the sampling period, thus according to the residence time of water in the karst aquifer and to the mixing between different types of fluxes. Thereby, these considerations are important to elucidate how hydrogeology and human practices can affect the diversity and dynamics of microbial communities and resistance pattern of these communities in karst groundwater.

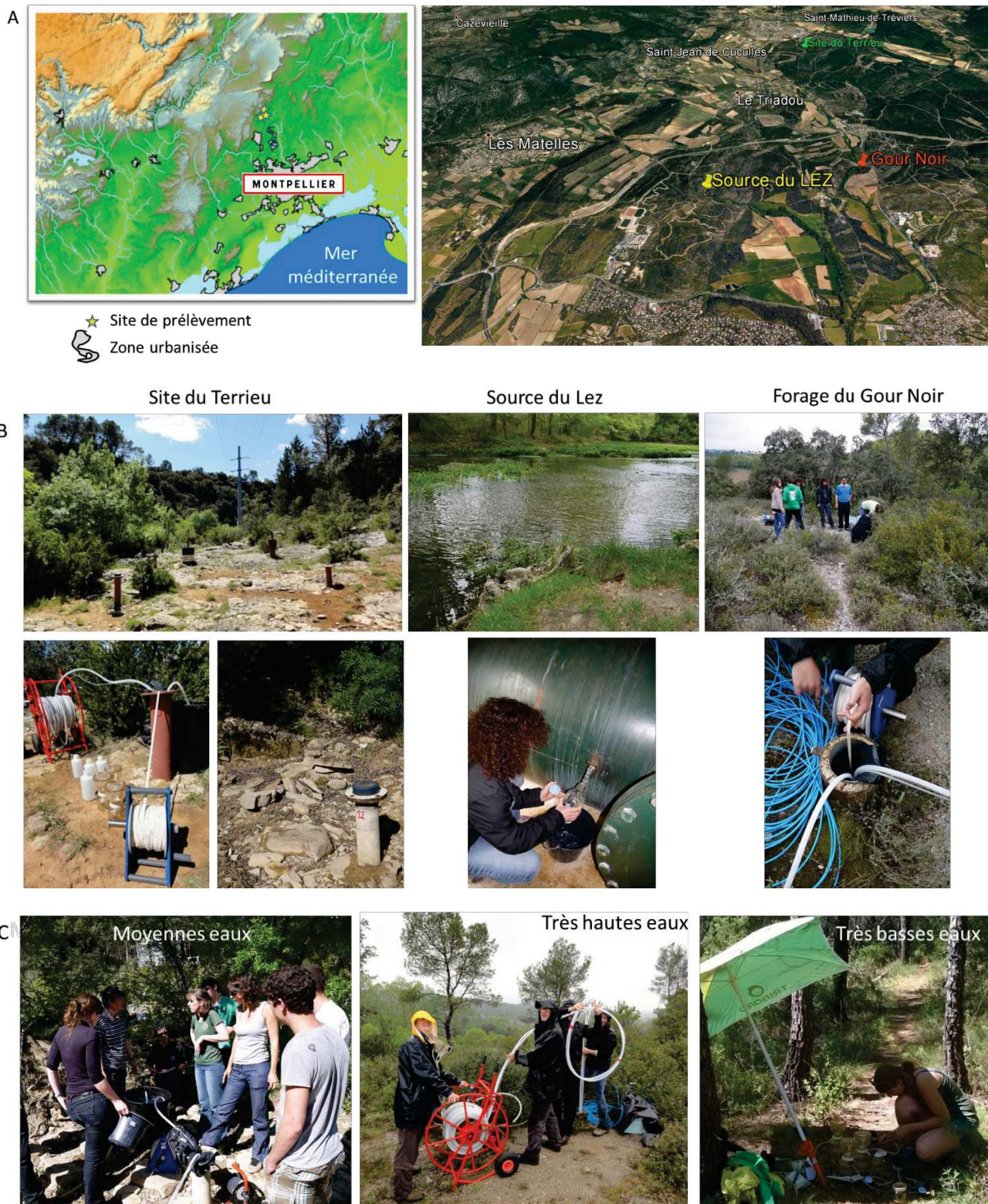


Fig. 45 : Présentation des sites de prélèvement. Illustration A) de la situation géographique (<https://www.geoportail.gouv.fr/> et Google Earth version 17/1/2017) et B) de l'environnement et des points de prélèvement, C) des conditions climatiques lors des prélèvements

3.2. Introduction

Hydrosystems ensure a continuum among hydrogeological (underground and superficial systems), technological (domestic, hospital, industrial and waste waters) and biotic compartments (natural habitat for diverse organisms). So in water, bacteria, whatever their origins (soil, water, polluted environment, animal and human microbiota) have direct connections with humans through the wide range of water usages. Another concern for human health is that water is a natural reservoir for resistance genes, either carried by antibiotics resistant bacteria or exchanged between microorganisms thanks to mobile genetic elements. Thus, the aquatic resistome can provide resistance genes to autochthonous bacteria but also to allochthonous human pathogens. These potential resistant bacteria can constitute an emerging public health problem through close contacts with humans via water uses.

Karsts are characterized by their heterogeneous structure, with i) **capacitive elements** defined as a carbonated matrix where **water flows are slow** and ii) **transmissive elements** defined as fractures (drain) where **fast circulations** of water / infiltrations occur. Moreover, karst systems play a crucial role in interconnecting surface and subsurface ecosystems, with potential fast transit of waters, especially during flood event through direct flow. Due to these networks, karst systems are complex ecosystems that are particularly vulnerable to anthropogenic contaminations and can contribute to the circulation of bacteria from water surface potentially polluted (runoff waters).

Although combined hydrodynamic and hydrogeochemical approaches are usually used to characterize karstic system functioning, it was suggested that microbial communities can be useful for the monitoring of these waters. However, microbial communities in karst groundwater are poorly documented. Few studies have investigated the structure, diversity, dynamics and activity of microbial communities in karst aquifers (Lin et al., 2012; Pronk et al., 2009), mainly because of their inaccessibility which restrict investigations to natural access points (caves or springs). Recently, evidence was given for the presence of a diverse and stable autochthonous microbial communities in alpine karst spring (Brannen-Donnelly and Engel, 2015; Farnleitner et al., 2005; Pronk et al., 2009; Wilhartitz et al., 2013). These indigenous bacteria are the natural residents that are adapted to the low-nutrient conditions of the aquifer. At contrary, allochthonous *i.e.* transient bacteria are present only through transports from surface layers. They can include enteric bacteria or photosynthetic cyanobacteria, which are unable to photosynthesize in the dark-aquifer environment. These allochthonous bacteria reach the aquifers by diffuse percolation or via swallow holes (Pronk

et al., 2009). They are unlikely to persist because their physiology and metabolism is not adapted to the environmental conditions and because of competition with autochthonous bacteria living in this ecosystem, both in planktonic and in biofilm states (on rock surfaces or on sediment particles).

Hydroclimatic variations can impact groundwater bacterial community equilibrium. Indeed, there is growing evidences that environmental changes including seasonal changes can affect the composition of these bacterial communities (Gregory et al., 2014). For instance, flood events can provoke a massive resuspension of sediment and a deterioration of biofilm, resulting in the leakage of bacteria from soil to karst aquifers and in the increase of assimilable organic carbon concentration (Simon et al., 2001; Zhou et al., 2012). Moreover, shifts in microbial community composition are not homogenous in the aquifer considering strata: subsurface microbial communities are considerably more dynamic over short intervals of time and space than the deeper ones (Lin et al., 2012).

Karst aquifers are a major water resource supplying more than 25 % of the world population and up to 50 % of the population in the Mediterranean basin. Even if the antibiotic resistant bacteria are of particular interest for public health, particularly when the groundwater is used as drinking water, antimicrobial resistance level in microbial karstic communities is poorly documented. Ribeiro and colleagues studied the occurrence of antimicrobial resistant *Pseudomonas* sp. and *Escherichia coli* in drinking water from karstic origin and karstic springs respectively (Flores Ribeiro et al., 2014; Ribeiro et al., 2012). They concluded that aquatic environments can contribute to the spread of antimicrobial resistance genes through interconnections between i) antimicrobial resistant fecal bacteria and autochthonous bacteria, ii) wastewater inputs, run off from pasture and natural groundwater reservoirs. However the global level of antimicrobial resistance at the community level has never been investigated in a karst system.

The main objectives of this pluridisciplinary study were to:

- i) investigate the special and temporal variations of groundwater bacterial biomass and **community composition** and assess ecosystem stability;
- ii) measure the **antibiotic resistance level** in karstic aquifer that has never been investigated at the bacterial community level and characterize the spatiotemporal variations of the resistant communities.

The potential transport of potential pathogenic microorganisms into drinking water and their antimicrobial resistance represent a real preoccupation for public health that has been

neglected so far. This study will improve our knowledge on the role of Mediterranean karst as potential reservoir for antimicrobial resistant bacteria.

In addition to microbiological analyses, physico-**chemical, hydrochemical and hydrological parameters** were monitored. Such an integrated approach will give insights into the complex relationships between microbiology, hydrochemistry and hydrodynamical behaviour of karstic systems. In the future, the monitoring of microbial communities may represent a valuable tool to assess both groundwater quality and hydrosystem functioning.

3.3. Materiel and methods

3.3.1. Study sites and sample collection

Water was sampled at the Lez spring, which is the main outlet of the aquifer and is used for drinking water exploitation for the Montpellier area (**Fig. 46A**). Water was also sampled in boreholes located in different hydrogeological compartments of the aquifer. The Terrieu experimental site, which is located in a limestone outcrop (unconfined aquifer), contains about 20 boreholes allowing exploration of different structural contexts. Among them, the P5 borehole corresponds to a capacitive element (matrix) where water flows are slow. P12/P20 boreholes were drilled in a transmissive environment (conduit) where fast circulation of water occurs (**inset of Fig. 46A**). The Gour Noir borehole is located in the captive part of the aquifer (*i.e.* in the aquifer under cover).

Water samples were collected at 4 sites (Lez spring, P5, P12/P20 and Gour Noir boreholes) during 4 campaigns covering different hydrological contexts (**Fig. 46B**): middle flow (April 2014), very low flow (September 2014), intense flood event (October 2014) and low flow (July 2015).

Water samples were collected from the boreholes using a MP1 pump and polyamide tubing (\emptyset 13/16 mm) (CIR Sud Roulements), which was sterilized by autoclave. All water samples were collected in sterile glass bottles and kept on ice packs to be transported to the laboratory within 2-3 h for immediate processing.

3.3.3. Indicator of fecal contamination

E. coli were quantified using Colilert-18 Quantitray system (IDEXX), according to manufacturer's instructions.

3.3.4. Total bacterial community analysis by Automated Ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

Six replicates of water samples (300 mL each) collected at each site were immediately filtered through sterile 0.22 µm Nucleopore filters that were then transferred to a collection tube (Nunc), frozen in liquid nitrogen, and stored at 80 °C until DNA extraction. DNA was then extracted from three of the filters (triplicates) using the Power Water DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc.). The bacterial ribosomal intergenic regions were amplified using primers ITSF and ITSr according to Cardinale (Cardinale et al., 2004). Automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) was performed on an Agilent 2100 Bioanalyzer using the 7500 DNA kit (Agilent Technologies).

3.3.5. Cultivation-based approach to study antimicrobial resistance of bacterial communities

Five hundred milliliters of each water sample were filtered through 0.45 micron-pore-size cellulose sterile filters (Sartorius). The filter was then inserted in 5 mL sterile water and mixed vigorously by vortexing to remove bacteria from the filter. Bacterial communities were cultivated by plating 200 µL of the bacterial community suspensions (concentrated, undiluted and diluted) on trypticase soy agar (TSA, Difco laboratories). Plates (TSA) without antibiotic were used to assess the total cultivable community. TSA plates complemented with an antibiotic from three major antibiotic groups (β-lactamines: amoxicillin (AMX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ); fluoroquinolones: ofloxacin (OFL) and tetracyclines: tetracycline (TET)) were used to select cultivable resistant communities. Antibiotics concentrations ranged from 0.0312 mg/L to 64 mg/L.

After 48 h incubation at 22 °C, colonies were counted. Proportions of resistant bacteria among the total cultivable community were expressed as percentages, corresponding to the ratio of colony forming units (CFU) counts on antibiotic-supplemented medium to the CFU counts on antibiotic-free medium. The concentrations inhibiting at least 50% of the whole cultivable community (Community Inhibitory Concentration, c-IC₅₀) was determined.

3.3.6. Resistant cultivable bacterial community analysis

The composition of the resistant bacterial communities was analyzed using temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) method. Bacterial DNA was extracted from colonies harvested from TSA media supplemented or not with antibiotics, by enzymatic method (MasterPure Gram positive DNA purification kit, Epicentre) according to the manufacturer's recommendations. DNA yield was quantified at 260 nm and its purity was estimated by the ratio (OD260/OD280) using spectrophotometer (Eppendorf BioSpectrometer). Extracts were then diluted to a final concentration of 50 µg /mL.

A 199 bp fragment overlapping the 16S rRNA V3 variable region was amplified using the primers HDA1 (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT-3') and HDA2 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'). A 40-bp clamp, named GC (5'CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') flanked the 5' extremity of HDA1 (Ogier et al., 2002) in order to form HDA1-GC primer. PCR mixture (25 µL) contained 1.25 units of Taq DNA polymerase in appropriate buffer (FastStart High Fidelity PCR system, Roche), 200 µM of dNTPs, 0.2 µM of each primer (Sigma-Aldrich) and template DNA extract (0.5 µL, 50 µg/mL). PCR conditions were as follow: initial denaturation for 2 min at 95°C, then 35 cycles consisting of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 62°C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min; with a final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were checked by electrophoresis in a 1.5% agarose gel before TTGE migration in the DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories) as already described (Michon et al., 2010). Briefly, gels containing 8 % (w/v) bisacrylamide (37.5:1), 7 M urea, 40 µL N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, and 0.1% (w/v) ammonium persulfate were run in 1X Tris/Acetate/EDTA (TAE) buffer at pH 8.3. Amplified DNA (6µl) was loaded on the gel with 6 µl of in-house dye marker (50% sucrose, 0.1% bromophenol blue). The electrophoresis conditions were 46 V for 16 h with an initial temperature of 62 °C and a final temperature of 70 °C corresponding to an increase of 0.4°C/h. In order to obtain thin discrete bands, a pre-migration for 15 min at 63 °C and 20 V was done after loading. Pre-migration and migration were performed with additional magnetic shaking in the electrophoresis chamber. Gels were stained for 15 min with ethidium bromide (10 g/L) in 1X TAE buffer, washed for 45 min in 1X TAE buffer, and photographed under UV illumination.

For sequencing, TTGE bands were excised from the TTGE gel and washed twice in sterile water. DNA eluted in 10 mM Tris buffer (pH 8.5) was used as template. Amplification of the 16S rRNA gene V3 region was performed using 1 µL band eluate and the primers HDA1-HDA2 (Ogier et al., 2002) and the following PCR reaction mix: 25 µL reaction mixture

containing 0.2 μM of each primer, 200 μM each dNTP , 2.5 mM MgCl_2 and 1.25 U Taq DNA Polymerase (Go Taq G2 flexi) in the appropriate 1X buffer. PCR conditions are those described above. PCR products were checked by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and sequenced on an Applied Biosystems automatic sequencer (Genewiz). Each sequencing chromatograph was visually inspected and corrected. The sequences were analyzed by comparison with Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and RDPII databases (<http://rdp.cme.msu.edu/>) using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and seqmatch programs, respectively. The reference sequence sharing the highest similarity was used for Operational Taxonomic Units (OTUS) affiliation.

3.3.7. Statistical analysis on ARISA profiles

ARISA electrophoregrams were edited with the Agilent 2100 bioanalyser software and the data were exported into Excel. Principal component analysis (PCA) was performed using the free software R 3.3.2 (<http://www.r-project.org/>, 2016) using the package Rcmdr.

3.4 Results

3.4.1 Geochemical characterization of water

Water from boreholes had geochemical features that were typical of karstic systems, i.e. high hydrogenocarbonate and calcium concentrations (**Table 12**).

Table 12: Chemical composition of water samples collected during the 4 campaigns

Samples	date	T°C	E.C.* $\mu\text{S}/\text{cm}$	DOC* mg/L	pH	mg/L							
						HCO_3^-	Cl ⁻	NO_3^-	SO_4^-	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
Lez spring	2014-04-22	16,4	803	7,5	7,0	385,2	54,9	3,7	28,5	120,7	9,3	34,5	2,0
Gour Noir		17,1	710	3,2	6,9	415,9	13,2	2,9	10,5	139,5	4,6	7,2	
P5		15,6	715	4,1	6,9	391,5	29,1	7,9	13,8	131,7	4,2	13,9	0,9
P12		16,0	857	3,4	6,9	403,0	55,6	5,5	21,3	142,5	3,9	32,6	2,4
Lez spring	2014-09-01	17,4	793	7,3	7,2	429,3	59,5	3,7	25,6	119,9	10,2	35,5	1,7
Gour Noir		18,4	710	0,9	6,8	419,2	14,1	2,0	16,7	141,9	4,7	8,8	
P5		17,9	719	3,4	6,9	399,6	36,4	7,2	13,2	135,0	4,6	14,4	
P12		<i>no water</i>											
Lez spring	2014-10-14	16,3	658	nm	7,0	373,8	24,3	4,8	18,2	122,2	5,9	14,0	0,9
Gour Noir		17,6	585	6,8	7,0	363,8	7,9	3,8	11,0	121,0	3,4	5,0	0,0
P5		17,0	623	7,2	7,4	358,8	17,0	5,9	20,3	124,1	3,7	9,1	1,2
P12		16,1	598	6,1	7,3	348,6	15,6	4,7	18,4	119,5	3,3	8,3	1,0
Lez spring	2015-07-15	17,3	799	5,9	7,2	377,4	53,2	3,5	23,9	120,5	9,6	33,5	1,6
Gour Noir		18,2	691	2,7	6,8	431,1	9,3	2,1	9,4	136,7	4,4	6,0	0,6
P5		19,6	664	3,8	6,8	373,7	24,6	6,2	14,1	123,4	4,7	11,9	1,0
P12		16,3	614	2,2	7,0	369,5	13,9	4,1	12,0	118,3	4,0	7,8	1,3

*EC = electrical conductivity; DOC = dissolved oxygen concentration

3.4.2. *E. coli* numeration (FIB, fecal indicator bacteria)

Even if P5 and P12/P20 were very close (few meters apart), they presented different counts for *E. coli* contamination, indicating that permissive and transmissive compartments of the aquifer were differently impacted by fecal contamination. Moreover, during intense flood event, fecal indicators were higher than in middle or low flow conditions underlying water contamination through contaminated runoff waters (**Fig. 47**).

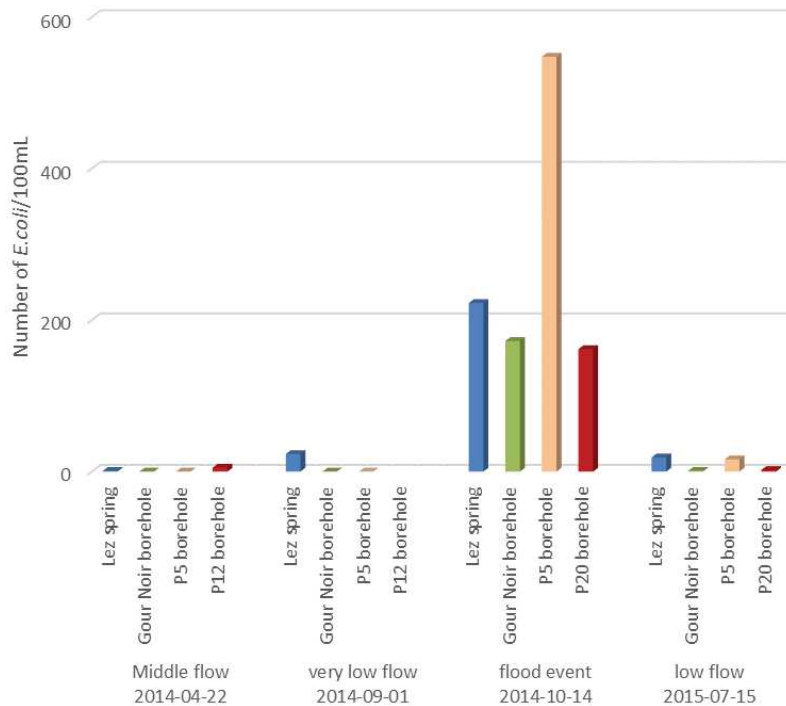


Fig. 47: Quantification of *E. coli* according to sites and sampling campaigns

3.4.3. Spatial and temporal dynamics of total community

The spatio-temporal dynamic of the bacterial community structure was monitored by a DNA fingerprint method (ARISA). The results obtained for the April 2014 campaign (middle flow conditions) are shown in **Figure 48**. Principal Component Analysis showed that spring water was discriminated from boreholes water. Moreover, this analysis allowed the discrimination between boreholes P5 (capacitive compartments) and P12 (transmissive compartments), which were very close geographically (a few tens of meters). So, in this context, microbial community monitoring represented a valuable tool, sensitive enough to discriminate capacitive and transmissive compartments of the aquifer.

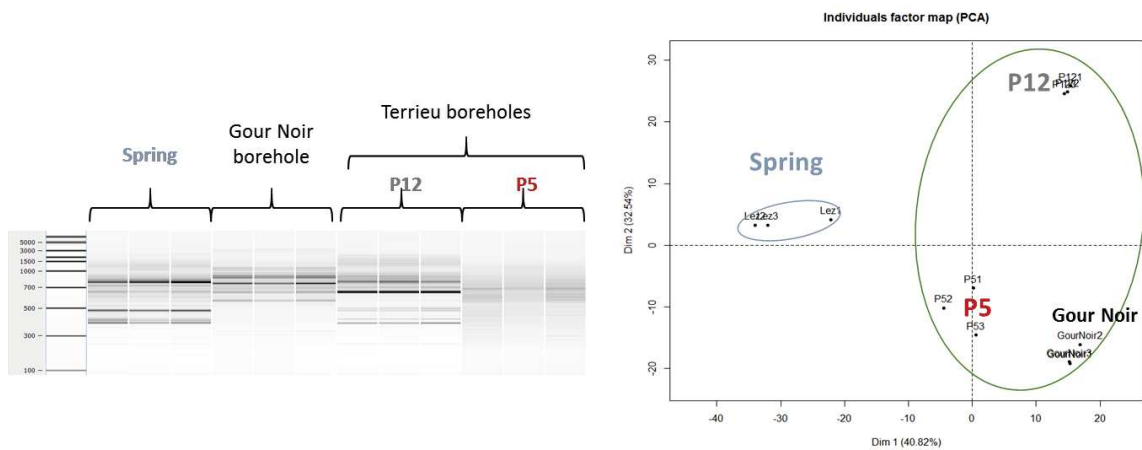


Fig. 48: Bacterial community structure analysis for the April 2014 campaign (middle flow conditions): ARISA fingerprints (A) and Principal Component Analysis based on these fingerprints (B).

In October 2014, (flood event), P5 and P20 showed indistinguishable bacterial communities (**Fig. 49**) but these communities were very different from the ones in Gour Noir. This result probably reflected different contributions of water from the surface.

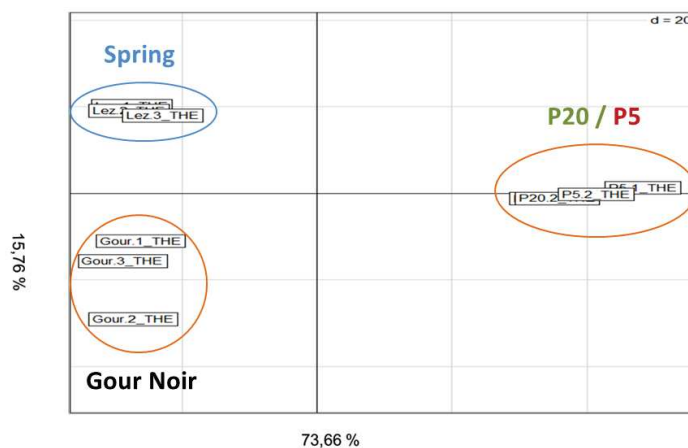


Fig. 49: Bacterial community structure analysis during an intense flood event, October 2014 campaign (Principal component analysis based on ARISA fingerprints, individual factor map).

Then, because P5 seemed to be particularly affected by anthropogenic activities (high *E. coli* concentration during an intense flood event), this borehole was chosen to further follow the dynamic of bacterial community in the capacitive part of the aquifer (**Fig. 50**). PCA showed high similarities among bacterial communities in water sampled during low (September) and middle flow (April), giving evidence for a stable autochthonous karstic bacterial community. Conversely, in water sampled during high flood event, bacterial communities were clearly distinct to the other ones, suggesting the substantial contribution of allochthonous bacteria infiltrating from the surface.

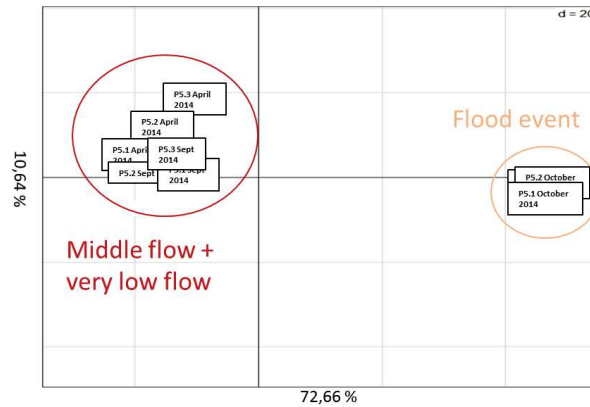


Fig. 50: Bacterial P5 borehole community structure analysis depending on hydrological conditions (Principal component analysis based on ARISA fingerprints, individual factor map).

3.4.4. Spatial and temporal dynamics of the cultivable community

For spring water, cultivable bacterial community reached the maximum during flood event. However, for borehole waters, the hydrological conditions leading to the biomass maximum varied depending on the aquifer compartment mainly in very low flow conditions (**Fig. 51**). The Lez spring water presented the lowest count of total cultivable bacteria but the abundance increased 100 fold between very low conditions to very high flow. Variations for the other sites were not such marked.

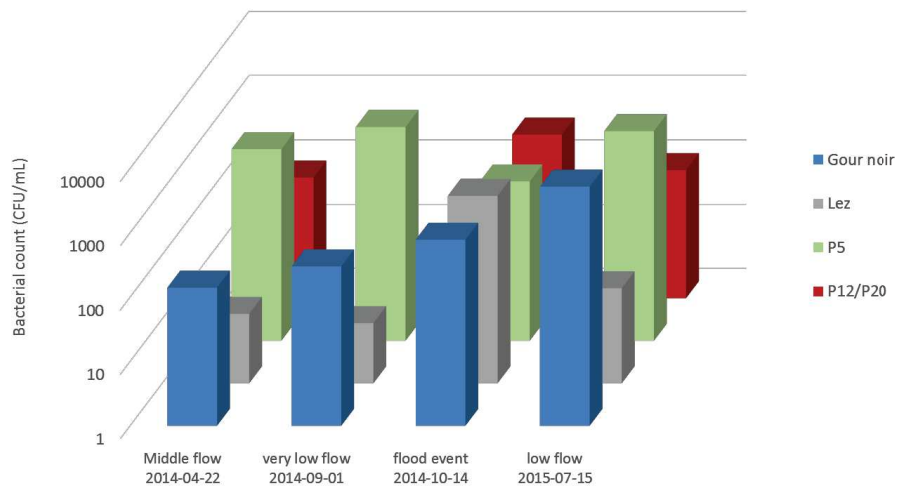


Fig 51: Quantification of total cultivable bacteria according to the sites and the sampling campaigns in CFU/mL

By 16S rDNA PCR-TTGE fingerprinting, the repertory of families among the community was assessed for the campaign realized on April 2014, corresponding to middle flow conditions. Comparison of family repertories according to sites is represented in **Figure 52**.

A

Sampling sites	total	Elements +/- shared
Gour Noir Lez spring P12 P5	5	<i>Flavobacteriaceae</i> <i>Sphingobacteriaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Bacillaceae</i> <i>Aeromonaceae</i>
Gour Noir Lez P12	2	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>moraxellaceae</i>
Gour Noir Lez P5	1	<i>Micrococcaceae</i>
Gour Noir P12 P5	1	<i>Xanthomonadaceae</i>
Lez	6	<i>Alteromonadaceae</i> <i>oxalobacteraceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Campylobacteriaceae</i> <i>Paenibacillaceae</i> <i>Neisseriaceae</i>
Gour Noir	4	<i>Rhizobiales</i> <i>Alcaligenaceae</i> <i>Actinomycetales</i> <i>Microbacteriaceae</i>
P5	1	<i>Comamonadaceae</i>

B

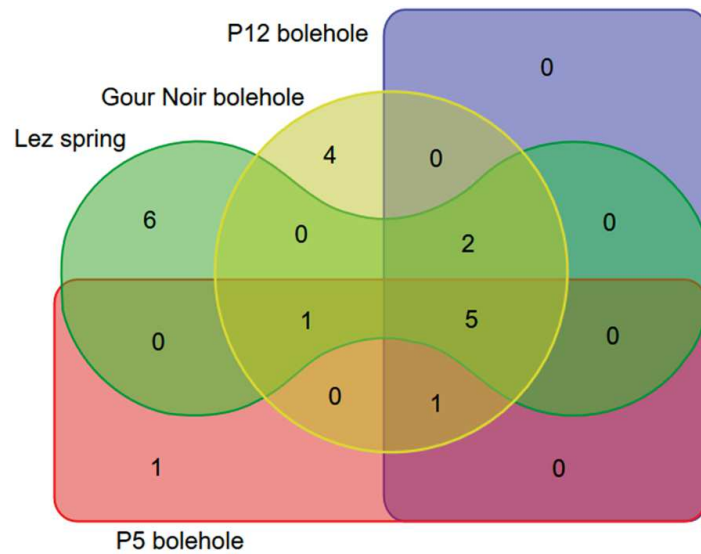


Fig 52: Repertory of bacterial families in the 4 sampling sites, A) and Venn diagram showing the distribution of shared and specific bacterial families according to the sampling site, B); April campaign.

The cultivable bacterial family repertory ranged from 8 to 14 members according to the water origin: 14 in Lez spring, 11 in Gour Noir and 8 in each P5 and P12 sites. For all sites, the families belonged to 3 common phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*) but *Actinobacteria* was represented only once in Gour Noir. The Venn diagram indicated that a majority of families (11/19) were specifically represented in only one site, mainly in Lez spring and in Gour Noir. By contrast, 5 families were common to the 4 cultivable communities. Families gathering members recognized to behave as shuttle between environment and human or animals (enterobacteria, aeromonads, pseudomonads and *Moraxellaceae*) were detected in all sites or in 3 of the sites.

As water from Lez spring is the source of Montpellier drinking water, temporal dynamics of cultivable communities from Lez spring were followed in contrasted hydrological conditions (Fig. 53).

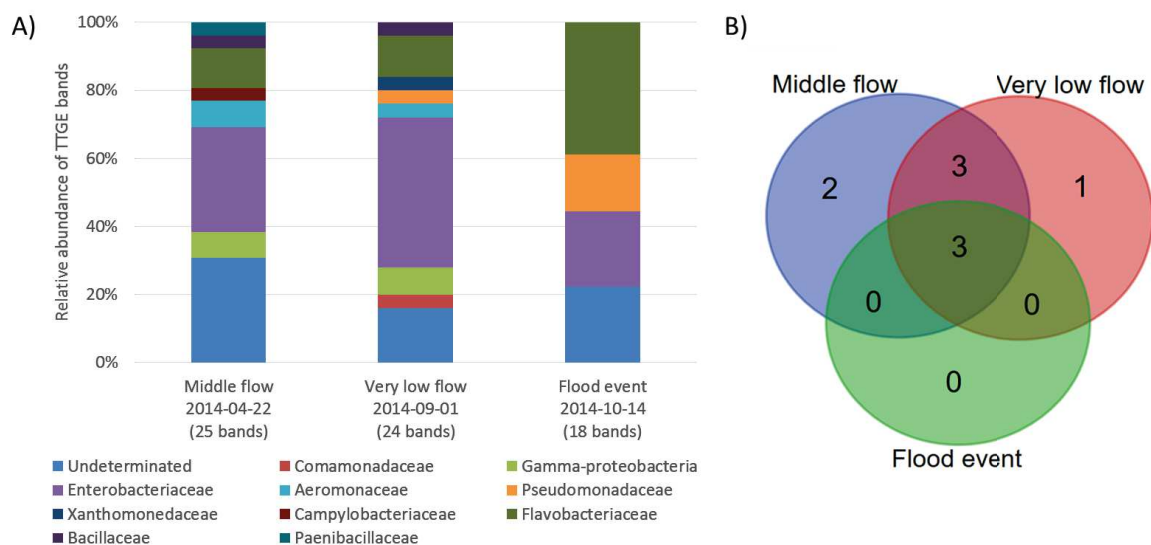


Fig. 53: Temporal dynamics of Lez spring communities, A) Relative abundance of bacterial families in water Lez spring samples and B) Venn diagram showing the distribution of bacterial families according to the sampling period.

Comparing Middle flow and very low flow conditions, cultivable bacterial communities were nearly stable but during a flood event, a decrease of diversity was observed, with only three families equally composing the community: *Flavobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*. The two latter grouped bacteria involved in human diseases or known as shuttle between human host and environment. The Venn diagram showed that flood event did not bring absent from the spring in low and middle flow. This suggested that flood change the autochthonous bacterial distribution but not provide allochthonous contamination.

3.4.5. Spatial dynamics of antimicrobial resistance in cultivable community

Then, the repertory of families among the resistant communities growing onto diverse concentration of antibiotics was explored (**Fig. 54**). The ATB concentrations chosen corresponded to a very low and very high concentration as well as 1 or 2 intermediate concentrations. In all cases, the higher richness expressed as crude taxonomic diversity index (DI) was encountered in absence of antibiotics. The DI ranged from 26 to 3 in the Lez spring with a particular decrease of diversity in presence of ofloxacin, from 18 to 4 in the Gour Noir borehole, from 17 to 5 for P5 borehole and from 24 to 6 in P12 borehole. It is to note that the DI dynamics was not linear and did not systematically decrease with increasing concentrations of antibiotics. The affiliation of a band to a taxon was achieved for 1057 TTGE bands (87.7 %) out of the 1205. The identification of OTUs to the family level was showed in Figure 54.

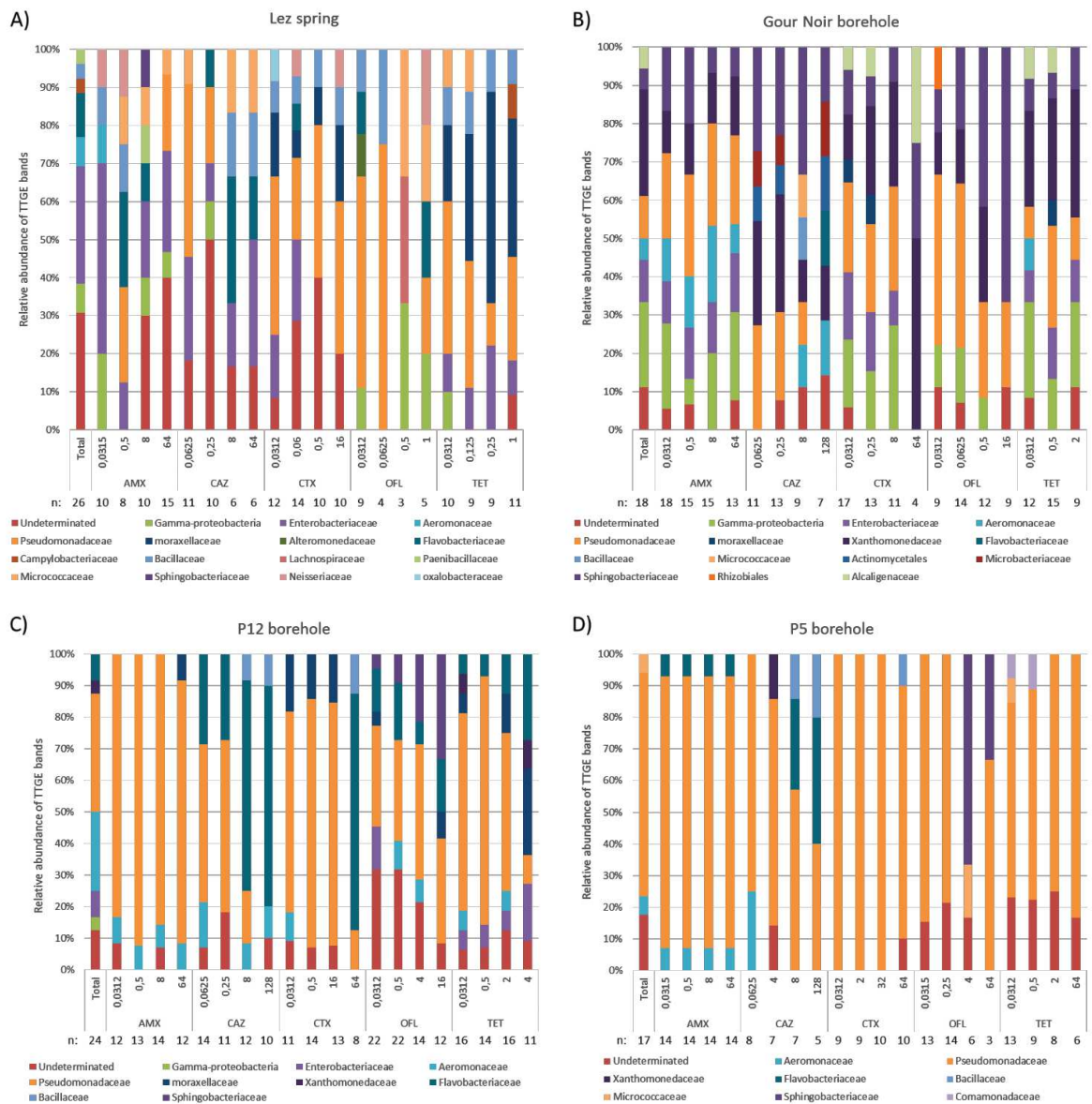


Fig. 54: Relative abundance of bacterial families in water samples from the Lez spring (A), Gour Noir borehole (B), P12 borehole (C) and P5 borehole (D) according to the selecting antibiotic and the antibiotic concentrations in mg/L. n: number of bands on TTGE profile. AMX for amoxicillin, CTX for cefotaxime, CAZ for ceftazidime, OFL for ofloxacin and TET for tetracycline.

Lez spring and Gour Noir waters presented rich communities that roughly kept their richness in presence of antibiotics. By contrast, P5 and P12 communities were dominated by *Pseudomonadaceae*, which sometimes decreased at high antibiotics concentrations. For instance in P5, *Pseudomonadaceae* rates decreased at 8 mg/L of ceftazidime, 64 mg/L of cefotaxime and 4 mg/L of tetracycline. At these concentrations, they were replaced by *Flavobacteriaceae* and *Moraxellaceae*. Interestingly, the *Pseudomonadaceae* remained dominant for the same selective concentrations of antibiotics in P12.

As awaited, the antibiotics pressure modified the structure of cultivable communities. Concerning Lez cultivable community, *Enterobacteriaceae* and *Bacillaceae* were identified in all conditions, except in presence of ofloxacin and tetracycline, respectively. As *Pseudomonas* is naturally resistant to cefotaxime, *Pseudomonadaceae* were largely identified in presence of cefotaxime but also in presence of ofloxacin and tetracycline. The same profile was observed with *Moracellaceae* members.

Paenibacilliaceae, *Aeromonadaceae* and *Campylobacteriaceae* were identified within the total community, *i.e.* without antibiotic pressure and in only one pressure condition: amoxicillin 8mg/L, amoxicillin 0.003 and tetracycline 1mg/L respectively. Some families were identified only in one culture condition: *Alteromonadaceae* with ofloxacin 0.0312mg/L, *Lachnospiraceae* with ofloxacin 0.5mg/L, *Sphingobacteriaceae* amoxicillin 8mg/L and *Oxalobacteriaceae* cefotaxime 0.0312mg/L. The effect of very low concentration of antibiotics suggested a particular vulnerability of the natural community to antibiotic contamination. Indeed, low concentration such as 0.0312 mg/L of ofloxacin can be encountered in natural environment.

As regards Gour Noir community under antibiotics pressure, it can be noted that *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae* and *Sphingobacteriaceae* were present and represent in almost all pressure conditions the majority of the culturable communities. *Enterobacteriaceae* were absent in presence of ofloxacin (like for Lez communities) and ceftazidime. Some minority resistant populations were detected only if a selective pressure was exerted on the whole community: *Flavobacteriaceae*, *Bacilliaceae*, *Micrococcaceae*, *Microbacteriaceae* and *Actinomycetales* with ceftazidime and *Rhizobiales* with ofloxacin. *Moraxellaceae* were detected under cefotaxime and tetracycline selection pressure.

3.4.6. Temporal dynamics of antimicrobial resistance level of cultivable community

Culture of bacterial communities onto media containing increasing concentrations of amoxicillin, cefotaxime, ceftazidime, ofloxacin and tetracycline lead to the determination of the antibiotic concentration necessary to inhibit at least 50% of the whole cultivable community (c-IC₅₀) (**Fig 55**). Determining c-IC₅₀ for amoxicillin lead to profiles very different between spring water and borehole waters. Indeed, whatever the hydrological conditions, c-IC₅₀ for Lez source was equal or inferior to 16mg/L while bacterial communities from the 3 borehole waters were very resistant (c-IC₅₀ equal or superior to 64mg/L). Cephalosporins (cefotaxime and ceftazidime) pressures did not lead to such discrimination between water types. Indeed, their c-IC₅₀ values were very similar except for some conditions. For example,

all $c\text{-IC}_{50}$ for cefotaxime were equal or inferior to 16mg/L except for P5 waters (32mg/L). These values were higher during a flood event, suggesting that bacterial communities shifted to a flood community more resistant to cefotaxime. The same phenomenon was observed with ceftazidime, $c\text{-IC}_{50}$ reaching 64mg/L for P5 and P12/P20 communities during a flood event when these values were equal or under 16mg/L in low and middle floods (**Fig. 55A**).

For a given hydroclimatic condition, the $c\text{-IC}_{50}$ values of ofloxacin and tetracycline were in the same order of magnitude for the collected water coming from the 3 sites except during the flood event that induced an increase of resistance profile but in different order of magnitude: Lez communities showed higher resistance to both antibiotics when Gour Noir and P5 showed a higher resistance to ofloxacin and tetracycline, respectively (**Fig. 55B**).

Finally, bacterial community of P5 site was more resistant than P12/P20, Gour Noir and Lez spring. Therefore, in general, the level of resistance is higher in capacitive part of the aquifer (P5) than in the transmissive part (P12/P20) or at the spring.

ARISA analysis on the total bacterial community allowed the discrimination between borehole waters and spring water. Moreover, profiles were different with respect of capacitive or transmissive compartments, indicating that the flow velocity influences community structures. However, during intense flood event, these differences disappeared. Pronk and colleagues demonstrated that during periods of high input of water from a swallow hole, the autochthonous microbial community was overprinted by the allochthonous bacteria (Pronk et al., 2009). So, they attributed the high variability of bacterial communities in the spring water to the environmental fluctuations at the swallow hole. However, the authors underlined that contamination of karst groundwater by allochthonous bacteria is unlikely to persist. We demonstrate that flood reduces the taxonomic repertory and changes the relative rate of autochthonous bacteria in water. In opposite to Pronk et al. (2009a), the contribution to allochthonous bacteria was not showed.

The bacterial biomass measured was in the same order of magnitude than the one reported for alpine aquifer that is about 10^7 to 10^8 UFC/L (Farnleitner et al., 2005; Zhou et al., 2012). During high flow conditions, biomass in Lez spring was as high as described in alpine karstic systems (Wilhartitz et al., 2013). The abundance increase can be explained by detachment of bacteria from biofilms (Blenkinsopp and Lock, 1994). Moreover, input of organic particles provides nutrients that potentially stimulate growth of allochthonous and/or autochthonous bacteria.

The P5 borehole water, with high residence time, presented a higher number of bacteria compared to P12 borehole, except in context of flood event. Conversely, some authors notified a lower number of bacteria in water with high residence time and constant flow than in water with a variable hydrological regime (Farnleitner et al., 2005; Zhou et al., 2012).

In Lez spring waters, relative stable cultivable communities were observed. This observation is in agreement with previous studies showing a stable alpin endokarst microbial community (Farnleitner et al., 2005). Among cultivable bacteria, three dominant bacterial families (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Flavobacteriaceae*) were encountered whatever the hydrological conditions (Middle and very low flows). However, *Comamonadaceae*, *Aeromonadaceae* and *Campylobacteriaceae* were not identified during the intense flood event. These data were in accordance with previous studies. Indeed, karstic bacterial communities were typically described to be dominated by proteobacteria (beta and gamma classes) (Gregory et al., 2014; Zhou et al., 2012). Pronk and colleagues

showed that proteobacteria represent 42 to 52% of the bacterial community. Firmicutes (particularly *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp.) contribute to 2 to 27% of the community, with a hypothesized allochthonous origin (Pronk et al., 2009).

Cultivable community was explored with culture media containing various concentrations of antibiotics. Some bacterial families were detected only when a selective pressure was exerted on the whole community. It was the case for example for *Alteromonadaceae*, *Lachnospiraceae*, *Shingobacteriaceae* and *Oxalobacteriaceae*. These families probably represented bacterial group present in minor proportions in the initial community that become dominant under antibiotic pressure due to their resistance capacity.

Amoxicillin is a massively used antibiotics, which is excreted unchanged in urine and feces. Reaching the environment, these products are rapidly degraded (through chemical and microbiological processes) in aquatic environments. Here, studying the level of resistance to amoxicillin allowed the discrimination between spring water and borehole waters: borehole communities presented very high resistance level when spring communities were less resistant.

Cefotaxime and ceftazidime are 3rd generation cephalosporins, characterized by a extended-spectrum activity, i.e. active against a large range of bacteria. They are particularly used in a context of hospital-acquired infections. These two molecules have different activity spectrum: ceftazidime presents a greater activity than cefotaxime against *Pseudomonas aeruginosa*, other *Pseudomonas* species, *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* sp. (*Moraxellaceae*). Investigating the composition of the cultivable community, a high proportion of *Pseudomonadaceae* had been highlighted particularly in Terrieu P5 and P12. This can explain the high resistance level of this community to cefotaxime. Tetracycline presents a large spectrum activity and is widely used in veterinary health but currently, its consumption decrease. In the environment, tetracyclines rapidly precipitate forming complexes with cations like calcium or magnesium and then accumulated in sediments or sludge. The resistance to tetracycline varied according to site and conditions, mainly in high flood conditions.

β -lactams and tetracyclines are antibiotic obtained by hemi-synthesis from natural molecules meaning that bacteria could naturally develop resistance. Moreover, due to its massive use, more and more bacteria are resistant to this antibiotic related to acquisition of resistance genes encoding β -lactamases. At contrary, ofloxacin (fluoroquinolone family) is a

synthetic antibiotic used nowadays with moderation because it is known to easily generate resistance particularly by mutations. Therefore, because this antibiotic is a synthetic antibiotic, resistance levels could reflect an anthropic contamination. In this study, the resistance of the cultivable communities to ofloxacin is low suggesting a low level of anthropic contamination in spite of an increase during flood event in some sites.

Another objective of this study was to assess the relevance of antimicrobial resistant bacterial community monitoring to better understand the karst functioning. Storm events can cause short-term microbial contamination at karst springs that can be detected by *in-situ* classic monitoring of physico-chemical parameters. For example, spring water shows in general higher level of mineralization (higher electrical conductivity) reflecting the contribution of water from a deeper compartment (Bicalho et al., 2012). Geochemical tracers are generally used to determine water origin and residence time. They allow discrimination between water from the spring whose high level of mineralization reflects the contribution of water from a deeper compartment and the waters from the boreholes that show geochemical features typical of a karst system (carbonates, Ca...).

Moreover, we use SF₆ dissolved gas as a proxy of mean residence time, to estimate the proportion of recent and older water (data not shown). Water sampled during low flow condition in P5 (capacitive part of the aquifer) is quite old, reflecting a slow circulation of water. On the contrary during flood event, P5 exhibits water with high flow velocity (recent water), as well as P20, reflecting a rapid circulation of water, possibly through infiltration from the surface and/or from swallow hole. In this study, the level of resistance seems to be linked to the flow speed: high resistance level was associated to speed flow (high proportion of recent water). Further analyses are required to determine the taxonomic composition of these resistant bacterial communities and particularly of communities sampled during the flood event for which increased resistance level was observed for nearly all the antibiotics tested. Moreover, investigations of the resistome are necessary to identify and quantify resistance genes; in particular emerging genes that are of great concern for human health, like carbapenemases (Guerra et al., 2014). The lowest levels of antimicrobial resistance were mostly observed at the spring, which is used as drinking water for the Montpellierian inhabitants. It has been previously described that drinking water coming from karstic system can bear some antimicrobial resistant potential pathogens like *E.coli* or *P. aeruginosa* (Flores Ribeiro et al., 2014). Resistome and research of pathogenic bacteria has to be explored more specifically during flood event.

However, a long-term monitoring of antimicrobial resistance of bacterial communities should be interesting to assess and to quantify the general water quality, allowing to the detection of changes in the ecosystem functioning. In conclusion, antimicrobial resistance level of the bacterial community could be a complementary pertinent parameter. As aquifers must actually be considered as complex ecosystems harboring indigenous biocenoses (Danielopol et al., 2003), the microbiological status of groundwater should not only examine the presence of pathogenic, i.e. fecal microorganisms, but should also address the issue of naturally occurring microorganisms.

In conclusion, this original and multidisciplinary study allows:

- (1) The evaluation of the spatio-temporal dynamics of bacterial community structure in a Mediterranean karstic aquifer.
- (2) To show that Mediterranean karst is a potential reservoir for antimicrobial resistance, with spatio temporal fluctuations of the level of antimicrobial resistance (particularly depending on the hydrological cycle).
- (3) The establishment of relations between resistance level and hydrogeological functioning.

Colloque Effervescence : environnements et résidus de médicaments
Enjeux présents et futurs : quelles réponses
Montpellier, 21-22 novembre 2014

**Approche pluridisciplinaire originale d'exploration de l'aquifère karstique du Lez :
compartmentation hydrodynamique et résistance des communautés bactériennes
aux antibiotiques**

P. Licznar-Fajardo, M. Héry, A. Masnou, V. de Montety, V. Leonardi, J.-L. Seidel, C. Batiot-Guilhe, M. Hardy, C. Roure, A. Almakki, H. Jourde, E. Jumas-Bilak

Les aquifères karstiques sont reconnus pour leur forte hétérogénéité spatiale : compartiments transmissifs (drains karstiques) responsables de transfert rapide, et compartiments capacitifs (matrice fracturée) permettant le stockage de l'eau à plus long temps de séjour. Cette hétérogénéité s'accompagne de fortes variabilités hydrochimiques. Les proportions de mélange entre les eaux de ces différents compartiments peuvent varier en fonction du cycle hydrologique, de l'exploitation de ces aquifères ou d'un changement des conditions environnementales.

Par ailleurs, malgré l'importance des micro-organismes dans les écosystèmes aquatiques, les communautés microbiennes, l'influence des caractéristiques hydrochimiques des eaux sur leur structure et la capacité de l'aquifère à représenter un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques restent totalement inconnus dans les aquifères karstiques méditerranéens.

Née d'une collaboration entre microbiologistes, hydrochimistes et hydrogéologues cette étude est focalisée sur l'aquifère du Lez car cet aquifère est sollicité pour l'alimentation en eau potable de Montpellier et constitue un site expérimental pour caractériser sa vulnérabilité aux risques de pollution.

Les objectifs sont de i) décrire la structure des communautés bactériennes et leur niveau de résistance à 6 antibiotiques et ii) de compléter cette caractérisation microbiologique par la caractérisation chimique des eaux (éléments majeurs, éléments en trace, matière organique, gaz nobles, gaz dissous d'origine anthropique,...) informant sur la nature et l'origine des eaux ainsi que sur l'influence de l'activité anthropique sur leur qualité.

Les prélèvements ont été réalisés dans des secteurs de l'aquifère représentatifs des zones capacitatives et transmissives. Afin d'appréhender l'influence des vitesses de circulation dans le système, les prélèvements ont été programmés à des périodes de hautes et basses eaux et lors d'un pic de crue.

Une première campagne de prélèvements et d'analyses a permis d'évaluer le pouvoir discriminant d'une caractérisation chimique et d'une caractérisation de la structure des communautés bactériennes pour la comparaison des eaux. Les deux approches, qui permettent de différencier l'eau de la source du Lez de l'eau de forages, apparaissent complémentaires. La caractérisation des communautés microbiennes permet de discriminer des eaux de forages présentant des caractéristiques hydrogéologiques contrastées malgré leur proximité géographique et leurs compositions chimiques similaires. La détermination des CMI de communautés permet d'évaluer le niveau de résistance bactérienne selon l'origine des eaux. Enfin, les empreintes génétiques permettent d'évaluer la structure des communautés résistantes.

Ces premiers résultats prometteurs montrent que la structure hydrogéologique et donc les vitesses de circulation de l'eau peuvent avoir un impact sur la structure et le niveau de résistance des communautés bactériennes.

Approche pluridisciplinaire originale d'exploration de l'aquifère karstique du Lez : compartimentation hydrodynamique et résistance des communautés bactériennes aux antibiotiques

P. Licznar-Fajardo¹, M. Héry², A. Masnou¹, V. de Montety², V. Leonardi², J.-L. Seidel², C. Batiot-Guilhe², M. Hardy², C. Roure¹, A. Almakki¹, H. Jourde², E. Jumas-Bilak¹

¹ UMR 5119 Ecosym, Equipe Pathogènes et Environnements, Université Montpellier 1, Faculté de Pharmacie, 15, Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5, France
² UMR 5569 Laboratoire HydroSciences, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon CCMSE, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Contexte de l'étude

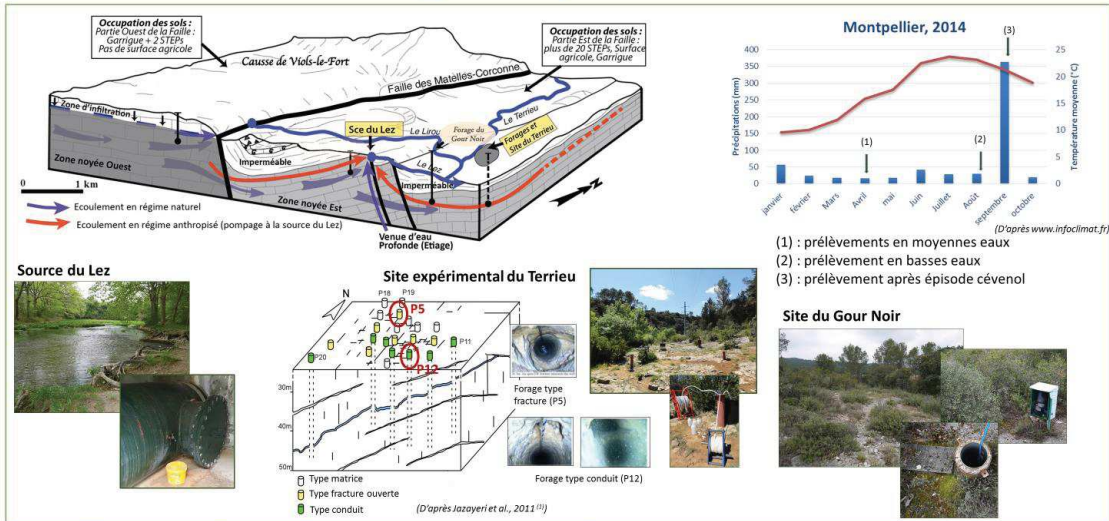
- Aquifères karstiques : forte hétérogénéité des écoulements et des propriétés physico-chimiques des eaux souterraines, compartiments transmissifs (drains, transferts rapides) et capacitifs (matrice fracturée, stockage d'eau).
 - Etude pluridisciplinaire regroupant microbiologistes, hydrochimistes, et hydrogéologues pour répondre aux questions suivantes :
 - Les aquifères karstiques méditerranéens sont-ils des réservoirs de bactéries résistantes aux antibiotiques ?
 - Quelle est l'influence des caractéristiques hydrochimiques et hydrodynamiques du karst sur la structure des communautés bactériennes ?
- Application à l'aquifère du Lez, principale ressource pour l'alimentation en eau potable de l'agglomération de Montpellier, bénéficiant de sites expérimentaux pertinents dans le cadre de l'observatoire MEDCYSS de l'OSU OREME, notamment pour caractériser la vulnérabilité de la ressource en eau souterraine aux risques de pollutions anthropiques.

Objectifs

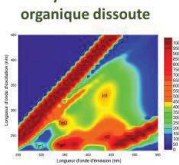
Décrire la structure des communautés bactériennes et leur niveau de résistance à 6 antibiotiques dans différents compartiments contrastés de l'aquifère karstique et comparer les informations acquises (origine des eaux, éventuelle contamination d'origine anthropique) par la caractérisation microbiologique et la caractérisation hydrochimique.

Amélioration des connaissances sur la dynamique des communautés bactériennes au sein des différents compartiments du karst, et identification d'éventuels réservoirs de bactéries résistantes.

Approche expérimentale



Analyse de la matière organique dissoute



Mesures in situ (température, pH, conductivité, O₂)

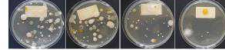


Analyse des ions majeurs, des éléments traces, des gaz dissous (gaz nobles, CFC, SF₆)

Etude des communautés bactériennes cultivables

Évaluation du niveau de résistance des communautés à différents antibiotiques

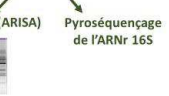
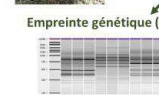
Détermination des c-MI50, 70 et 90 : concentrations minimales inhibant 50, 70 et 90% des communautés



Structure des communautés totales et résistantes (TTGE)



Etude des communautés bactériennes «totales»

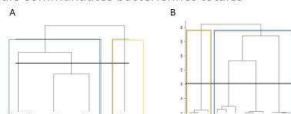


Conclusion

L'hétérogénéité des écoulements et des propriétés physico-chimiques des eaux souterraines associées aux différents compartiments du karst impacte à la fois la structure et le niveau de résistance des communautés bactériennes.

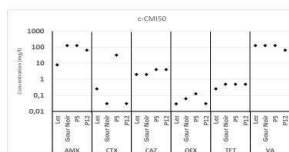
Premiers résultats issus de la première campagne (moyennes eaux)

Discrimination des eaux de l'aquifère du Lez selon : (A) leur composition chimique et (B) la structure de leurs communautés bactériennes totales



(Clustering issu d'une Analyse en Composante Principale, logiciel R, package Rcmdr).

Mise en évidence de différents niveaux d'antibiorésistance dans les compartiments de l'aquifère



Références :
⁽¹⁾ Jazayeri M., Jourde H., Massonnet S. (2011) Influence of the observation scale on permeability estimation at local and regional scales through well tests in a fractured and karstic aquifer (Lez aquifer, Southern France). *Journal of Hydrology*, 403, 321-336
⁽²⁾ Durpalé X., Optimisation de la fluorescence naturelle de la MGD dans les aquifères karstiques, M2 Eau, HSE, UM2, 2014

Exploration des communautés bactériennes résistantes aux antibiotiques dans des environnements aquatiques de la région de Montpellier

A. Almakki, C. Roure, A. Masnou, K. Esteves, T. Mosser, M. Hery, E. Jumas-Bilak, P. Licznar-Fajardo

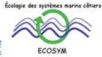
Les écosystèmes aquatiques soumis à des pressions anthropiques sont des systèmes intégrateurs générant un résistome riche et dynamique. Le résistome est le plus souvent étudié en conditions de fortes pressions de sélection (sols agricoles ou environnement hospitalier) mais rarement dans les eaux non soumises à des pressions qualifiées. Pourtant, la connaissance des communautés microbiennes résistantes des écosystèmes naturels proches de l'homme permettrait d'argumenter le rôle de l'antibiorésistance environnementale dans l'émergence infectieuse.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le niveau de résistance et la biodiversité résistante des communautés bactériennes dans des écosystèmes contrastés de la région de Montpellier. Ce territoire présente une interface rapprochée entre les niches urbaines incluant un hôpital de 2700 lits et les eaux naturelles continentales et côtières.

Les échantillons d'eau proviennent de la zone souterraine karstique, du Lez (fleuve côtier en zone urbaine), de l'étang de Mauguio (zone lagunaire côtière) et du lac du Salagou (eau continentale en zone peu anthropisée). Ils sont analysés par i) la détermination des concentrations minimales de céfotaxime, ceftazidime ou tétracycline inhibant 50%, 70% et 90% de la communauté cultivable totale (c-CMI50, c-CMI70 et c-CMI90) et ii) la description du microbiote cultivable résistant par analyse du gène de l'ARNr 16S (PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis).

Les niveaux de résistance aux céphalosporines testées sont différents selon l'origine des eaux (c-CMI90 comprises entre 0,5 et 128mg/l pour le céfotaxime, entre 4 et 128mg/l pour la ceftazidime). Au contraire, les communautés sont sensibles à la tétracycline (c-CMI90 inférieures à 4mg/l). Les empreintes génétiques obtenues par TTGE montrent la sélection d'une communauté résistante et explorent sa biodiversité.

La détermination des CMI de communauté a permis d'évaluer le niveau de résistance des communautés bactériennes aux antibiotiques dans des environnements naturels. Le risque potentiel de la résistance bactérienne environnementale en santé humaine pourra être évalué en comparant aux données régionales d'épidémiologie de la résistance et en évaluant les possibilités de transfert des gènes de résistance.



Exploration des communautés bactériennes résistantes aux antibiotiques dans des environnements aquatiques de la région de Montpellier

A. Almkaki¹, C. Roure¹, A. Masnou¹, K. Esteves¹, T. Mosser¹, M. Hery², E. Jumas-Bilak¹⁻³, P. Licznar-Fajardo¹

¹Université Montpellier 1 CNRS, UMR5119 ECOASYM, ²UMR Hydrosciences de Montpellier, ³Département d'hygiène hospitalière, CHRU de Montpellier, Montpellier, France

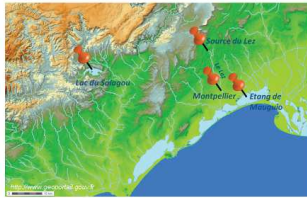
Introduction et objectifs

Les écosystèmes aquatiques naturels soumis à des pressions anthropiques sont des systèmes intégrateurs générant un résistome riche et dynamique⁽¹⁾. Le résistome est le plus souvent étudié en conditions de fortes pressions de sélection (sols agricoles ou environnement hospitalier) mais rarement dans les eaux non soumises à des pressions qualifiées. Pourtant, la connaissance des communautés microbiennes résistantes des écosystèmes naturels proches de l'homme permettrait d'argumenter le rôle de l'antibiorésistance environnementale dans l'émergence infectieuse⁽²⁾.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le niveau de résistance et la diversité des communautés bactériennes résistantes dans des eaux de la région de Montpellier présentant des caractéristiques contrastées : souterraines ou de surface, douces ou saumâtres, plus ou moins impactées par les activités humaines. Ce territoire présente une interface rapprochée entre les niches urbaines incluant un hôpital de 2700 lits et les eaux naturelles continentales et côtières.

Méthodes

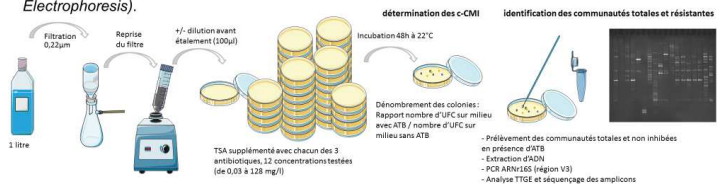
Les échantillons d'eau sont prélevés à la source du Lez (eau souterraine karstique au Nord de Montpellier), dans le Lez en zone urbaine (fleuve côtier), dans l'étang de Mauguio (zone lagunaire côtière) et dans le lac du Salagou (eau continentale en zone peu anthropisée).



Pour chaque échantillon d'eau :

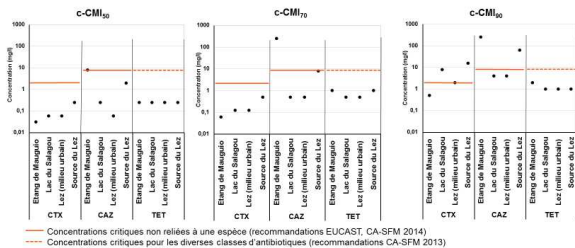
i) la résistance des communautés bactériennes à 3 antibiotiques (ATB) a été évaluée par détermination des c-CMI (c-CMI₅₀, c-CMI₇₀ et c-CMI₉₀) : concentrations minimales de céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) ou tétracycline (TET) qui inhibent 50%, 70% et 90% de la communauté cultivable totale.

ii) la diversité de la communauté bactérienne cultivable totale et résistante est évaluée par analyse de la région variable V3 de l'ARNr 16S par PCR-TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis).



Résultats

Exemple de communautés cultivables (source du Lez) en présence de concentrations croissantes en ceftazidime (0, 125 mg/l, 1 mg/l, 16 mg/l et 128 mg/l)



CTX : quel que soit le site de prélèvement : c-CMI₇₀ < seuil critique clinique (2mg/l)
Pour les prélèvements du lac du Salagou et de la source du Lez : c-CMI₉₀ > seuil critique 10% de ces communautés est constitué d'espèces résistantes.

CAZ : des concentrations d'ATB > seuil critique clinique (8mg/l) sont nécessaires pour inhiber respectivement plus de 70% et 90% des communautés de l'étang de Mauguio et de la source du Lez alors que les c-CMI₉₀ des communautés du Lac (milieu urbain) et du lac du Salagou sont < seuil critique clinique.

TET : les communautés sont globalement sensibles à la TET : c-CMI₉₀ < à 4mg/l (seuil critique clinique = 8mg/l).

	Lac du Salagou	Etang de Mauguio	Lez (milieu urbain)	Source du Lez
<i>Acinetobacter</i>	+	+	+	+
<i>Aeromonas</i>	+	+	+	+
<i>Citrobacter</i>	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	+
<i>Marinobacter</i>	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	+
<i>Rheinheimera</i>	+	+	+	+
<i>Vibrio</i>	+	+	+	+
<i>Aerococcus</i>	+	+	+	+
<i>Bacillus</i>	+	+	+	+
<i>Exiguobacterium</i>	+	+	+	+
<i>Lysinibacillus</i>	+	+	+	+
<i>Marinibacillus</i>	+	+	+	+
<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	+
<i>Paenisporencina</i>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+
<i>Virgibacillus</i>	+	+	+	+
<i>Agrobacterium</i>	+	+	+	+
<i>Brevundimonas</i>	+	+	+	+
<i>Cellulophaga</i>	+	+	+	+
<i>Chryseobacterium</i>	+	+	+	+
<i>Flavobacterium</i>	+	+	+	+
<i>Isobacter</i>	+	+	+	+
<i>Janthinobacterium</i>	+	+	+	+
<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+
<i>Microbacterium</i>	+	+	+	+
<i>Pedobacter</i>	+	+	+	+
<i>Uruburulla</i>	+	+	+	+
<i>Arcobacter</i>	+	+	+	+

Les communautés bactériennes totales et résistantes (concentration d'ATB ≥ c-CMI₉₀) ont été analysées par TTGE :

- : genres présents dans la communauté cultivable totale
- : genres sélectionnés par TET : 11 genres, principalement des classes *γ-proteobacteria*, *bacilli* et *flavobacteria*.
- : genres sélectionnés par CAZ : large distribution de cette résistance dans l'eau du Lez en milieu urbain (6 genres résistants CAZ contre seulement 2 ou 3 genres résistants pour les autres sites de prélèvement).
- : genres sélectionnés par CTX : distribués dans 9 genres, 5 classes.

Conclusions

Alors que peu de données sont disponibles sur les communautés microbiennes et les résistomes des écosystèmes naturels proches de l'homme, cette étude a permis une première exploration du niveau de résistance aux ATB de communautés bactériennes hydriques dans des environnements naturels de la région montpelliéraine, avec notamment la mise en évidence de niveaux de résistances aux céphalosporines différents selon les communautés bactériennes, *i. e.* selon l'origine des eaux. La détermination de l'antibiorésistance au niveau des communautés et l'étude de la composition des communautés totales et résistantes sera poursuivie lors de campagnes de prélèvements programmées (étude temporelle). Le lien entre la résistance bactérienne environnementale et l'épidémiologie de la résistance chez l'homme pourra être évalué en confrontant ces résultats aux données d'épidémiologie régionales de la résistance.

⁽¹⁾ Baquero et al. *Curr Opin Biotechnol.* 2008 ; ⁽²⁾ Vaz-Moreira et al. *FEMS Microbiol Rev.* 2014

Investigation of culturable antibiotic resistant bacterial communities in a Mediterranean karstic hydrosystem

A. Almakki, C. Roure, M. Héry, F. Aujoulat, E. Jumas-Bilak, P. Fajardo-Licznar

Waters play a crucial role in interconnecting different ecosystems like humans, animals, soils and hydrosystems, contributing to the circulation of antibiotic-resistant bacteria. Karstic hydrosystems are commonly known to be vulnerable to anthropogenic contaminations due to direct connections between surface water and groundwater and to be heterogeneous due to the contrast between waters stored in some compartments (with long residence time) and waters with fast transit. Considered as integrator ecosystems, natural waters are of great interest to survey the antibiotic resistance in the environment, which is relevant to human health. Among natural hydrosystems, karstic aquifers are poorly investigated for emergence and dissemination of antibioresistance. The question of their role as reservoir for antimicrobial resistance according their hydrogeological characteristics remains open.

The Lez karst hydrosystem supplies drinking water to the metropolitan region of Montpellier, in southern France. The aim of this study is to evaluate the resistance level and the biodiversity of bacterial communities in the Lez aquifers in contrasted hydrogeological conditions and seasonality.

For this purpose, we develop an original mixed method associating i) selective culture, using culture media containing tetracycline, vancomycin, ofloxacin, amoxicillin, cefotaxime or ceftazidime at increasing concentrations, and ii) molecular approaches, implementing 16S rRNA gene PCR-Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) and sequencing.

Minimal antibiotic concentrations inhibiting 50%, 70% and 90% of the whole culturable community were determined.

Resistance to beta-lactams were clearly fluctuant between both compartments and periods of sampling, whereas differences obtained with the others antibiotics were not so marked. Then, the taxonomic diversity and the dynamics of the resistant sub-communities were described.

These results show that hydrogeological conditions and thus the speed of water circulation in the karst aquifer can impact the resistance of bacterial communities. Then, the potential risk of bacterial resistance will be discussed in term of resistance transferability and relevance in clinical epidemiology.



Investigation of culturable antibiotic resistant bacterial communities in a Mediterranean karstic hydrosystem



A. Almakki¹, F. Aujoulat¹, H. Jean-Pierre^{1,2}, A. Masnou¹, E. Jumas-Bilak^{1,3}, P. Licznar-Fajardo¹

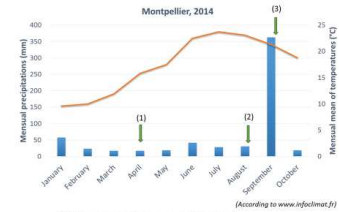
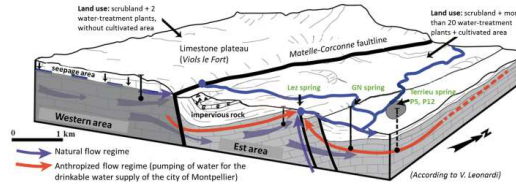
¹UMR 5569 Hydrosciences, Equipe "Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements", UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 av. Charles Flahault, 34095 Montpellier, France; ²Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHRU Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 Av. du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France; ³Département d'Hygiène Hospitalière, CHRU Montpellier, Hôpital St. Eloi, 80 Av. Augustin Fliche, 34090 Montpellier, France;

Waters play a crucial role in interconnecting different ecosystems like humans, animals, soils and hydrosystems, contributing to the circulation of antibiotic-resistant bacteria. Karstic hydrosystems are commonly known to be vulnerable to anthropogenic contaminations due to direct connections between surface water and groundwater. Karst is also heterogeneous due to the contrast between waters stored in some compartments with long residence time and waters with fast transit. Considered as integrator ecosystems, natural waters are of great interest to survey the antibiotic (ATB) resistance in the environment, which is relevant to human health. Among natural hydrosystems, karstic aquifers are poorly investigated for emergence and dissemination of antibiotic-resistance. The question of their role as reservoir for antimicrobial resistance according their hydrogeological characteristics remains open.

Study area, water sampling and methods

The Lez karst hydrosystem, in southern France is studied through 4 sampling sites corresponding to contrasted hydrogeological conditions and anthropization:

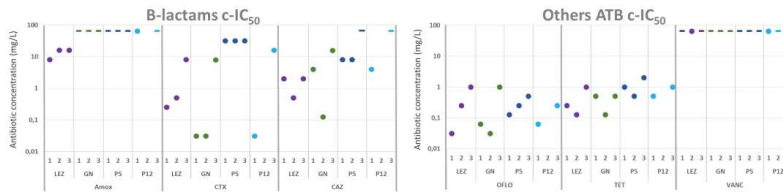
- Lez spring, which supplies drinking water to the metropolitan region of Montpellier city
- Gour Noir (GN) spring, not particularly exposed to anthropic pollution
- Terrieu spring, exposed to anthropic activities, with rapid flow (P12 well) and slow flow (P5 well)



- Water samples are collected:
- during the spring (1),
 - during the dry summer conditions (2),
 - and after local autumnal heavy rains (3).

To evaluate the resistance level and its dynamics, and the biodiversity of total and resistant bacterial communities, we develop an original mixed method associating i) selective culture conditions, using culture media containing tetracycline (TET), vancomycin (VANC), ofloxacin (OFLO), amoxicillin (Amox), cefotaxime (CTX) or ceftazidime (CAZ) at increasing concentrations (from 0.0312 mg/L to 64 or 128 mg/L), and ii) molecular approaches, using 16S rRNA gene PCR-Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) and sequencing.

Determination of the concentration of antibiotic inhibiting 50% of the cultivable community



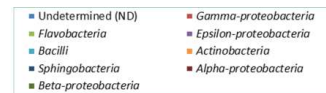
Here we present the antibiotics c-IC₅₀ concentrations inhibiting 50% of the whole culturable community for the sampling periods 1 to 3.

Resistance to beta-lactams, particularly to 3rd generation cephalosporins (CAZ and CTX) varied according both the geological site and the period of sampling. Variation of resistance observed with the others antibiotics were not so marked.

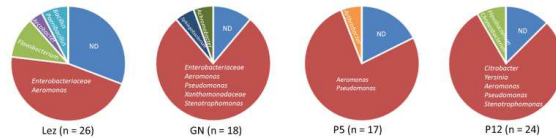
Dashes indicate that for some samples, the c-IC₅₀ cannot be determined, because it is over 64 mg/L, showing that some culturable bacterial communities are majority composed with resistant bacteria. These results show that conditions such as the season and the speed of water circulation in the karst aquifer influence the level of resistance in the cultivable bacterial communities. The impact of the level of anthropization on the community resistance is lower.

Taxonomic Diversity in total and antibiotic-tolerant bacterial communities

Results presented here are obtained with waters sampled during the spring period. TTGE migration produces a banding pattern; n, the number of TTGE bands by pattern represents the overall cultivable bacterial diversity. The bacterial diversity is presented to the genus level. The genera are gathered according their high-level taxa affiliation.

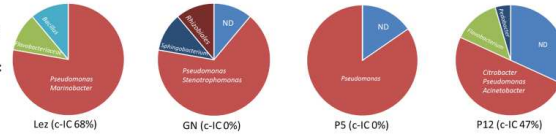


Taxonomic diversity of waters from different karstic compartments:



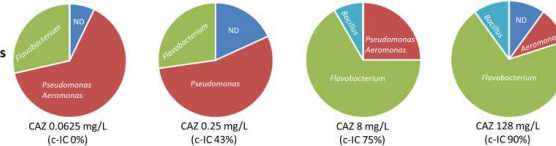
Gamma-proteobacteria are mostly represented by potentially human pathogens. Their relative proportion and diversity vary according the site of sampling but appear not clearly linked to the level of anthropization.

In vitro effect of low ATB concentrations on community composition: example of ofloxacin 0.0312 mg/L



We observed a clear impact of low ofloxacin concentration on the relative proportion of genera and high-level taxa as well as on the genus diversity within each high-level taxon.

In vitro effect of increasing concentrations of ATB on water community: example of CAZ on P12 water



The increase of CAZ concentration changes the community composition. Flavobacteria are clearly selected by high concentrations while Pseudomonas population decreases. For the potentially human pathogen Aeromonas, the dynamics observed suggests the co-existence of two populations with different behavior against ATB.

Conclusion and perspectives: The original approach presented herein allows to assess the resistant bacterial community in natural waters. A single experiment allows c-IC determination and raw community barcoding. It appears efficient to follow-up the dynamics of resistant communities according sites, seasons and ATB concentrations. Based on culture, the method avoid the non-cultivable community but resistance to ATB is a phenotypic trait generally assessed by culture in medicine. Therefore, the approach should provide data able to be compared with resistance epidemiology in human populations.

**From water resistome to human pathobiome:
a new look on water-related infectious diseases**

Ayad Almakki, Christlène Laurens, Hélène Jean-Pierre, Marina Héry, Estelle Jumas-Bilak, Patricia Licznar-Fajardo

A consequence of the intensive and inadequate usage of antibiotics and biocides is the emergence and diffusion of multi-drug resistant bacteria. In this alarming context of loss of antibiotics efficacy, diffusion of resistant genes in bacterial communities is a critical point. The resistome is a metagenomic fraction (D'Costa *et al.*, 2006) that contains genes involved in microbial resistance and its diffusion. Owing to the new concept of pathobiome, pathogens should no longer be considered as individual virulent and/or resistant microbial species but as complex and dynamic communities able to provoke infection or microbiote disequilibrium in host. Resistomes and pathobiomes are particularly interlinked when we consider the emergence infections caused by antibio-resistant pathogens, currently a worldwide major threat to public health.

Aquatic ecosystems are privileged environments for microbial interactions. Indeed, water is a matrix that ensures a continuum among hydrogeological (underground and superficial systems), technological (domestic, hospital, industrial and waste waters) and living compartments (vital resource for all living beings). Some watered ecosystems can act as passive reservoirs and others, submitted to particular biotic or abiotic constraints, can be considered as amplifiers/reactors where bacterial communities could evolve toward pathobiome.

We present herein the more noticeable results of two independent studies that underlined the role of water bacterial communities in the emergence of host infections at both individual and epidemiological scales. A first study demonstrates the replacement of the microbiota of one patient by an environmental microbial community that finally led to a systemic infection. In the second study, resistome in a karstic water reservoir and related urban rivers showed the role of local constraints on resistome design and its potential links with human pathobiome.

The adequacy of the pathobiome concept is discussed in the context of advances in water-related infectious diseases and in their control.

D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome, Science, 2006 Jan 20;311(5759):374-7.

Keywords: resistome, aquatic ecosystems, human infectious diseases

From water resistome to human pathobiome: a new look on water-related infectious diseases

Almakki A.¹, Laurens C.^{1,2}, Jean-Pierre H.^{1,2}, Héry M.³, Jumas-Bilak E.^{1,4}, Licznar-Fajardo P.¹

¹UMR 5569 Laboratoire HSM, Equipe Pathogènes Hydriques Santé Environnements, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 Av Ch. Flahault 34095 Montpellier, France

²Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHRU Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 Av du Doyen Gaston Giraud 34295 Montpellier Cedex 5, France

³UMR 5569 Laboratoire HSM, Equipe Pollutions minières Environnement et Santé, Place Eugène Bataillon, CCMSE, 34095 Montpellier Cedex 5, France

⁴Laboratoire d'hygiène hospitalière, CHRU Montpellier, 80 Av Augustin Fliche 34090 Montpellier, France

Water-related infectious diseases remain a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Aquatic ecosystems are favourable environments for microbial interactions. Indeed, water is a matrix that ensures a continuum among hydrogeological (underground and superficial systems), technological (domestic, hospital, industrial and waste waters) and living compartments (vital resource for all living beings). Aquatic ecosystems submitted to biotic and abiotic constraints, can be considered as amplifiers/reactors in which microbial communities could evolve towards pathobiome and therefore could participate to human infectious diseases.



Clinical case in a near-drowning patient

- Respiratory tract colonized with *Aeromonas veronii* and *Pseudomonas fluorescens* group
- Bacteremia due to *Enterobacter asburiae*
- The 3 bacteria display resistance to carbapenems including *Enterobacter asburiae* producing the IMI-2 carbapénémase.

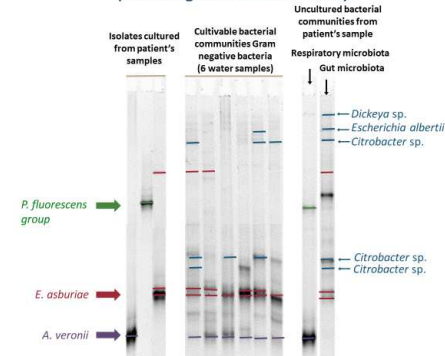
Environmental investigations

To elucidate the relation between environmental bacterial community and human infection and/or human microbiote, water samples were collected from the river at the site of patient's near-drowning.



To compare the patient's respiratory and digestive microbiota with aquatic cultivable bacterial communities, we used 16S rRNA gene-based PCR-TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) fingerprint.

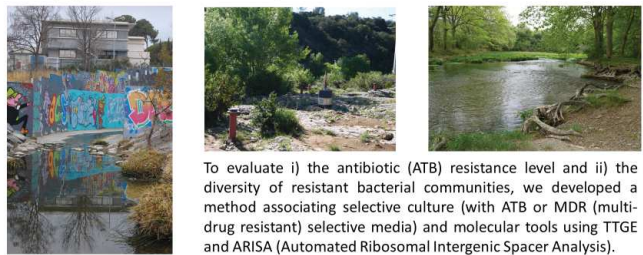
Transmission of bacteria from environmental reservoir (16 rRNA gene-based PCR-TTGE)



=> the river bacterial community partially replaced the respiratory and gut microbiota;
=> the more prevalent bacteria in the patient's pathological microbiota were mild opportunistic human pathogens displaying resistance to carbapenems including *Enterobacter asburiae*, *Aeromonas veronii* and *Pseudomonas fluorescens*;
=> the partial replacement of the gut microbiota by an environmental microbial community led to the bacteremia. Indeed, *E. asburiae* isolated from patient's blood and from river samples had the same PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) pattern.

Inventories of antibiotic resistant bacterial communities in natural waters in Montpellier region

Water samples were collected under contrasted hydrogeological conditions and anthropogenic influence : karstic waters, related urban waters.

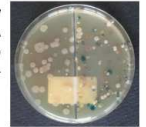


To evaluate i) the antibiotic (ATB) resistance level and ii) the diversity of resistant bacterial communities, we developed a method associating selective culture (with ATB or MDR (multi-drug resistant) selective media) and molecular tools using TTGE and ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).

Taxonomic diversity in antibiotic-resistant bacterial communities

With culture methods, we observed:

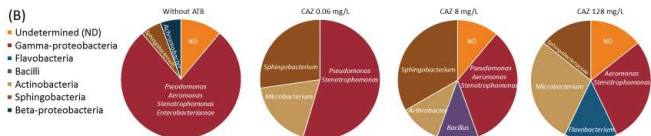
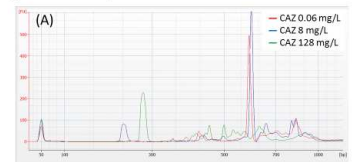
- that resistance level to antibiotics (Amoxicilline, Cefazidime (CAZ) and Cefotaxime) varies according to both the hydrogeological conditions and the sampling period.
- that we can select bacterial communities i) in the conditions classically used in clinical context to isolate MDR bacteria and ii) growing on CARBA SMART (Biomerieux) media that is a chromogenic media used to specifically isolate carbapenemases-producing and metallo-beta-lactamases-producing bacteria.



With molecular methods, we showed:

- a clear impact of low ATB concentrations (0.03 mg/L) on the bacterial community taxonomic composition;
- that in presence of high ATB concentrations, potentially human pathogens like *Aeromonas* sp. can be selected because of their phenotypic resistance;
- that high ATB concentrations select populations not detected without ATB or with lower concentrations.

ARISA (A) and TTGE (B) results of water sampled from a poorly anthropized site, during spring:



Water-related infectious diseases involving recognized pathogens remain a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Moreover, the spectrum of these diseases is expanding towards emerging infectious diseases, opportunistic infections and antimicrobial resistance. We showed how environmental and clinical resistant communities are interlinked and, through a clinical situation, how environmental resistome can modify patient's microbiota and provoke a human infection with a resistant emerging pathogen. This observations fit with the pathobiome concept⁽¹⁾.

The follow-up of communities and the determination of the level of antimicrobial resistance in anthropized environments is a first step for further characterization of these pathobiomes.

It is important to take into consideration :

- how diversity and dynamics of water microbial communities are linked with hydrogeology and with human practices.
- the role of aquatic bacterial communities in the emergence of host infections at both epidemiological and individual scales
- the role of local constraints on resistome design.

(1) Vaysier-Tausat et al., Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics, Front Cell Infect Microbiol. 2014 Mar 5;4:29.



C- Discussion générale – Conclusion

Notre étude montre l'importance et la variabilité du réservoir de résistance aux antibiotiques dans les eaux naturelles urbaines dans une ville de pays développé non soumise à des pressions industrielles ou agricoles majeures. Les résistances relativement faibles aux fluoroquinolones et aux tétracyclines que nous avons observées en attestent. C'est certainement l'importante résistance aux β -lactamines, et en particulier aux céphalosporines de troisième génération et aux carbapénèmes, qui est le résultat majeur de ce travail. La détection d'*E. coli* producteurs de carbapénémase est particulièrement inquiétante car cette bactérie est classée parmi les bactéries hautement résistantes émergentes qui font l'objet d'une surveillance rapprochée par les autorités de santé. La plupart des études sur l'antibiorésistance environnementale se concentrent sur les tétracyclines et les sulfamides ainsi que sur les gènes de résistance associés. Les β -lactamines ne persistent pas dans l'environnement et se dégradent en de nombreux sous-produits difficiles à doser. De ce fait, la résistance aux β -lactamines dans l'environnement est moins étudiée alors qu'elle représente actuellement le principal problème de santé publique. Notre étude participe à la description des réservoirs environnementaux de cette résistance.

Cette étude a précisé des périodes et des sites associés à une plus haute fréquence de résistance et de contamination bactérienne. Une attention particulière devra être portée sur ces conditions pour le contrôle des risques associés. Des pics de contamination microbienne et de résistance sont observés après les épisodes pluvieux et les débordements que ce soit dans les eaux karstiques ou dans les eaux urbaines. Ces pics sont déjà décrits et peuvent être liés à des échanges entre les effluents et les eaux de ruissellement. Les prévisions liées au réchauffement climatique vont dans le sens d'une augmentation de la fréquence et de l'intensité des épisodes climatiques extrêmes. Des études d'exposition aux bactéries multirésistantes et émergentes lors de ces épisodes sont nécessaires afin d'inclure le risque d'exposition aux bactéries résistantes dans le risque infectieux d'origine hydrique classiquement évalué lors des événements climatiques par la quantification de la contamination fécale. En effet, dans les pays développés à haut niveau d'hygiène publique, le risque infectieux bactérien est lié à la résistance aux antibiotiques mais pas (ou plus) aux pathogènes du cycle oro-fécal. Une démarche de type "human health risk assessment" permettrait d'estimer la nature et la probabilité d'une altération de la santé des sujets vivant dans ou à proximité d'un environnement contaminé par des bactéries résistantes et par des gènes de résistance.

Au-delà des conditions climatiques, nous avons montré que la résistance d'une communauté microbienne pouvait être influencée par l'hydrogéologie. Les communautés bactériennes des sources karstiques au nord de Montpellier sont influencées par le caractère capacitif ou transmissif de l'aquifère karstique. Ainsi, les aquifères capacitifs sont colonisés par des bactéries significativement plus résistantes que les aquifères transmissifs ou les sources. La confirmation de ces résultats est nécessaire dans d'autres sites mais pourrait conduire à argumenter les choix de site de forage pour limiter l'exposition des populations à ces communautés résistantes.

Plusieurs résultats de ce travail vont dans le sens d'une influence de l'hôpital sur la contamination microbiologique de l'eau avec en particulier la détection de pathogènes humains résistants spécifiquement détectés en aval de l'hôpital. Les hôpitaux sont bien connus en tant que forts contributeurs à la résistance aux antibiotiques à partir de trois réservoirs principaux: i) les bactéries infectant ou colonisant les patients; ii) l'environnement autour des patients à l'intérieur des services, en particulier l'eau, la plomberie et la robinetterie; iii) les effluents hospitaliers. La circulation des bactéries résistantes ou de leurs gènes entre patients, directement, par les soignants ou par l'environnement est à l'origine des infections associées aux soins qui conduisent à la plus forte morbi-mortalité d'origine bactérienne en France et dans les pays développés. L'hôpital n'est pas un système clos et par ces effluents en particulier, il peut introduire de nombreuses bactéries multirésistantes, des gènes de résistance et des agents antimicrobiens dans l'environnement extérieur. L'impact environnemental des effluents hospitaliers est très étudié (Alam et al., 2013; Moges et al., 2014) mais l'impact direct d'un hôpital sur son voisinage est moins argumenté. En dehors des épisodes climatiques violents et en excluant toute anomalie d'adduction, les effluents de l'hôpital de Montpellier ne peuvent pas contaminer les cours d'eau alentours car ils sont dirigés vers une station d'épuration située à plusieurs kilomètres de là. La question du rôle du ruissellement se pose donc. Dans la revue de littérature sur les ruissellements urbains, nous avons vu que les polluants urbains, et en particulier les métaux lourds, peuvent sélectionner des co-résistances aux antibiotiques mais notre plan d'échantillonnage avec des points témoins présentant la même influence urbaine montrent une influence supplémentaire de l'hôpital. Les données épidémiologiques du CHU de Montpellier montrent que la plupart des bactéries pathogènes et résistantes trouvées en aval de l'hôpital sont potentiellement responsables d'infection associées aux soins à l'hôpital de Montpellier. Nous n'avons à ce jour pas réalisé de typages moléculaires comparatifs entre les souches de l'environnement, ce qui aurait infirmé ou confirmé des liens

épidémiologiques. Des voies de contamination directes (hors effluents) de l'environnement à partir des patients et des soins ont été signalées par le service d'hygiène de l'hôpital de Montpellier. Certaines zones extérieures imperméables autour de l'hôpital servent de stockage temporaire pour les déchets de soins avant leur transport vers l'incinérateur. Des zones de même type sont dédiées aux lavages des containers de déchets, des véhicules et de divers matériels sans recueil des eaux de lavage. De plus, les parties en sous-sol de l'hôpital abritent des lieux de stockage d'échantillons biologiques qui peuvent subir des inondations lors d'évènements climatiques et d'accidents de réseau d'eau. Une cartographie de ces zones et activités à risque de contamination par ruissellement devrait être réalisée pour permettre la collecte d'échantillons pertinents. La présence de bactéries hautement résistantes émergentes, *E. coli bla_{NDM-5}*, n'est pas explicable par contamination via les patients de l'hôpital ou l'environnement intra-hospitalier puisque de 2013 à 2016 seuls 4 patients ont été porteur d'entérobactéries (*E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*) productrices de carbapénémases NDM mais il s'agissait de NDM1 différentes de la NDM5 détecté dans le Font d'Aurette.

Les bactéries résistantes dans les eaux urbaines de Montpellier appartiennent majoritairement aux entérobactéries, aux genres *Pseudomonas* et *Aeromonas*. Ces taxons regroupent des pathogènes opportunistes d'origine environnementale dont le cycle épidémiologique implique des échanges fréquents entre l'homme, les animaux et l'environnement hydrique. Ils sont connus pour être des plates-formes d'échange et leur forte résistance dans l'environnement souligne l'importance du réservoir environnemental dans le cycle épidémiologique des bactéries résistantes. La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement peut influencer la santé humaine par exposition directe ou par la diffusion de déterminants génétiques de la résistance par transfert horizontal vers les bactéries des microbiotes humains. Les cours d'eau de petite taille en zone urbaine, comme le Verdanson et le Font d'Aurette, sont des lieux peu fréquentés et on peut en déduire une faible exposition humaine directe. Toutefois, l'observation des alentours montre la présence d'animaux domestiques (chiens, chats) ou sauvages (rongeurs, canards, goélands, pigeons). Ces animaux peuvent conduire à la diffusion de la résistance ou être à l'origine de la contamination du site par des bactéries multirésistantes déjà décrites en portage chez certains de ces animaux (Aberkane et al., 2016). Toutefois, ces animaux fréquentant les 4 sites d'échantillonnage, ils ne sont certainement pas à l'origine de la contamination plus importante en aval de l'hôpital.

Les résultats de ce travail apparaissent donc originaux au regard de la littérature sur un sujet qui reste à ce jour peu développé. De plus, ils incitent à mettre en place des systèmes de surveillance afin d'évaluer et prévenir le risque infectieux associé. Ces résultats doivent toutefois être remis dans le contexte de la méthodologie et de la stratégie de l'étude avec leurs avantages et leurs faiblesses.

Notre approche de la résistance n'est pas basée sur la métagénomique qui est actuellement l'outil de référence pour les études de communauté et de résistome. Nous avons développé une approche mixte basée sur la culture en présence d'antibiotiques et l'identification des bactéries cultivables par des méthodes moléculaires (16S PCR TTGE) ou phénotypiques (MALDI-TOF). Cette approche ne s'intéresse qu'aux bactéries cultivables, ce qui très limitatif mais pertinent dans le cadre d'une étude sur les pathogènes opportunistes humains résistants, ces derniers étant généralement cultivables sur milieu de cultures de base. Cette stratégie conduit à la détermination de *community-Inhibitory Concentration* (c-IC) en mg/L, c'est à dire des données pouvant être comparées avec des paramètres classiquement utilisés en médecine. De même, nous avons détecté des bactéries présentant des résistances particulières comme les β -lactamases à spectre étendu (cefotaximase, ceftazidimase) et des carbapénémases en utilisant les mêmes milieux que ceux utilisés chez l'homme au CHU de Montpellier. Nous pourrions ainsi à partir des données environnementales réaliser une comparaison avec les données épidémiologiques du CHU.

En ce qui concerne la stratégie d'échantillonnage, le bassin versant du Lez et la ville de Montpellier offre un contexte favorable pour l'étude de la dynamique des communautés microbiennes hydriques. En effet, la taille du bassin versant est réduite ce qui permet de délimiter des zones de prélèvements qui se différencient par un petit nombre de variations locales. Nous avons choisi deux cours d'eau parallèles de faibles longueurs, seul un des deux, le Font d'Aurelle, est couvert par les bâtiments, rues et parkings de l'hôpital, le Verdanson qui est canalisé sous une route à distance de l'hôpital sera considéré comme témoin. Ainsi, sur la zone d'étude du Verdanson et du Font d'Aurelle, la présence de l'hôpital est la seule condition variable majeure. Les deux rivières sont très similaires du point de vue hydrologique et traversent la même zone urbaine constituée de résidences de petites tailles et de maisons indépendantes. Leur source karstique est située à environ 1 km dans deux zones résidentielles équivalentes. Les deux cours d'eau sont canalisés pour traverser, à 500 mètres l'un de l'autre, un grand axe urbain à 4 voies. Toutefois, le Verdanson traverse entre sa source et le point d'étude une zone moins anthropisée correspondant au parc municipal du Château d'Ô. Il est canalisé sur une plus faible longueur entre les points de prélèvement

amont et aval que le Font d'Aurelle. Cette différence s'ajoute à la présence de l'hôpital mais n'a pas été considérée dans l'étude. L'ajout de points de prélèvement médians aurait pu permettre d'évaluer la contribution de cette canalisation en amont immédiat de l'hôpital. Mise à part cette réserve, les deux cours d'eau fournissent un système modèle comparatif satisfaisant et assez exceptionnel pour étudier l'impact d'un hôpital.

Nous avons réalisé un échantillonnage manuel ponctuel et mensuel de chaque site. L'horaire d'échantillonnage est connu pour avoir une influence sur l'abondance bactérienne et certains paramètres physicochimiques (température, pH, conductivité, oxygène dissout) (Salahuddin et al., 2014). D'autres facteurs comme la lumière peuvent avoir leur importance sur la diversité des communautés microbiennes (Hölker et al., 2015). Les prélèvements ont été réalisés le matin, un échantillonnage automatique aurait pu donner des valeurs moyennes plus représentatives de la dynamique journalière des cours d'eau.

Cette étude reste préliminaire et perfectible en termes de méthodologie mais elle est riche en enseignements et permet de proposer aujourd'hui un projet optimisé de plus grande envergure incluant 24 sites différemment impactés par des pressions urbaines (routes, hôpital, décharges, effluents, etc). L'approche culturelle sera de type "culturomique" c'est à dire une association de plusieurs types de milieu et de plusieurs agents antimicrobiens afin d'élargir les possibilités de détection des résistances. L'identification taxonomique se fera par MALDI-TOF uniquement sans le recours à la PCR-TTGE qui présente de nombreuses limites pour affilier les OTUs (taille trop faible de la séquence V3 en particulier) malgré son efficacité à partir de la masse cultivable sans isolement. A condition d'obtenir des colonies suffisamment isolées les unes des autres, le MALDI-TOF est un puissant outil d'identification des bactéries au niveau de l'espèce. Son utilisation dans ce travail de thèse a permis d'identifier 535 bactéries parmi 663 sélectionnées sur les milieux de culture pour pathogènes résistants. Cette approche est de plus peu coûteuse. Les échecs sont dus à une incomplétude des bases de données. Ces manques se combleront de mois en mois mais l'identification par MALDI-TOF ne permet pas d'affilier une bactérie inconnue à un groupe phylogénétique comme le fait le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Le futur projet étudiera aussi de nombreux contaminants chimiques, métalliques, organiques et médicamenteux non dosés ici afin de mieux argumenter les mécanismes et les facteurs associés à la résistance aux antibiotiques dans les eaux urbaines sous diverses contraintes anthropiques.

Enfin les questions principales restent ouvertes "quel risque pour l'homme exposé?" et "quelle exposition?". Une étude comparative entre les souches isolées chez l'homme et dans l'environnement n'a pas été réalisée dans ce travail mais reste possible *a posteriori* car nous

possédons toutes les données régionales d'épidémiologie de la résistance aux céphalosporines et carbapénèmes en particulier.

Conclusion

Ces travaux et les quelques publications sur la résistance aux antibiotiques dans les eaux de ruissellement en milieu urbain nous incitent à poursuivre les recherches. Face à l'urbanisation croissante, les bouleversements environnementaux et climatiques, les changements de modes de vie et l'émergence continue de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques, le rôle des eaux urbaines dans la persistance et dans la dissémination des agents antimicrobiens (et de polluants co-sélecteurs), des bactéries résistantes et des gènes de résistance doit être sans cesse réévalué. La menace que la résistance aux antibiotiques fait planer sur la santé humaine avec déjà de trop nombreux impasses thérapeutiques et à échéance 2050 la prévision catastrophique de 10 millions de morts doivent inciter à comprendre de façon intégrée les cycles épidémiologiques impliqués dans la résistance. Les eaux naturelles et anthropisées sont certainement à être mises au cœur des approches « one health » de la résistance aux antibiotiques et des maladies infectieuses.

Bibliographie

- Aberkane, S., Compain, F., Decré, D., Dupont, C., Laurens, C., Vittecoq, M., Pantel, A., Solassol, J., Carrière, C., Renaud, F., et al. (2016). High prevalence of SXT/R391-related integrative and conjugative elements carrying bla_{CMY-2} in *Proteus mirabilis* Isolates from Gulls in the South of France. *Antimicrob. Agents Chemother.* *60*, 1148–1152.
- Abulencia, C.B., Wyborski, D.L., Garcia, J.A., Podar, M., Chen, W., Chang, S.H., Chang, H.W., Watson, D., Brodie, E.L., Hazen, T.C., et al. (2006). Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 3291–3301.
- Ahammad, Z.S., Sreekrishnan, T.R., Hands, C.L., Knapp, C.W., and Graham, D.W. (2014). Increased waterborne bla_{NDM-1} resistance gene abundances associated with seasonal human pilgrimages to the upper ganges river. *Environ. Sci. Technol.* *48*, 3014–3020.
- Alam, M.Z., Aqil, F., Ahmad, I., and Ahmad, S. (2013). Incidence and transferability of antibiotic resistance in the enteric bacteria isolated from hospital wastewater. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* *44*, 799–806.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J., and Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry (Mosc.)* *53*, 1565–1574.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., and Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 251–259.
- Almakki, A., Maure, A., Pantel, A., Romano-Bertrand, S., Masnou, A., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Licznar-Fajardo, P. (2017) NDM-5-producing *Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France. *Int J Antimicrob Agents.* Apr 20. pii: S0924-8579(17)30119-X. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.003.
- Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *289*, 321–331.
- Ash, R.J., Mauck, B., and Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg. Infect. Dis.* *8*, 713–716.
- Baquero, F., Martínez, J.-L., and Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 260–265.
- Batiot-Guilhe, C., Seidel, J.L., Maréchal, J., Ladouche, B., and Prié, V. (2012). Système karstique du Lez : projet gestion multi-usages - La source du Lez : sa qualité.
- Becerra-Castro, C., Machado, R.A., Vaz-Moreira, I., and Manaia, C.M. (2015). Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Sci. Total Environ.* *530–531*, 367–372.
- Bicalho, C.C., Batiot-Guilhe, C., Seidel, J.L., Exter, S.V., and Jourde, H. (2012). Hydrodynamical changes and their consequences on groundwater hydrochemistry induced by three decades of intense exploitation in a Mediterranean Karst system. *Environ. Earth Sci.* *65*, 2311–2319.
- Blenkinsopp, S.A., and Lock, M.A. (1994). The Impact of Storm-Flow on River Biofilm Architecture1. *J. Phycol.* *30*, 807–818.

- Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L., and Quillet, L. (2012). Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS One* 7, e35647.
- Bogaerts, P., Cuzon, G., Evrard, S., Hoebeke, M., Naas, T., and Glupczynski, Y. (2016). Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum β -lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 189–193.
- Bondarczuk, K., Markowicz, A., and Piotrowska-Seget, Z. (2016). The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environ. Int.* 87, 49–55.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–951, table of contents.
- Brannen-Donnelly, K., and Engel, A.S. (2015). Bacterial diversity differences along an epigenic cave stream reveal evidence of community dynamics, succession, and stability. *Front. Microbiol.* 6, 729.
- Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211–1233.
- Call, D.R., Bakko, M.K., Krug, M.J., and Roberts, M.C. (2003). Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3290–3295.
- Cantón, R., and Morosini, M.-I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 977–991.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A.M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., and Daffonchio, D. (2004). Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6147–6156.
- Caron, W.P., and Mousa, S.A. (2010). Prevention strategies for antimicrobial resistance: a systematic review of the literature. *Infect. Drug Resist.* 3, 25–33.
- CA-SFM (2016). CA-SFM - EUCAST recommendations - Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie / European committee on antimicrobial susceptibility testing.
- Chabbert, Y.A. (1982). Sensibilité bactérienne aux antibiotiques. In *Bactériologie Médicale*, (Paris, France: Flammarion Médecine Sciences), pp. 204–212.
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 65, 232–260; second page, table of contents.
- Christensen, F.M. (1998). Pharmaceuticals in the environment--a human risk? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 28, 212–221.
- Cisar, C.R., Henderson, S.K., Askew, M.L., Risenhoover, H.G., McAndrews, C.R., Kennedy, S.D., and Paine, C.S. (2014). Antibiotic resistance in *Aeromonas* upstream and downstream of a water resource recovery facility. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* 86, 835–843.
- Clarke, J., Kelly-Quinn, M., Blacklocke, S., and Bruen, M. (2015). The effect of forest windrowing on physico-chemical water quality in Ireland. *Sci. Total Environ.* 514, 155–169.

- Colomb-Cotinat, M., Lacoste, J., Coignard, B., Vaux, S., Brun-Buisson, C., and Jarlier, V. (2015). Morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France en 2012 - Etude Burden BMR, rapport -.
- Cottrell, M.T., Waidner, L.A., Yu, L., and Kirchman, D.L. (2005). Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environ. Microbiol.* *7*, 1883–1895.
- Courvalin, P., and Philippon, A. (1989). Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. In *Bactériologie Médicale 2e Ed*, (Paris, France: Flammarion), pp. 332–335.
- Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G.(2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* *36* : 380–407
- Danielopol, D.L., Griebler, C., Gunatilaka, A., and Notenboom, J. (2003). Present state and future prospects for groundwater ecosystems. *Environ. Conserv.* *30*, 104–130.
- Debroas, D., Humbert, J.-F., Enault, F., Bronner, G., Faubladiet, M., and Cornillot, E. (2009). Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget--France). *Environ. Microbiol.* *11*, 2412–2424.
- Delcour, A.H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1794*, 808–816.
- DeLong, E.F., Preston, C.M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S.J., Frigaard, N.-U., Martinez, A., Sullivan, M.B., Edwards, R., Brito, B.R., et al. (2006). Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science* *311*, 496–503.
- Desbordes, M. (2010). Henri Pitot et l'aqueduc de Saint Clément à Montpellier. *REM Rev. Léconomie Méridionale* *58*.
- Deshmukh, R.A., Joshi, K., Bhand, S., and Roy, U. (2016). Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. *MicrobiologyOpen* *5*, 901–922.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., and Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* *38*, 3623–3630.
- Dubourg, G., Lagier, J.C., Armougom, F., Robert, C., Hamad, I., Brouqui, P., and Raoult, D. (2013). The proof of concept that culturomics can be superior to metagenomics to study atypical stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* *32*, 1099.
- Dzidic, S., and Bedeković, V. (2003). Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol. Sin.* *24*, 519–526.
- El Zowalaty, M.E., Al Thani, A.A., Webster, T.J., El Zowalaty, A.E., Schweizer, H.P., Nasrallah, G.K., Marei, H.E., and Ashour, H.M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* *10*, 1683–1706.
- Elander, R.P. (2003). Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *61*, 385–392.
- EUCAST (2016). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Clinical breakpoints - http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

- Fair, R.J., and Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Med. Chem.* 6, 25–64.
- Falkinham, J.O. (2015). Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 4533–4545.
- Farnleitner, A.H., Wilhartitz, I., Ryzinska, G., Kirschner, A.K.T., Stadler, H., Burtscher, M.M., Hornek, R., Szewzyk, U., Herndl, G., and Mach, R.L. (2005). Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environ. Microbiol.* 7, 1248–1259.
- Flores Ribeiro, A., Bodilis, J., Alonso, L., Buquet, S., Feuilleley, M., Dupont, J.-P., and Pawlak, B. (2014). Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. *Sci. Total Environ.* 490, 370–378.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., and Olsen, G.J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2461–2470.
- Gaze, W.H., Krone, S.M., Larsson, D.G.J., Li, X.-Z., Robinson, J.A., Simonet, P., Smalla, K., Timinouni, M., Topp, E., Wellington, E.M., et al. (2013). Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerg. Infect. Dis.* 19.
- Ghuysen, J.M. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 37–67.
- Gilbride, K.A., Lee, D.-Y., and Beaudette, L.A. (2006). Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J. Microbiol. Methods* 66, 1–20.
- Gillings, M.R., and Stokes, H.W. (2012). Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends Ecol. Evol.* 27, 346–352.
- Glaser, P. (2005). Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries? *MS Médecine Sci.* 21, 539–544.
- Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., and Giger, W. (2002). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Anal. Chem.* 74, 5455–5462.
- Gomi, R., Matsuda, T., Matsui, Y., and Yoneda, M. (2014). Fecal source tracking in water by next-generation sequencing technologies using host-specific *Escherichia coli* genetic markers. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9616–9623.
- Goñi-Urriza, M., Pineau, L., Capdepu, M., Roques, C., Caumette, P., and Quentin, C. (2000). Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 297–301.
- Gregory, S., Maurice, L., West, J.M., and Goody, D.C. (2014). Microbial communities in UK aquifers: current understanding and future research needs. *Q. J. Eng. Geol. Hydrogeol.* 47, 145–157.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.

- Guerra, B., Fischer, J., and Helmuth, R. (2014). An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet. Microbiol.* *171*, 290–297.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., and Andersson, D.I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* *7*, e1002158.
- Halpern, M., Landsberg, O., Raats, D., and Rosenberg, E. (2007). Culturable and VBNC *Vibrio cholerae*: interactions with chironomid egg masses and their bacterial population. *Microb. Ecol.* *53*, 285–293.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Bekal, S., Fairbrother, J.M., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., et al. (2006). A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 4200–4206.
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., and Brousseau, R. (2007). Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 477–484.
- Harnisz, M., Korzeniewska, E., Ciesielski, S., and Gołaś, I. (2015). tet genes as indicators of changes in the water environment: relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Sci. Total Environ.* *505*, 704–711.
- Hawkey, P.M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* *51 Suppl 1*, 29–35.
- HCSP (2013). Prévention de la transmission croisée de bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe).
- Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., and Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* *157*, 938–947.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C.; Chait, B.T. (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* *63* (24): 1193A–1203A.
- Hölker, F., Wurzbacher, C., Weißenborn, C., Monaghan, M.T., Holzhauer, S.I.J., and Premke, K. (2015). Microbial diversity and community respiration in freshwater sediments influenced by artificial light at night. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *370*.
- Holvoet, K., Sampers, I., Callens, B., Dewulf, J., and Uyttendaele, M. (2013). Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 6677–6683.
- Hooper, D.C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *32 Suppl 1*, S9–S15.
- Huang, K., Tang, J., Zhang, X.-X., Xu, K., and Ren, H. (2014). A comprehensive insight into tetracycline resistant bacteria and antibiotic resistance genes in activated sludge using next-generation sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 10083–10100.
- IGN-Insee (2015). Montpellier Méditerranée Métropole : une métropole toujours attractive | Insee.
- Infoclimat (2017). Climatologie de l'année 2016 à Montpellier - Fréjorgues - Infoclimat.

INSEE (2012). Montpellier Agglomération : Quels scénarios démographiques à l'horizon 2030 ? | Insee.

INSEE Analyses Occitanie (2016). Montpellier Méditerranée Métropole : une métropole toujours attractive | Insee.

Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1991). More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *35*, 1697–1704.

Jazayeri Noushabadi, M.R., Jourde, H., and Massonnat, G. (2011). Influence of the observation scale on permeability estimation at local and regional scales through well tests in a fractured and karstic aquifer (Lez aquifer, Southern France). *J. Hydrol.* *403*, 321–336.

Jehl, F., Chomar, M., Weber, M., and Gérard, A. (2012). De l'antibiogramme à la prescription (Biomerieux).

Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., et al. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* *45*, D566–D573.

Joly, D., Faure, D., and Salameh, S. (2015). Empreinte du vivant.

Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., López de Alda, M., Pujades, E., and Barceló, D. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: a review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Sci. Total Environ.* *440*, 82–94.

Kahan, F.M., Kropp, H., Sundelof, J.G., and Birnbaum, J. (1983). Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J. Antimicrob. Chemother.* *12 Suppl D*, 1–35.

Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A.J., Farnleitner, A.H., Kirschner, A., et al. (2016). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the River Danube. *Front. Microbiol.* *7*, 586.

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 423–435.

Kronvall, G., Giske, C.G., and Kahlmeter, G. (2011). Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion. *Int. J. Antimicrob. Agents* *38*, 281–290.

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* *75*, 417–434.

Kutlu, B., Can, S., Serdar, O., and Seker, S. (2013). Assessment of water quality by physicochemical parameters for Munzur and peri river, Turkey. *Elixir Pollut.* 13456–13459.

Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., et al. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 1185–1193.

Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., and 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.

Lemarchand, K., Berthiaume, F., Maynard, C., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Masson, L., and Brousseau, R. (2005). Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *J. Microbiol. Methods* *63*, 115–126.

- Leonardi, V., Jourde, H., and Maréchal, J. (2012). Projet gestion multi-usages de l'hydrosystème karstique du Lez - Résultats complémentaires des forages et traçages.
- Lin, X., McKinley, J., Resch, C.T., Kaluzny, R., Lauber, C.L., Fredrickson, J., Knight, R., and Konopka, A. (2012). Spatial and temporal dynamics of the microbial community in the Hanford unconfined aquifer. *ISME J.* *6*, 1665–1676.
- Lindberg, R.H., Olofsson, U., Rendahl, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., and Andersson, B.A.V. (2006). Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 1042–1048.
- Lu, S.-Y., Zhang, Y.-L., Geng, S.-N., Li, T.-Y., Ye, Z.-M., Zhang, D.-S., Zou, F., and Zhou, H.-W. (2010). High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 5972–5976.
- Ma, X., Xing, M., Wang, Y., Xu, Z., and Yang, J. (2016). Microbial enzyme and biomass responses: Deciphering the effects of earthworms and seasonal variation on treating excess sludge. *J. Environ. Manage.* *170*, 207–214.
- Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I., Chee-Sanford, J., Maxwell, S., and Aminov, R.I. (2006). Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities. *Anim. Biotechnol.* *17*, 157–176.
- Maréchal, J., Ladouche, B., and Vestier, A. (2012). Système karstique du Lez : projet gestion multi-usages - La source du Lez : son fonctionnement.
- Maréchal, J., Vestier, A., Jourde, H., and Dorfliger, N. (2013). L'hydrosystème du Lez : une gestion active pour un karst à enjeux. *Karstologia* 1–6.
- Maréchal, J., Ladouche, B., Batiot-Guilhe, C., Borrell-Estupina, V., Caballero, Y., Cernesson, F., Dörfliker, N., Fleury, P., Jay-allemant, M., Jourde, H., et al. (2014). Projet gestion multi-usages de l'hydrosystème karstique du Lez – synthèse des résultats et recommandations (France).
- Martínez, J.L., Coque, T.M., and Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 116–123.
- Martín-Loeches, I., Diaz, E., and Vallés, J. (2014). Risks for multidrug-resistant pathogens in the ICU. *Curr. Opin. Crit. Care* *20*, 516–524.
- Maugat, S., Berger-Carbone, A., and et al. (2016). Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France (ANSM, ANSES, Santé publique France).
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., and Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 1568–1574.
- McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 3348–3357.
- McKenna, M. (2013). Antibiotic resistance: the last resort. *Nature* *499*, 394–396.
- Meziti, A., Tsementzi, D., Ar Kormas, K., Karayanni, H., and Konstantinidis, K.T. (2016). Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. *Environ. Microbiol.* *18*, 4640–4652.

- Michon, A.-L., Aujoulat, F., Roudière, L., Soulier, O., Zorghiotti, I., Jumas-Bilak, E., and Marchandin, H. (2010). Intragenomic and intraspecific heterogeneity in *rrs* may surpass interspecific variability in a natural population of *Veillonella*. *Microbiol. Read. Engl.* *156*, 2080–2091.
- Milano, M., Ruelland, D., Fernandez, S., Dezetter, A., Fabre, J., Servat, E., Fritsch, J.-M., Ardoin-Bardin, S., and Thivet, G. (2013). Current state of Mediterranean water resources and future trends under climatic and anthropogenic changes. *Hydrol. Sci. J.* *58*, 498–518.
- Moges, F., Endris, M., Belyhun, Y., and Worku, W. (2014). Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. *BMC Res. Notes* *7*, 215.
- Mohanta, T., and Goel, S. (2014). Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in three different aquatic environments over three seasons. *Environ. Monit. Assess.* *186*, 5089–5100.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and 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.
- Nam, S., Kim, M., Park, C., Park, J.-G., Maeng, P.J., and Lee, G.-C. (2013). Detection and genotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. by multiplex polymerase chain reaction in Korean aquatic environmental samples. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *216*, 421–427.
- Narciso-da-Rocha, C., and Manaia, C.M. (2017). The influence of the autochthonous wastewater microbiota and gene host on the fate of invasive antibiotic resistance genes. *Sci. Total Environ.* *575*, 932–940.
- Nordmann, P., Naas, T., and Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 1791–1798.
- Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., and Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 3691–3701.
- Oh, S., Tandukar, M., Pavlostathis, S.G., Chain, P.S.G., and Konstantinidis, K.T. (2013). Microbial community adaptation to quaternary ammonium biocides as revealed by metagenomics. *Environ. Microbiol.* *15*, 2850–2864.
- Oliveira-Pinto, C., Costa, P.S., Reis, M.P., Chartone-Souza, E., and Nascimento, A.M.A. (2016). Diversity of gene cassettes and the abundance of the class 1 integron-integrase gene in sediment polluted by metals. *Extrem. Life Extreme Cond.* *20*, 283–289.
- Olsen, G.J., Woese, C.R., and Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* *176*, 1–6.
- OMS (2016). Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens.
- Ona-Nguema, G., Roose-Amsaleg, R., Paolozzi, L., Liébart, J.C., Bauda, P., Bodilis, J., Dussurget, O., Forterre, P., Gutierrez, C., and Latifi, A. (2015). *microbiologie*, Ed Dunod pp514.
- O'Shea, R., and Moser, H.E. (2008). Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *J. Med. Chem.* *51*, 2871–2878.
- Ouyang, W.-Y., Huang, F.-Y., Zhao, Y., Li, H., and Su, J.-Q. (2015). Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*, 5697–5707.

- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 657–686.
- Patil, P., Sawant, D., and Deshmukh, R.A. (2012). Physico-chemical parameters for testing of water – A review. *Int. J. Environ. Sci.* *3*, 1194–1207.
- Paule-Mercado, M.A., Ventura, J.S., Memon, S.A., Jahng, D., Kang, J.-H., and Lee, C.-H. (2016). Monitoring and predicting the fecal indicator bacteria concentrations from agricultural, mixed land use and urban stormwater runoff. *Sci. Total Environ.* *550*, 1171–1181.
- Pirnay, J.-P., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Van Eldere, J., De Vos, D., Zizi, M., Triest, L., and Cornelis, P. (2005). Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ. Microbiol.* *7*, 969–980.
- Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2011). Genetic features of bla_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 5403–5407.
- Popović, N.T., Kazazić, S.P., Strunjak-Perović, I., and Čož-Rakovac, R. (2017). Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. *Environ. Res.* *152*, 7–16.
- Pronk, M., Goldscheider, N., and Zopfi, J. (2009). Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. *Hydrogeol. J.* *17*, 37–48.
- Qi, C., Pilla, V., Yu, J.H., and Reed, K. (2010). Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *67*, 87–91.
- Qiu, Z., Yu, Y., Chen, Z., Jin, M., Yang, D., Zhao, Z., Wang, J., Shen, Z., Wang, X., Qian, D., et al. (2012). Nanoalumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 4944–4949.
- Queenan, A.M., and Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* *20*, 440–458, table of contents.
- Rashid, I., and Romshoo, S.A. (2013). Impact of anthropogenic activities on water quality of Lidder River in Kashmir Himalayas. *Environ. Monit. Assess.* *185*, 4705–4719.
- Re, S.D., and Ploy, M.-C. (2012). Antibiotiques et réponse SOS bactérienne - Une voie efficace d'acquisition des résistances aux antibiotiques. *médecine/sciences* *28*, 179–184.
- Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P., and Pickup, R.W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 3883–3890.
- Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., and Faure, D. (2008). A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environ. Microbiol.* *10*, 560–570.
- Ribeiro, A.F., Laroche, E., Hanin, G., Fournier, M., Quillet, L., Dupont, J.-P., and Pawlak, B. (2012). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in karstic systems: a biological indicator of the origin of fecal contamination? *FEMS Microbiol. Ecol.* *81*, 267–280.
- Riber, L., Poulsen, P.H.B., Al-Soud, W.A., Skov Hansen, L.B., Bergmark, L., Brejnrod, A., Norman, A., Hansen, L.H., Magid, J., and Sørensen, S.J. (2014). Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using

- pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* *90*, 206–224.
- Rice, L.B. (2012). Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin. Proc.* *87*, 198–208.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., and Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* *447*, 345–360.
- Romano-Bertrand, S., Dupont, C., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., and Licznar-Fajardo, P. (2015). Reducing pathobiomes could slow arms race between man and microbes. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, (A. Méndez-Vilas), pp. 698–716.
- Rowe, W., Verner-Jeffreys, D.W., Baker-Austin, C., Ryan, J.J., Maskell, D.J., and Pearce, G.P. (2016). Comparative metagenomics reveals a diverse range of antimicrobial resistance genes in effluents entering a river catchment. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* *73*, 1541–1549.
- Sadowy, E., and Luczkiewicz, A. (2014). Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. *BMC Microbiol.* *14*, 66.
- Saini, A., and Bansal, R. (2012). Insights on the structural characteristics of NDM-1: The journey so far. *2012*.
- Salahuddin, K., Visavadia, M., Gor, S., Gosai, C., Soni, V.K., and Hussain, M.D. (2014). Diel variations in limnological characteristics of Omkareshwar reservoir of Narmada river, India. *J. Ecol. Nat. Environ.* *6*, 12–24.
- Salles, C., Tournoud, M.-G., Mosser, T., Marchand, P., Rodier, C., and Monfort, P. (2015). Rainfall Changes vs Continental Catchment Input to Coastal Zones. (Varna, Bulgaria: E. Özha), pp. 565–575.
- Salloto, G.R.B., Cardoso, A.M., Coutinho, F.H., Pinto, L.H., Vieira, R.P., Chaia, C., Lima, J.L., Albano, R.M., Martins, O.B., and Clementino, M.M. (2012). Pollution impacts on bacterioplankton diversity in a tropical urban coastal lagoon system. *PloS One* *7*, e511175.
- Schmieder, R., and Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* *7*, 73–89.
- Seiler, C., and Berendonk, T.U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* *3*, 399.
- Servais, P., and Passerat, J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total Environ.* *408*, 365–372.
- Sibley, C.D., Peirano, G., and Church, D.L. (2012). Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* *12*, 505–521.
- Silley, P. (2012). Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* *31*, 33–41.
- da Silva, V.L., Caçador, N.C., da Silva, C. dos S.F., Fontes, C.O., Garcia, G.D., Nicoli, J.R., and Diniz, C.G. (2012). Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. *Microbes Environ.* *27*, 179–185.

- Simon, C., and Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 1153–1161.
- Simon, K.S., Gibert, J., Petitot, P., and Laurent, R. (2001). Spatial and temporal patterns of bacterial density and metabolic activity in a karst aquifer. *Arch. Für Hydrobiol. - Hauptbände* 67–82.
- Simpson, J.M., McCracken, V.J., White, B.A., Gaskins, H.R., and Mackie, R.I. (1999). Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microbiol. Methods* *36*, 167–179.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., and Viridi, J.S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* *6*, 791.
- Sinha, S.N. (2015). Density of Pollution Indicator Bacteria in Relation to Physicochemical Factors During Diel Cycle of River Ganga at Ichapore, West Bengal, India.
- Snelling, A.M., Gerner-Smidt, P., Hawkey, P.M., Heritage, J., Parnell, P., Porter, C., Bodenham, A.R., and Inglis, T. (1996). Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 1193–1202.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B.M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *44*, 846–849.
- Stamey, T.A., and Bragonje, J. (1976). Resistance to nalidixic acid. A misconception due to underdosage. *JAMA* *236*, 1857–1860.
- Stewart, F.J. (2013). Where the genes flow. *Nat. Geosci.* *6*, 688–690.
- Sundsford, A., Simonsen, G.S., Haldorsen, B.C., Haaheim, H., Hjelmevoll, S.-O., Littauer, P., and Dahl, K.H. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *112*, 815–837.
- Suzuki, Y., Kajii, S., Nishiyama, M., and Iguchi, A. (2013). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Sci. Total Environ.* *450–451*, 148–154.
- Tattevin, P., Basuino, L., and Chambers, H.F. (2009). Subinhibitory fluoroquinolone exposure selects for reduced beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and alterations in the SOS-mediated response. *Res. Microbiol.* *160*, 187–192.
- Telang, S., Saxena, Y., and Chaturvedi, A. (2009). Effect of mass bathing on the water quality of Narmada river at district Hoshangabad, (M.P.) India. *Curr. World Environ.* *4*, 211–213.
- Tezel, U., and Pavlostathis, S.G. (2015). Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* *33*, 296–304.
- Tzouveleki, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T., and Legakis, N.J. (2000). CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents* *14*, 137–142.
- Usharani, K., Umarani, K., Ayyasamy, P.M., Shanthi, K., and Lakshmanaperumalsamy, P. (2010). Physico-Chemical and Bacteriological Characteristics of Noyyal River and Ground Water Quality of Perur, India. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* *14*.

- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.-F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.-A., Roumagnac, P., et al. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *4*, 29.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., and Barceló, D. (2012). Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* *430*, 109–118.
- Voolaid, V., Jöers, A., Kisand, V., and Tenson, T. (2012). Co-occurrence of resistance to different antibiotics among aquatic bacteria. *BMC Microbiol.* *12*, 225.
- Wang, P., Chen, B., Yuan, R., Li, C., and Li, Y. (2016). Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. *Sci. Total Environ.* *569–570*, 382–389.
- Wellington, E.M.H., Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect. Dis.* *13*, 155–165.
- Wilhartitz, I.C., Kirschner, A.K.T., Brussaard, C.P.D., Fischer, U.R., Wieltchnig, C., Stadler, H., and Farnleitner, A.H. (2013). Dynamics of natural prokaryotes, viruses, and heterotrophic nanoflagellates in alpine karstic groundwater. *MicrobiologyOpen* *2*, 633–643.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., and Strynadka, N.C. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* *8*, 525–533.
- Wilson, W.J., Strout, C.L., DeSantis, T.Z., Stilwell, J.L., Carrano, A.V., and Andersen, G.L. (2002). Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol. Cell. Probes* *16*, 119–127.
- Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., and 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.
- Wu, N., Qiao, M., Zhang, B., Cheng, W.-D., and Zhu, Y.-G. (2010). Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. *Environ. Sci. Technol.* *44*, 6933–6939.
- Yang, C.-W., Chang, Y.-T., Chao, W.-L., Shiung, I.-I., Lin, H.-S., Chen, H., Ho, S.-H., Lu, M.-J., Lee, P.-H., and Fan, S.-N. (2014). An investigation of total bacterial communities, culturable antibiotic-resistant bacterial communities and integrons in the river water environments of Taipei city. *J. Hazard. Mater.* *277*, 159–168.
- Yin, Q., Yue, D., Peng, Y., Liu, Y., and Xiao, L. (2013). Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria and transfer of resistance genes in Lake Taihu. *Microbes Environ.* *28*, 479–486.
- Zakeri, B., and Lu, T.K. (2013). Synthetic biology of antimicrobial discovery. *ACS Synth. Biol.* *2*, 358–372.
- Zhang, Q., Jia, A., Wan, Y., Liu, H., Wang, K., Peng, H., Dong, Z., and Hu, J. (2014). Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: association with antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* *48*, 14317–14325.
- Zhang, X.-X., Zhang, T., and Fang, H.H.P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *82*, 397–414.
- Zhou, Y., Kellermann, C., and Griebler, C. (2012). Spatio-temporal patterns of microbial communities in a hydrologically dynamic pristine aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* *81*, 230–242.

Antimicrobial resistance in an urban river continuum flowing near hospital settings

Aquatic ecosystems subjected to anthropic pressures are places of rapid evolution of microbial communities. They are likely hotspots for emergence of infectious disease agents resistant to antibiotics. The city of Montpellier is located in a small watershed that undergoes brutal rainfall episodes and strong demographic pressures. A hospital is located in a runoff area including two small urban rivers originating from karstic groundwater few kilometers upstream. The aim of the study is to explore bacterial communities in urban rivers flowing near hospital settings in order to evaluate the influence of runoffs on antibiotics resistance in the bacterial communities. Bacterial communities are also described in upstream karstic aquifers.

An introductory section presents the methods available for studying antimicrobial resistance in environment and then reviews comprehensively bibliography on antibiotics resistance in urban runoffs. This part supports the experimental strategies. The method developed herein, called community Inhibitory Concentration (c-IC) determination is combined to taxonomic richness description to provide a tool that gives a rapid snapshot of resistant bacterial communities in aquatic environments. A strategy derived from c-IC approach allows the exploration of bacterial resistance in the urban hydrologic system near the hospital and in karstic aquifers. The collected microbiological data has been completed by hydrological, hydrogeological, climatic and physico-chemical data.

The impact of very low concentration of antibiotics on the bacterial community structure in various water bodies was demonstrated and appeared as an indicator of the vulnerability of ecosystems to antimicrobial pressures. The taxonomic repertory of the urban river communities was described and its dynamics was compared to environmental conditions. Hospital vicinity significantly increase the prevalence of resistant bacteria compared to a similar urban area remote from hospital. Diverse clinically relevant cephalosporins and carbapenems resistant bacteria have been isolated. Surprisingly, a NDM-producing *Escherichia coli*, which is a highly resistant and emerging pathogen was reported for the first time in a French River. The clone was detected in two independent sampling showing its persistence. The *bla*_{NDM-5} gene and its surrounding sequences were described on a transferable IncX3 plasmid, indicating possible genetic transfer to other bacteria. The antimicrobial resistance in karst groundwater varied in time and space and was hardly compared with that described in related rivers.

In urban settings, water quality and infectious risk is generally assessed on sewers and wastewater treatment plants effluents. This study shows that runoff waters in urbanized area contribute to the emergence and dissemination of antimicrobial resistance. Considering the worrisome epidemiology of infectious diseases, it urges to decipher all environmental reservoirs for resistant bacteria in order to complete knowledges about the epidemiological cycle of antimicrobial resistance and try to break or slow down it.

Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines péri-hospitalières considérées dans un continuum hydrologique

Les écosystèmes aquatiques soumis à des pressions anthropiques sont des lieux d'évolution rapide des communautés microbiennes. Cet environnement participe certainement à l'émergence d'agents infectieux résistants aux antibiotiques. La ville de Montpellier est située dans un petit bassin versant qui subit d'une part des épisodes de pluies brutales et d'autre part de fortes pressions démographiques. Le principal hôpital est situé dans une zone de ruissellement comprenant deux petites rivières urbaines provenant d'eaux souterraines karstiques à quelques kilomètres en amont.

L'objectif de cette étude est d'explorer les communautés bactériennes dans les rivières urbaines qui coulent près du centre hospitalier afin d'évaluer l'influence des ruissellements sur la résistance aux antibiotiques dans les communautés bactériennes. Les communautés bactériennes sont également décrites dans les aquifères karstiques en amont.

Une section introductive présente les méthodes disponibles pour l'étude de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement et une revue de la littérature expose les données actuelles sur la résistance aux antibiotiques dans l'eau de ruissellement urbain. Cette partie justifie les stratégies expérimentales. La méthode développée ici, appelée détermination de la concentration inhibitrice à l'échelle de la communauté bactérienne (c-IC, pour *community inhibitory concentration*), est combinée à une description de la richesse taxonomique pour donner une description instantanée des communautés bactériennes résistantes dans les environnements aquatiques. Une stratégie dérivée de l'approche c-IC permet d'explorer la résistance bactérienne dans le système hydrologique urbain près de l'hôpital et dans les aquifères karstiques. Les données microbiologiques recueillies sont complétées par des données hydrologiques, hydrogéologiques, climatiques et physico-chimiques.

L'impact de très faibles concentrations d'antibiotiques sur la structure de la communauté bactérienne dans divers environnements hydriques a été démontré et apparaît comme un indicateur de la vulnérabilité des écosystèmes face aux pressions antimicrobiennes. Le répertoire taxonomique des communautés fluviales urbaines a été décrit et sa dynamique a été confrontée aux conditions environnementales. Le voisinage des hôpitaux augmente significativement la prévalence des bactéries résistantes par rapport à une zone urbaine similaire éloignée de l'hôpital. Des bactéries d'intérêt médical résistantes aux céphalosporines et aux carbapénèmes ont été isolées. De façon surprenante, un *Escherichia coli* producteur de NDM-5, pathogène émergent hautement résistant, a été signalé pour la première fois dans une rivière française. Le clone a été détecté dans deux échantillons indépendants montrant sa persistance. Le gène *bla*_{NDM-5} et son environnement génétique ont été décrits sur un plasmide IncX3 transférable, indiquant un transfert génétique horizontal possible. La résistance aux antimicrobiens dans l'eau souterraine karstique a varié dans le temps et dans l'espace et est difficilement comparable à celle décrite dans les rivières associées.

En milieu urbain, la qualité de l'eau et le risque infectieux sont généralement évalués sur les eaux usées et les effluents des stations d'épuration. Cette étude montre que les eaux de ruissellement dans des zones urbanisées contribuent à l'émergence et à la dissémination de la résistance aux antimicrobiens. Compte tenu de l'épidémiologie inquiétante des maladies infectieuses, cette étude invite à explorer les potentiels réservoirs environnementaux de bactéries résistantes afin de compléter les connaissances sur le cycle épidémiologique de la résistance aux antimicrobiens et essayer de l'interrompre ou de le ralentir.