



HAL
open science

Persistence de bactéries entériques antibiorésistantes ou pathogènes sur des végétaux de consommation humaine (modèle la laitue)

Mathilde Camiade

► To cite this version:

Mathilde Camiade. Persistence de bactéries entériques antibiorésistantes ou pathogènes sur des végétaux de consommation humaine (modèle la laitue). Microbiologie et Parasitologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR032 . tel-02299369

HAL Id: tel-02299369

<https://theses.hal.science/tel-02299369>

Submitted on 27 Sep 2019

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE - 4200006

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Persistance de bactéries entériques antibiorésistantes ou pathogènes sur des végétaux de consommation humaine (modèle : la laitue)

Présentée et soutenue par
Mathilde CAMIADE

Thèse soutenue publiquement le 9 Juillet 2019
devant le jury composé de

Mme Odile BERGE	Chargé de Recherche, HDR, Unité de Recherches de Pathologie Végétale, Avignon, INRA PACA	Rapporteur
M Olivier BARRAUD	MCUPH, HDR, Unité RESINFIT - Anti-Infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques UMR INSERM 1092, Université de Limoges	Rapporteur
Mme Graziella BOURDIN	Chef d'Unité Bactériologie et Parasitologie, HDR, Laboratoire de Sécurité des Aliments ANSES, Boulogne sur Mer	Examineur
Mme Christine IMBERT	PR, Ecologie et Biologie des Interactions UMR CNRS 7267 Université de Poitiers	Examineur
M Xavier LATOUR	PR, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM - EA 4312), Université de Rouen-Normandie	Examineur
M Azeddine DRIOUICH	PR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV - EA 4358), Université de Rouen-Normandie	Examineur
Mme Karine LAVAL	Directrice de la Recherche, HDR, Institut polytechnique UniLaSalle, Rouen	Directrice de thèse
Mme Barbara PAWLAK	MCF, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV - EA 4358), Université de Rouen-Normandie	Encadrante de thèse
M Josselin BODILIS	MCF, HDR, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM - EA 4312), Université de Rouen-Normandie	Membre invité

Thèse dirigée par Karine LAVAL, UniLaSalle et encadrée par Barbara PAWLAK, laboratoire GlycoMEV EA4358

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, Mme Odile Berge, chargée de recherche à l'INRA d'Avignon, et M Olivier Barraud, Maître de Conférence Universitaire Practicien Hospitalier à l'Université de Limoges, d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de thèse. Je remercie également les membres du jury, Mme Christine Imbert, Professeure au sein d'une unité CNRS de l'Université de Poitiers, M Xavier Latour, Professeur à l'Université de Rouen Normandie, M Azeddine Driouich, Professeur à l'Université de Rouen Normandie, M Josselin Bodilis, Maître de Conférence à l'Université de Rouen Normandie et Mme Graziella Bourdin, Chef d'unité bactériologie et parasitologie de l'ANSES de Boulogne sur Mer, qui en plus a accepté de faire partie de mon Comité de Suivi de Thèse et m'a suivie pendant 4 ans.

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Université de Rouen Normandie au sein de l'Unité Aglyle de l'institut polytechnique UniLaSalle, du laboratoire GlycoMEV et du laboratoire LMSM. Je tiens à remercier la Région Normandie et l'ex GRR-VASI (Végétal Agronomie Sol et Innovation) représenté maintenant par la Structure Fédérative de Recherche « Normandie Végétal » (FED4277), et le CASDAR PATHOGREEN pour le soutien financier de mes années de thèse. Je remercie également l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement pour votre écoute, et les formations de qualité que vous m'avez permis de suivre.

Je tiens à remercier sincèrement Mme Karine Laval, ma directrice de thèse, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette incroyable expérience qu'est la thèse, de m'avoir fait confiance et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens pour réaliser mes travaux.

Je remercie également toute l'équipe d'UniLaSalle, Caroline, Isabelle, Jean-Baptiste, qui m'ont permis d'effectuer mes expérimentations à Normand Serre et qui m'ont toujours accueillie à bras ouverts dans les locaux. Je n'oublie pas, bien sûr, Wassila, qui durant mon stage de M2 m'a montré les joies de l'enseignement en me laissant participer à ces TP et qui est toujours un vrai rayon de soleil.

Je remercie le laboratoire LMSM de m'avoir permis de commencer mes travaux de thèse au sein de leur locaux à Mont-Saint-Aignan et de m'avoir permis de continuer à utiliser le matériel après la restructuration d'équipe et le changement de laboratoire. Je remercie Laurent et Josselin, rescapés de l'antenne Mont-Saint-Aignan, pour leur soutien et leurs conseils.

Merci au laboratoire GlycoMEV qui m'a accueillie au milieu de ma thèse, qui m'a fait de la place et a fait en sorte que je m'intègre rapidement dans leur grande famille me donnant l'impression d'être là depuis des années.

Je tiens également à remercier les partenaires du projet CASDAR, Mesdames des chambres d'agriculture départementales, pour votre implication dans le projet, arrivant à nous trouver des maraîchers prêts à participer à des travaux de recherche. Le SILEBAN avec Jacques et Pauline, qui m'ont fourni régulièrement les plants de laitues nécessaires à la réalisation des expérimentations en serre, me simplifiant ainsi grandement la vie. Et Actalia avec Nicolas et Stéphanie, pour les échanges scientifiques que nous avons eu pendant les comités de pilotage.

A Barbara, bien plus que mon encadrante de thèse, mille mercis. Vous avez toujours été à mes côtés, que ce soit dans la recherche ou dans mon expérience en enseignement. Vous m'avez guidée, écoutée, ré-orientée quand je m'éparpillais, conseillée et surtout soutenue. Nous n'avons pas toujours eu des moments faciles, ni été sur les mêmes longueurs d'ondes, mais cette thèse n'aurait pas été possible sans vous, votre implication. Merci de m'avoir fait partager votre passion pour nos « petites bactéries mignonnes » (ou pas) et vos connaissances sur l'antibiorésistance. Et merci d'avoir conforté mon avis sur les salades : elles sont dangereuses pour la santé (bon j'exagère peut-être un peu). Merci d'avoir résisté à cette dernière ligne droite qu'est la rédaction et à mes « renards, canards » et autres animaux que je plaçais partout.

A Sylvaine, ma technicienne préférée, ma soupape de décompression, la première personne à qui je parlais le matin et des fois la dernière personne, que te dire. Cette dernière année passée sans toi m'a semblé plus fade, plus longue. Le laboratoire ne résonnait plus des musiques de Nostalgie, de nos reprises en chœurs des chansons, plus ou moins juste (plutôt moins pour moi) et notre fameux « ah il est mort lui » !!!! Nous avons passé des heures à regarder les catalogues de commandes, à les comparer et à trouver les codes NACRES !!!!!!!!!!! Je te remercie pour tout ce que tu m'a appris, les plans B et les bricolages avec des élastiques pour que les falcons tiennent dans l'incubateur. J'espère vraiment que ta nouvelle vie te plait et que tu t'y épanouie.

Sylvie, la fée de TP, merci pour nos discussions scientifiques et pas que. Merci pour toutes les connaissances que tu as partagées avec moi. Merci pour toutes les prépas qui facilitent tellement les TP et les dépannages de tube, de spectro, de vortex et j'en passe.

Merci à Sophie, Gaele, Estelle pour vos passages dans le bureau, à me demander si ça va, à me conseiller et à m'écouter.

Aux doctorants GlycoMeviens, Coralie, Jérémy, Pilou, Rodolphe, Aline, Marc, Marie. Vous m'avez acceptée parmi vous, vous m'avez fait découvrir ce qu'était la véritable ambiance de labo et l'entraide qui existe entre galérien de la thèse. Vous m'avez amenée au Colbert pour des pauses détente. Vous n'imaginez pas à quel point je vous suis reconnaissante pour tout ça.

Mention special pour mes chanceux collègues de bureaux, Aline, Marc et Marie. Je ne suis pas sûre que j'ai été un vrai cadeau. J'ai débarqué avec tout un tas de dossier qui ont rempli votre armoire, j'ai ré-organisé le bureau à peine arrivée. Et vous avez du subir pendant plus d'un an, tous les jours des

« j'ai faim », « manger », « gâteau » ou encore « chocolat ». Vous m'avez écoutée critiquer tout ce qui passait sous mes yeux et surtout vous m'avez supportée pendant cette période difficile qu'est la rédaction. Marie tu ne sais pas encore ce qui t'attends mais garde ton sourire et ton caractère trempé. Marc, merci pour tes conseils et ta relecture, tes réponses à mes questions, parfois un peu idiotes, sur la microscopie et le RET. Aline, tu es la première que j'ai connu à l'université. On s'est rertouvé dans la même galère avec la Serre et tu as toujours été à mon écoute. Encore maintenant je sais que je peux compter sur toi. Tu as relus mes écrits, tu m'as ravitaillé en chocolat pour que mon moral reste au beau fixe alors « Muchas gracias ! » Alinette.

Merci à tous mes stagiaires, Guillaume (le premier), Sofia, Cécile, Elise, Claire, Oscar, Yvan, Gaetan, Ikram, Iman, Victor, ... pour votre motivation, votre envie de manipuler et d'ajouter votre contribution à ma thèse. Charlotte, tu es celle que j'ai eu le plus longtemps et qui a même voulu revenir travailler avec moi de ton plein grés. Et en plus je n'ai pas réussi à te dégouter de la thèse. Vraiment incompréhensible. J'espère que tu va t'épanouir pendant ta thèse à GlycoMEV et tu sais que si tu as besoin je serai toujours là.

Merci à Aurélia, ma coach sportive préférée, qui m'a encouragée, poussée à aller au delà de mes limites et permis de me vider la tête et de me sentir bien dans ma vie et compris mes incapacités à venir en cours avec les manip et la rédaction. Bon par contre maintenant tu vas avoir du taff pour me remettre dans une forme olympique et me faire entrer dans ma robe de soutenance !!!!

Emeline, cette thèse c'est aussi grâce à toi. C'est toi qui m'as dit pour le stage de master « vient à Rouen y'a des labo de microbio ». Du coup je suis venue et je suis restée. Tu sais déjà combien tu compte pour moi ma bichette alors juste merci.

Stephane, Steph, Fafane, mon chat. Tu as déboulé en plein milieu de cette thèse, pour mon plus grand bonheur. Tu supportes toutes mes névroses et déformations professionnels, comme mon goût prononcé pour l'eau de javel et le gel hydroalcoolique et mon refus (presque) catégorique de manger de la salade (à moins de la faire tremper 15 min dans de l'eau avec du vinaigre et inspection feuille par feuille). Merci d'être là, d'être toi, de ne pas toujours comprendre de quoi je parle et de me ramener dans la vie réelle quand je pars dans mes délires scientifiques.

Enfin, merci à mes parents. Rien n'aurait été possible sans vous. Vous avez toujours cru en moi et soutenu dans mes choix, même lorsque j'ai voulu faire science en étant complètement nulle en math. Ce n'a pas été facile, je vous ai fait passer par toutes les couleurs et traverser la France pour me suivre dans mes périples de formations. Vous avez pris soins de mes premières salades pendant mes vacances et avez vécu cette thèse aussi intensément que moi. Après des moments de doute, de stress, de découragement mais aussi d'euphorie, ça y est le manuscrit qui récapitule tous ce que j'ai fait pendant 4 ans est enfin fini. Je vais pouvoir vous le donner pour qu'il trône dans la bibliothèque et permette de caler les autres livres. Papa, Maman, merci pour tout je vous aime.

Table des matières

INTRODUCTION	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	23
A. Bactéries entériques pathogènes et Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC)	25
I. Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives	25
1. Etat des lieux en France et en Normandie	25
a. En France	25
b. En Normandie.....	27
2. TIAC dues aux <i>E.coli</i> productrices de shigatoxines	27
II. Les bactéries pathogènes entériques	31
1. Salmonella	33
a. Généralités.....	33
b. Pathologies associées	33
c. Mécanisme de colonisation	37
2. Les pathotypes de <i>Escherichia coli</i>	39
a. Généralités et pathologies associées.....	39
b. Mécanismes de colonisation	41
c. Les <i>E.coli</i> productrices de Shiga-toxines (STEC)	43
i. Les réservoirs.....	43
ii. Pathologies associées	45
iii. Mécanismes de colonisation	45
B. La résistance bactérienne aux antibiotiques et ses supports génétiques	49
I. Les mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques	53
1. Diminution de la concentration intracellulaire des antibiotiques	53
a. Perméabilité membranaire diminuée.....	53
b. Les pompes à efflux	55
2. Modifications de la cible de l'antibiotique	57
a. Modification du site cible	57
i. Mutation du site cible	57
ii. Altération enzymatique du site cible.....	57
iii. Remplacement complet ou contournement du site cible	59
b. Protection de la cible	61
3. Inactivation des molécules antibiotiques	61
a. Altérations chimiques de l'antibiotique	61

b.	Dégradation de la molécule antibiotique	63
II.	L'acquisition des gènes de résistances par transfert horizontal	65
1.	Les transferts horizontaux	65
a.	La transformation	67
b.	La transduction	67
c.	La conjugaison	69
2.	Les éléments génétiques mobiles impliqués dans l'antibiorésistance	71
a.	Les séquences d'insertions	71
b.	Les transposons	73
i.	Les transposons composites	75
ii.	Les transposons non composites	75
c.	Les ICE	75
d.	Les îlots génomiques	77
e.	Les intégrons.....	79
i.	Les intégrons de classe 1	81
ii.	Les intégrons de classe 2	83
iii.	Les intégrons de classe 3	85
f.	Les plasmides	85
i.	Réplication et contrôle	87
ii.	Les groupes d'incompatibilités Inc	89
i.	Autres méthodes de classification des plasmides	89
i.	Maintien du plasmide	91
C.	Les mécanismes d'adaptation des bactéries entériques à l'environnement	93
I.	L'adhésion : étape clé de la colonisation ?	93
1.	Première étape : le rapprochement de la surface	95
a.	Les différents types de mobilités.....	95
b.	Flagelles et autres appendices protéiques	97
c.	Le chimiotactisme : guide de la mobilité	101
2.	Deuxième étape : interactions avec la surface	103
a.	Interactions réversibles	103
b.	Interactions irréversibles.....	105
II.	Les biofilms bactériens.....	107
1.	Composants d'un biofilm.....	107
2.	Avantages des biofilms	111
3.	Dispersion du biofilm.....	111
I.	Les bactéries Viables Non Cultivables	115
1.	Induction de cet état	115

2. Sortie de l'état VNC	117
3. VNC, antibiorésistances et TIAC	117
D. Sources et voies de contamination des plantes par des bactéries entériques multirésistantes aux antibiotiques et/ou pathogènes	119
I. Les sources de contamination des productions végétales	119
1. Le sol.....	121
2. L'eau d'irrigation	125
3. Place de l'antibiorésistance dans les contaminations	127
II. La survie des pathogènes sur les végétaux.....	129
1. Attachement et internalisation des bactéries entériques pathogènes aux végétaux.....	131
2. Bactéries entériques et défenses des plantes	133
a. La paroi végétale, première barrière de défense	135
b. La réponse immunitaire des plantes, deuxième ligne de défense	137
c. Le piège racinaire extracellulaire ou RET	139
 CONTEXTE ET OBJECTIFS	 141
 PREMIERE PARTIE.....	 147
 LA CARACTERISATION DE PLASMIDES D'ANTIBIORESISTANCE	 147
A. Contexte scientifique et objectifs.....	149
B. Principaux résultats et conclusion	155
Resistance genes.....	178
 DEUXIEME PARTIE	 199
 ETUDE DE LA PERSISTANCE DE SOUCHES DE <i>E. COLI</i> ANTIBIORESISTANTES SUR DE JEUNES PLANTS DE LAITUES.....	 199
A. Contexte et Objectifs.....	201
B. Paramètres de l'étude	203
I. Le choix des souches bactériennes	203
II. Les variétés de laitues.....	205
III. Mise au point du protocole de contamination volontaire des plants de laitue et de récupération des bactéries.....	205

C. Résultats	211
I. Recouvrement des bactéries <i>E. coli</i> cultivables au cours du temps	211
II. Quantification moléculaire des souches dans l'eau de lavage : recouvrement et survie des bactéries 215	
1. Laitue Romaine : décrochage et survie des bactéries	217
2. Laitue Pommée : décrochage et survie des bactéries	219
D. Conclusion intermédiaire	223
 TROISIEME PARTIE.....	 227
 ETAT DES LIEUX DE LA CONTAMINATION DES LAITUES EN CHAMPS PAR DES BACTERIES227	
A. Contexte et objectifs	229
B. Paramètres de l'étude	231
I. Sites de prélèvement	231
II. Echantillonnages	231
III. Critères microbiologiques appliqués	233
C. Résultats	237
I. Résultats des enquêtes de vulnérabilité	237
II. Plan à deux classes : Recherche de bactéries entériques pathogènes sur les laitues	239
III. Plan à trois classes : Dénombrement de <i>E. coli</i> sur les laitues	241
IV. Dénombrement de <i>E. coli</i> dans l'eau d'irrigation du site D	245
V. Antibiorésistance au sein des exploitations maraîchères	249
1. Sur les laitues	249
2. Dans l'eau d'irrigation du site d'exploitation D	255
D. Conclusions	257
 DISCUSSION.....	 263
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	 283
 MATERIELS ET METHODES.....	 289
A. Caractérisation des plasmides	291

I.	Choix des souches	291
II.	Croissance bactérienne	291
III.	Survie Bactérienne.....	291
IV.	Profils d’antibiorésistance	293
V.	Conjugaison plasmidique	293
VI.	Groupe d’incompatibilité	295
VII.	Recherche des intégrons de classe I et II.....	297
VIII.	Stabilité des plasmides	297
IX.	Séquençage plasmidique et analyse.....	297
B.	Développement des laitues	299
I.	Variétés cultivées	299
II.	Culture en serre	299
C.	Adhésion des plasmides	299
I.	Sur surface inerte.....	299
II.	Sur feuille de laitues.....	301
III.	Extraction ADN eau de lavage et feuille de laitues.....	303
IV.	PCR temps réel	305
D.	Evaluation microbiologique en champs.....	305
I.	Préparation des échantillons	305
II.	Recherche de pathogènes sur laitues	307
1.	Enrichissement	307
a.	<i>Salmonella spp</i>	307
b.	STEC.....	307
2.	Extraction d’ADN	309
a.	<i>Salmonella spp</i>	309
b.	STEC.....	309
3.	PCR.....	309
III.	Recherche de <i>E.coli</i> sur laitues	311
IV.	Analyses de l’eau d’irrigation	311
	REFERENCES	313
	ANNEXE	345

Table des Illustrations

Figure 1: Répartition des TIAC en France de 1990 à 2016	24
Figure 2: Agents pathogènes les plus fréquemment impliqués dans les TIACS entre 1996 et 2016.....	24
Figure 3: Aliments les plus impliqués dans les TIAC à Salmonella de 1996 à 2006 en France	24
Figure 4: Hiérarchisation de Salmonella	24
Figure 5: Image de Microscopie électronique à balayage avec des couleurs améliorées montrant des cellules humaines cultivées envahies par Salmonella Typhimurium (rouge) ...	34
Figure 6: Mécanismes d'infection de Salmonella dans l'épithélium intestinal.	34
Figure 7 : Acquisition et perte de gènes menant aux différents pathotypes de E. coli.....	34
Figure 8: Schéma de pathogénèse des E.coli pathogènes selon leur pathotypes.....	40
Figure 9: Image au microscope électronique à balayage du piedestal formé par une E. coli entérohémorragique dans le gros intestin humain.	44
Figure 10: Schéma de la formation de lésions d'attachement et effacement (A/E) (.....	44
Figure 11: Mécanisme d'action cytotoxique des shiga-toxines lors de la colonisation des cellules épithéliales par une EHEC	48
Figure 12 : les différents mécanismes de résistance associés à la modification de la porine. 52	
Figure 13: Les cinq grandes familles de pompes à efflux (Yilmaz and Özcengiz 2017)	54
Figure 14 : Modifications des sites cibles des antibiotiques (Blair <i>et al.</i> 2015).	56
Figure 15: Inactivation des molécules antibiotiques.	60
Figure 16 : Tableau non exhaustif des principaux mécanismes de résistance mis en place par les bactéries selon les différentes classes d'antibiotiques	64
Figure 17 : Plasmide extracellulaire transféré à une cellule compétente par le processus de transformation	66
Figure 18: Transfert de gènes par transduction entre des bactériophages et une bactérie ..	66
Figure 19: Transfert de plasmide entre bactéries par conjugaison.	68
Figure 20: Effets possibles de la transposition d'IS dans la fonction et l'expression d'un gène cible.	70
Figure 22: Structure d'un transposon non composite	74
Figure 21: Structure d'un transposon composite.	74
Figure 23: Modèle conceptuel généralisé de transfert des ICE	74

Figure 24 : Caractéristiques générales de différentes classes d'intégrons.....	80
Figure 25 : Schéma d'un plasmide de résistance.	90
Figure 26 : Les systèmes de maintien des plasmides dans les cellules bactériennes.....	92
Figure 27 : Les différents types de mobilité bactérienne	94
Figure 28 : Structure d'un flagelle bactérien.....	96
Figure 29: Les différentes adhésines de surface et leurs machines d'assemblage au sein des bactéries à Gram négatif	98
Figure 30 : Le chimiotactisme chez E. coli.....	100
Figure 31: Étapes de la formation de biofilms chez Staphylococcus	106
Figure 32: La structure complexe des biofilms bactériens	108
Figure 33 : Voies de circulation et de contamination par des bactéries pathogènes entériques	120
Figure 34: Présence de Salmonella enterica à la surface d'une feuille de laitue.....	130
Figure 35 : Internalisation de Salmonella dans différentes plantes (Roquette, Basilic, Persil)	132
Figure 36 : Colonisation des racines par des E.coli	132
Figure 37 : Constitution de la paroi végétale	134
Figure 38 : Interactions entre bactéries entériques pathogènes humaines et plantes.....	136
Figure 39 : Observation microscopique des cellules frontières (BCs) et du mucilage libérés par l'extrémité des racines de pois (Pisum sativum) (A)et d'Arabidopsis thaliana de type sauvage (B)	138
Figure 40 : Bloc diagramme représentant un paysage karstique.	148
Figure 41 : Organigramme montrant la stratégie d'étude des plasmides de résistance.....	154
Figure 42: Image des cultures en conditions contrôlées à Normand Serre.....	202
Figure 43 : Stratégie d'étude de la survie et de l'adhésion des souches de E. coli sur les feuilles de laitues.	202
Figure 44 : Evolution des protocoles de lavage pour le décrochage des bactéries E. coli faiblement liées à la feuille de laitue.	204
Figure 45 : Heat-Maps indiquant le pourcentage de recouvrement des souches de E. coli cultivables dans l'eau de lavage en fonction du temps.	210
Figure 46 : Stratégie d'étude de la survie et de l'adhésion après les différentes étapes de lavage	214

Figure 47 : Fréquence de recouvrement et de survie des souches transformées et environnementales au J1 et J11 de prélèvement pour la Laitue Romaine dans l'eau de lavage.	216
Figure 48 : Fréquence de recouvrement et de survie des souches transformées et environnementales au J1 et J11 de prélèvement pour la Laitue Pommée dans l'eau de lavage.	218
Figure 49 : Bassin de stockage de l'eau d'irrigation sur le site d'exploitation D.....	230
Figure 50 : Schéma présentant les plans d'échantillonnage à 2 classes et 3 classes.....	232
Figure 51 : Densité bactérienne de E. coli (en UFC/100mL) dans l'eau d'irrigation de l'exploitation D au cours des campagnes d'échantillonnage.....	244
Figure 52: Architecture d'une feuille de laitue Romaine (A) et Pommée (B) vue au microscope 3D à différents grossissements.	272
Figure 53 : Architecture d'une nervure centrale de feuille de laitue Romaine (A) et Pommée (B) vue au microscope 3D à différents grossissements.	272

Table de Tableau

Tableau 1: Récapitulatif des classes d'antibiotiques et de leurs actions chez les bactéries....	50
Tableau 2 : Antibiotiques testés au cours de l'étude pour la détermination de la résistance aux antibiotiques de E.coli, classés par famille.....	152
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des caractéristiques principales des plasmides étudiés précédemment.....	200
Tableau 4 : Description des sites de prélèvement selon des points critiques de contamination microbiologiques établie lors de comités du programme PATHOGREEN.	230
Tableau 5 : Extrait de l'annexe 1 de l'arrêté 2073/2005.....	232
Tableau 6 : Détection des pathogènes STEC et Salmonella dans les laitues des 4 quatre exploitations lors des différentes campagnes de prélèvements..	238
Tableau 7 : Densité N de E. coli en UFC/g dans les différents échantillons de laitues collectées lors des campagnes de prélèvements sur les quatre exploitations maraichères.....	240
Tableau 8 : Répartition de l'antibiorésistance présente chez les E. coli isolées des laitues en fonction des sites d'exploitation.....	250
Tableau 9 : Répartition de l'antibiorésistance présente chez les E. coli isolées de la réserve d'eau du site D.....	254
Tableau 10 : Répartition (en pourcentage) des résistances en fonction des antibiotiques testés dans la population totale de E. coli provenant des laitues contaminées et de l'eau d'irrigation (site D).	256
Tableau 11 : Souches environnementales et de laboratoire	290
Tableau 12 : Antibiotiques testés au cours de l'étude pour la détermination de la résistance aux antibiotiques de E.coli,	292
Tableau 13 : Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les PCR de groupes d'incompatibilité.	294
Tableau 14 : Amorces oligonucléotidiques pour la PCR des intégrons de classe I et II.	296

Liste des Abréviations :

ARS : Agence Régionale de Santé

Bap : biofilm-associated protein

BC : Border cell

BLC : Border-like cell

DDCSPP : Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations

DMI : Dose Minimale Infectieuse

DR: Direct repeat

DTT : dithiothréitol

EAEC : Enteroaggregative Escherichia coli

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

EFSA : European Food Safety Authority

EHEC : Enterohaemorrhagic *E. coli*

EIEC : Enteroinvasive Escherichia coli

EPEC : Enteropathogenic Escherichia coli

EPS : Extracellular Polymeric Substances

ESBL : Extended-Spectrum Beta-Lactamase

ETEC : Enterotoxigenic *E. coli*

GEA : Gastro Entérite Aigüe

Gène *eae* : *E. coli* attaching and effacing

ICE : Integrative Conjugative Element

iNTS : Invasive non-typhoidal salmonellosis

InVS : Institut de Veille Sanitaire

IR : Inverted sequence

IS : Insertion sequence

ISCR : IS with common region

LEAF : Linking Environment And Farming

LEE : Locus of enterocyte effacement

LPS : Lipopolysaccharides

MAMP : Microbes-Associated Molecular Pattern

Mpf : Mating pair formation

NTS : Non-typhoidal salmonellosis

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PBRT : PCR-based replicon typing

PCR : Polymerase Chain Reaction

PRR : Pattern Recognition Receptor

PTI : PAMP Triggered Immunity

RET : Root Extracellular Trap

SCV : *Salmonella* containing vacuole

SFR : Structure Fédérative de Recherche (Région Normandie)

SHU : syndrome hémolytique et urémique

SPI : Salmonella pathogenicity island

STEC : Shiga-Toxin producing E. coli

T3SS : Type 3 secretion system

T4SS : Type 4 secretion system

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

Tir : Translocated intimin receptor

UFC : Unité Formant Colonie

VNC : Viable Non Cultivable

Introduction

L'un des incidents les plus redoutés en Agro-Alimentaire est la contamination des aliments par des micro-organismes entériques pathogènes (bactéries, virus, parasites). Longtemps, il a été pensé que les bactéries entériques pathogènes, émises dans l'Environnement *via* les rejets fécaux (stations d'épuration, fosses septiques, épandage de lisier, pâturages, ...), n'avaient qu'une durée de vie très limitée. Par conséquent, les productions végétales susceptibles d'être contaminées par des bactéries pathogènes circulantes, apparaissaient malgré tout comme des matrices alimentaires peu vulnérables vis-à-vis de ces bactéries. Cependant, des bactéries entériques pathogènes, comme *Salmonella* et certains sérotypes entérohémorragiques de *Escherichia coli*, sont incriminées dans un nombre croissant de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (Deering *et al.* 2012; Van der Linden *et al.* 2013; van Overbeek *et al.* 2014; Martínez-Vaz *et al.* 2014; Jang and Matthews 2018). En Europe, l'une des TIAC les plus importantes s'est produite en 2011, avec des salades composées comportant des graines germées de fénugrec (condiment) contaminées par un sérotype entérohémorragique d'*E. coli*, O104:H4. Cette TIAC a particulièrement touché l'Allemagne et la France, faisant presque 4000 malades et provoquant plus de 50 décès (Radosavljević *et al.* 2016).

En plus du danger constitué par la présence de tels pathogènes dans les produits alimentaires d'origine végétale, il est important de rappeler que les bactéries entériques, pathogènes ou non, véhiculent un nombre important de gènes de résistance aux antibiotiques (Casals-Pascual *et al.* 2018). En effet, depuis la découverte par Alexander Fleming de la pénicilline en 1928, l'utilisation des antibiotiques s'est généralisée en médecine humaine et vétérinaire. Depuis 70 ans, cette utilisation, massive et inappropriée, a conduit à l'adaptation des bactéries *via* le développement de mécanismes de résistance (Morehead and Scarbrough 2018). Les supports génétiques de ces résistances sont souvent plasmidiques et donc transférables au sein des populations bactériennes (Poirel *et al.* 2016; Millan *et al.* 2016; Lopatkin *et al.* 2017). Le compartiment environnemental semble de plus largement impliqué dans la dissémination et l'évolution de l'antibiorésistance bactérienne (Manaia 2017; Larsson *et al.* 2018). La survie, voire l'adaptation, des bactéries entériques sur les végétaux de consommation humaine peut donc alimenter la circulation de bactéries antibiorésistantes vers le consommateur et participer à l'érosion croissante de l'efficacité des antibiotiques.

Afin d'illustrer les différents dangers potentiels impliquant les bactéries entériques antibiorésistantes, mon mémoire de thèse commencera par une étude bibliographique. Elle portera tout d'abord sur les bactéries entériques pathogènes et les Toxi-Infections Alimentaires Collectives avant d'aborder la résistance bactérienne aux antibiotiques, les mécanismes d'adaptations des bactéries entériques à l'environnement et de finir sur les sources et voies de contamination des plantes par ces bactéries.

Après cette étude viendra le contexte et les objectifs de la thèse avant de passer aux résultats organisés en trois parties.

Enfin ce mémoire se terminera par une discussion des résultats obtenus ouvrant sur des conclusions et des perspectives.

Etude Bibliographique

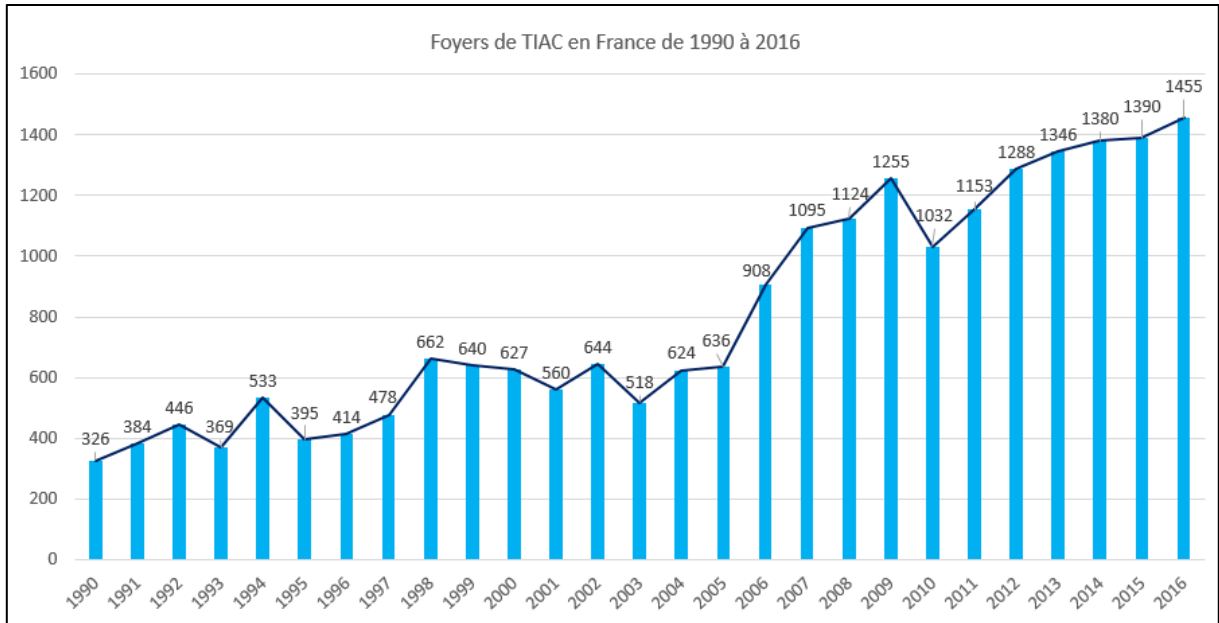


Figure 1: Répartition des TIAC en France de 1990 à 2016 (n= 14690) (d'après les rapports de l'Institut de Veille Sanitaire)

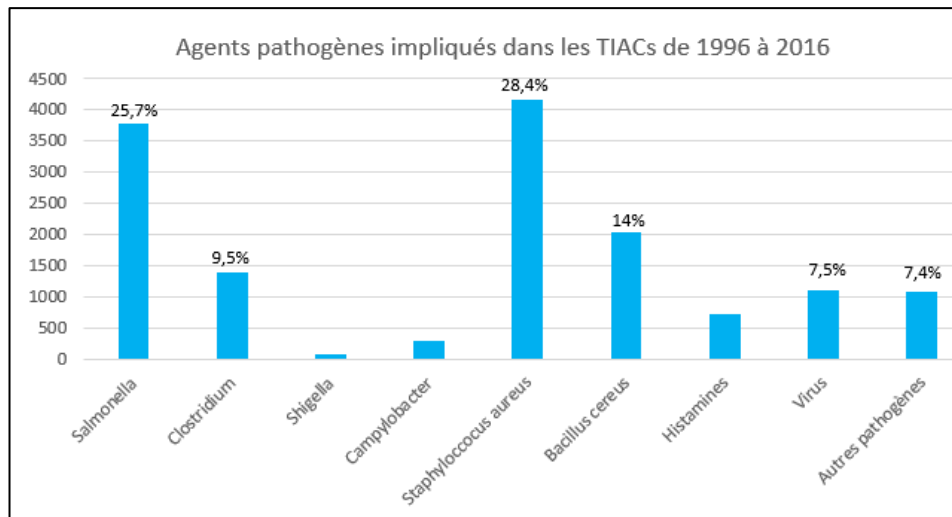


Figure 2: Agents pathogènes les plus fréquemment impliqués dans les TIACS entre 1996 et 2016 (d'après les rapports de l'Institut de Veille sanitaire)

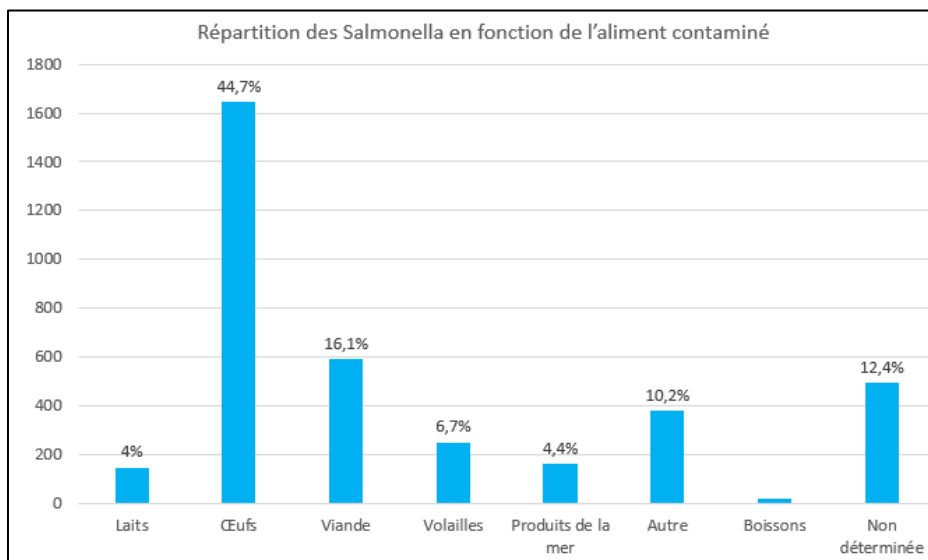


Figure 3: Aliments les plus impliqués dans les TIAC à Salmonella de 1996 à 2006 en France (d'après les rapports de l'Institut de Veille sanitaire)

A. Bactéries entériques pathogènes et Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC)

I. Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives

Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives ou TIAC correspondent à l'apparition d'au minimum 2 cas similaires de maladies, généralement gastro-intestinales, dont la cause a une même origine alimentaire. En France, les TIAC sont à déclaration obligatoire auprès de l'Agence Régionale de Santé¹ et/ou de la Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations² par les médecins, biologistes, responsables d'établissement de restauration collective ou à caractère social ou encore par des consommateurs ou d'autres personnes ayant connaissance d'un épisode pouvant être une TIAC. Cette déclaration est transmise à d'autres agences (Santé publique France, Direction Générale de l'Alimentation) et entraîne des investigations pour confirmer la TIAC, identifier son origine et mettre en place des mesures préventives et/ou correctives si besoin. Chaque année une base de données est constituée par Santé publique France afin de réaliser l'analyse des caractéristiques épidémiologiques des TIAC et déterminer les facteurs ayant pu contribuer à leur survenue. Un rapport est rendu publique chaque année par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) (Institut de Veille Sanitaire 2019a).

Il existe 12 Centres Nationaux de Référence (CNR) qui contribuent à la surveillance épidémiologique des bactéries pathogènes à transmission alimentaire que sont *Salmonella* spp, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter* et *Helicobacter*, *Escherichia coli* et *Shigella*, *Listeria* spp, *Trichinella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Brucella* et *Francisella tularensis*.

1. Etat des lieux en France et en Normandie

a. En France

Comme le montre la Figure 1, depuis 1990, on constate une augmentation constante des foyers de TIAC détectés en France (326 en 1990 et 1455 en 2016). Ceci s'explique notamment par l'amélioration des méthodes de recherche et de surveillance des pathogènes,

¹ Agence Régionale de Santé : ARS : chargée du pilotage régional du système national de santé

² Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations : DDCSPP : garantit la sécurité sanitaire et économique des concitoyens et contribue à la cohésion sociale de la société.

ainsi que par une meilleure communication entre les différents services de santé. Sur une période de 20 ans (de 1996 à 2016) (Figure 2), parmi les agents pathogènes confirmés ou suspectés d'être à l'origine de TIAC, 25,7% sont des *Salmonella* (dont 33% de *S. Enteridis* et 17,7% de *S. Typhimurium*), 28,4% *Staphylococcus aureus* et 14% *Bacillus cereus*. La plupart de ces TIAC ont eu lieu dans le cadre familial (33,7%) et commercial (28,1%). La Figure 3 montre la répartition des aliments contaminés par *Salmonella spp*, les œufs étant les denrées les plus contaminées (44.7%), suivis de la viande (16.1%). La catégorie « Autre » dans laquelle se retrouvent les salades composées et les végétaux (légumes, fruits) représente 10,2% des aliments contaminés ce qui la place devant les volailles (6.7%), les produits laitiers (4%) et de la mer (4.4%) (Institut de Veille Sanitaire 2019a).

b. En Normandie

Si l'on regarde les données épidémiologiques pour la région Normandie (Haute et Basse Normandie confondues) sur la période de 2006 à 2015, les TIAC normandes représentent 36,34% des TIAC nationales. L'agent pathogène le plus incriminé est *Salmonella* à 69,3%, avec une répartition de 45,6% pour *S. Typhimurium*, 11,4% pour *S. Enteridis* et 43% pour les autres sérotypes. L'aliment le plus contaminé par *Salmonella* est la viande à 58,8% (Institut de Veille Sanitaire 2019a).

On retrouve à l'échelle régionale approximativement la même répartition des lieux de survenue des TIAC (cadre familial et commercial) et les mêmes agents pathogènes incriminés qu'à l'échelle nationale (Figure 2), mais pas dans des proportions identiques.

2. TIAC dues aux *E.coli* productrices de shigatoxines

En France, la détection d'infections dues à des *E. coli* productrices de shigatoxines (STEC³), dont la DMI est <100 UF,C est basée sur le recensement des cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU) et permet de suivre les tendances spatio-temporelles des SHU chez les enfants âgés de moins de 15 ans, de connaître les caractéristiques épidémiologiques des cas et de détecter des phénomènes épidémiques. Cette surveillance a été mise en place

³ STEC : Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

en 1996, par Santé publique France en collaboration avec la Société de néphrologie pédiatrique, à la suite d'une étude sur les années 1995-1996 montrant que 86 % des SHU pédiatriques en France survenaient à la suite d'une infection par des souches STEC. Le suivi porte sur les SHU apparaissant chez les enfants de moins de 15 ans (population la plus susceptible d'être touchée) et repose sur un réseau constant de 32 services de pédiatrie et de néphrologie pédiatrique de centres hospitaliers répartis sur tout le territoire métropolitain. En complément de ce réseau, d'autres services notifient ponctuellement les cas de SHU hospitalisés dans leurs services.

L'infection par des souches STEC est ensuite confirmée par le Centre National de Référence (CNR) des *E. coli* et *Shigella* et ses laboratoires associés, par isolement des souches STEC à partir des selles, ou détection par PCR des gènes codant les shigatoxines (*stx*, *eae*). Pour chaque cas, une fiche de renseignements, comportant des informations sociodémographiques (âge, sexe...), cliniques, biologiques (hématologie, biochimie, coproculture et sérologie) et épidémiologiques est adressée à Santé publique France (Institut de Veille Sanitaire 2019b).

Ainsi, depuis 1996, 2342 cas de SHU, en France, ont été détectés avec une augmentation depuis 2005 (81 cas en 1996 et 164 cas en 2017). Au niveau des sérotypes retrouvés, entre 2004 et 2017, les plus présents étaient O157 (41%) et O26 (14%), puis O80 (5%), O145 (3%), O111 et O103 (2%).

Sur la période 1996 – 2013, la Basse-Normandie était la 3^e région la plus touchée par les SHU pendant que la Haute-Normandie était la 10^e région. Depuis 2016, la région Normandie (Haute et Basse réunifiées) a l'incidence nationale la plus élevée (comprise entre 1 et 2 / 100 000 enfants de moins de 15 ans) (Institut de Veille Sanitaire 2019b)..

Ainsi, les TIAC sont généralement dues aux bactéries entériques pathogènes *Salmonella* et STEC, que ce soit au niveau national ou au niveau de la région Normandie. Mais que sont vraiment ces agents pathogènes entériques ?

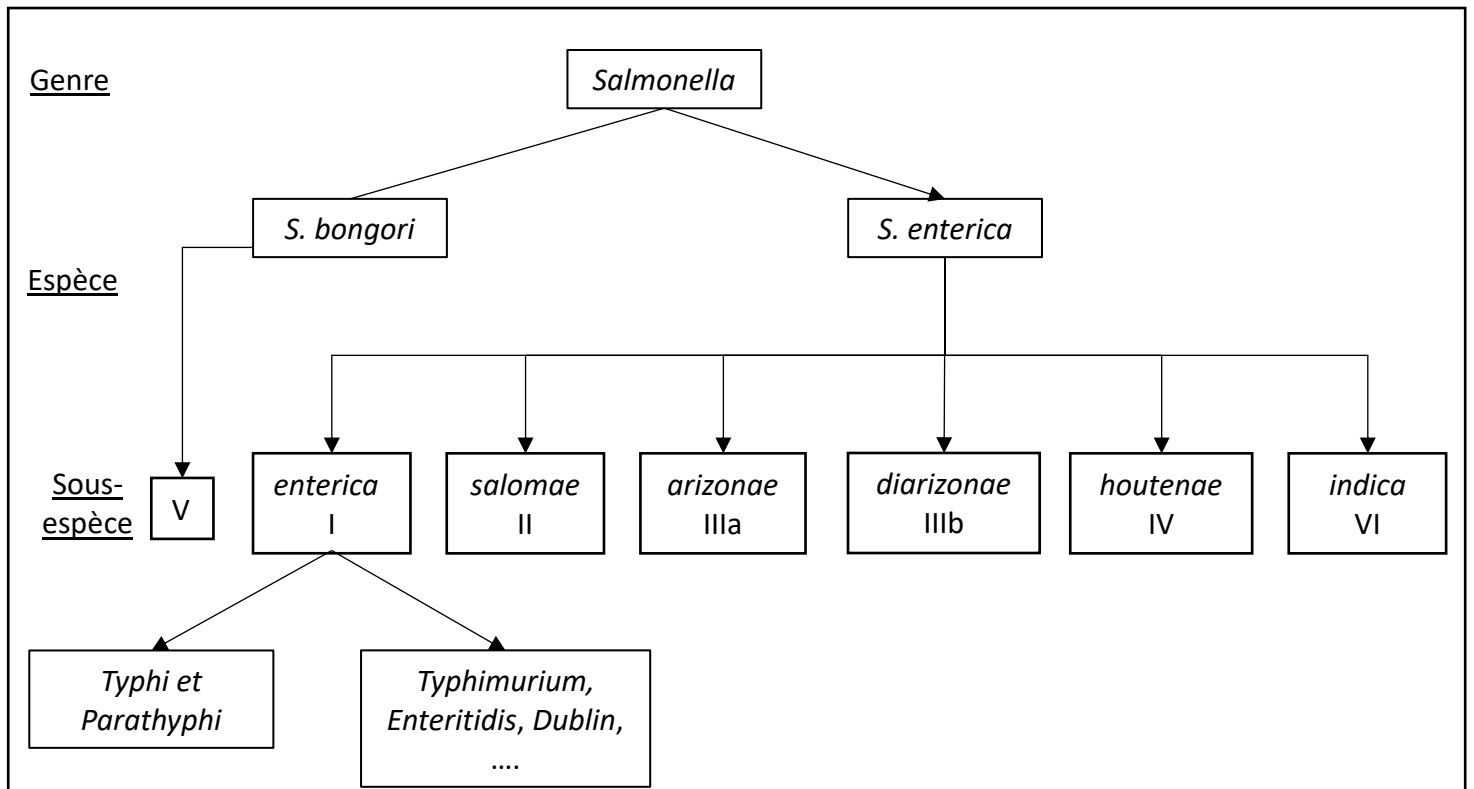


Figure 4: Hiérarchisation de *Salmonella* (d'après Hurley et al., 2014). L'espèce *Salmonella enterica* comprend 6 sous-espèces. *Salmonella enterica* subsp *enterica* comprend de nombreux sérotypes pouvant être classé en deux catégories : l'une avec les sérotypes responsables des maladies thyphiques et l'autre avec les sérotypes responsables des maladies non thyphique.

II. Les bactéries pathogènes entériques

Notre microbiote intestinal est composé de 100 000 milliards (10^{14}) de micro-organismes (bactéries, virus), soit 10 fois plus que le nombre de cellules qui nous composent. Ainsi, 1g de selles héberge 100 milliards (10^{11}) de bactéries. Au final, le poids total de toutes nos bactéries intestinales atteint le chiffre de 1,5kg chez un individu adulte. Ces micro-organismes contribuent au bon fonctionnement de l'organisme et sont associés à diverses fonctions clés comme la fonction digestive et immunitaire.

Cependant, parfois, des micro-organismes pathogènes, comme *Salmonella* ou les STEC, peuvent venir coloniser ce système pourtant très sélectif (beaucoup de flores endogènes en plus du pH acide de l'estomac qu'il faut passer). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'approximativement 1,9 billions de personnes sont victimes de maladies, dans le monde, chaque année et environ 1/3 de ces infections sont transmises par la nourriture. Cependant, les pays en développement sont plus touchés que les pays développés, où les conditions d'hygiène sont moins propices au développement bactérien. Parmi les micro-organismes impliqués dans ces maladies, on retrouve les norovirus dans 685 millions de cas, *E.coli* entérotoxigénique (ETEC⁴) avec 241 millions de cas, *Shigella spp* pour 190 millions, *Giardia spp* dans 183 millions des cas et *Salmonella spp* avec 180 millions de cas. Cependant, un nombre important de décès (41% de toutes les morts associées à une maladie diarrhéique dans le monde) peut être attribué à *Salmonella spp* (Besser 2018). Bien que les norovirus soient les principaux micro-organismes incriminés dans les TIAC, il est difficile, lorsqu'ils sont détectés (par PCR), de prouver qu'ils sont infectieux et donc, bien pathogènes.

Nous allons nous intéresser de plus près aux *E. coli* STEC entérohémorragiques (EHEC⁵), 2^e micro-organisme le plus impliqué les TIAC, ainsi qu'à *Salmonella*.

⁴ ETEC : Enterotoxigenic *E. coli*

⁵ EHEC : Enterohaemorrhagic *E. coli*

1. Salmonella

a. Généralités

Les organismes appartenant au genre *Salmonella* sont des bacilles flagellés à Gram négatif aérobies-anaérobies facultatifs. Ils appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Salmonella* comprend 2 espèces : *S. bongori* et *S. enterica* (Figure 4). Cette dernière est subdivisée en 6 sous-espèces, elles-mêmes différenciées en sérotypes. Le genre *Salmonella* est ainsi composé d'environ 2600 sérotypes différents pouvant être désignés par une formule antigénique se basant sur les antigènes capsulaires (Vi), somatiques (O) et flagellaires (H) (Brenner *et al.* 2000; Hurley *et al.* 2014; Ibrahim and Morin 2018).

Approximativement 99% des *Salmonella* causant des infections humaines appartiennent à l'espèce *Salmonella enterica* subsp *enterica* (Kurtz *et al.* 2017). Parmi les *Salmonella enterica* subsp *enterica* se trouvent différents sérotypes (Figure 4), dont 2 deux, *Typhi* et *Paratyphi*, sont responsables des salmonelloses typhoïdes, les autres étant plutôt associées à des salmonelloses dites non typhoïdes

b. Pathologies associées

Les trois principales maladies causées par *Salmonella* chez l'homme sont les salmonelloses non typhoïdes, invasives ou non, et les salmonelloses typhoïdes (Kurtz *et al.* 2017).

Les salmonelloses non typhoïdes (NTS⁶) réfèrent à toutes les maladies causées aux hommes par tous les sérotypes de *Salmonella enterica* subsp *enterica* sauf *Typhi* et *Paratyphi*. Elles ont lieu après ingestion de plus de 5000 bactéries présentes dans de la nourriture contaminée, avec des symptômes apparaissant 6 à 72h après consommation. Le début des symptômes est marqué par une forte fièvre, des douleurs abdominales et diarrhées avec ou non du sang, quelques nausées et vomissements. Généralement, ces gastro-entérites se

⁶ NTS : Non-typhoidal salmonellosis

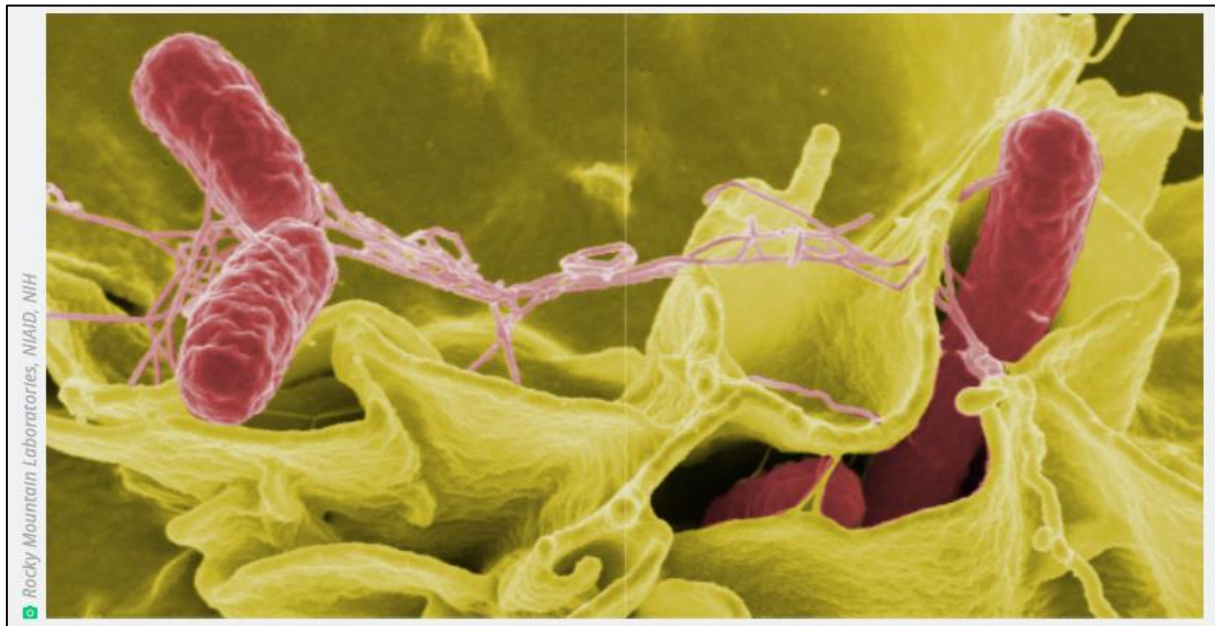


Figure 5 : Image de Microscopie électronique à balayage avec des couleurs améliorées montrant des cellules humaines cultivées envahies par Salmonella Typhimurium (rouge) (Winter et al, 2010).

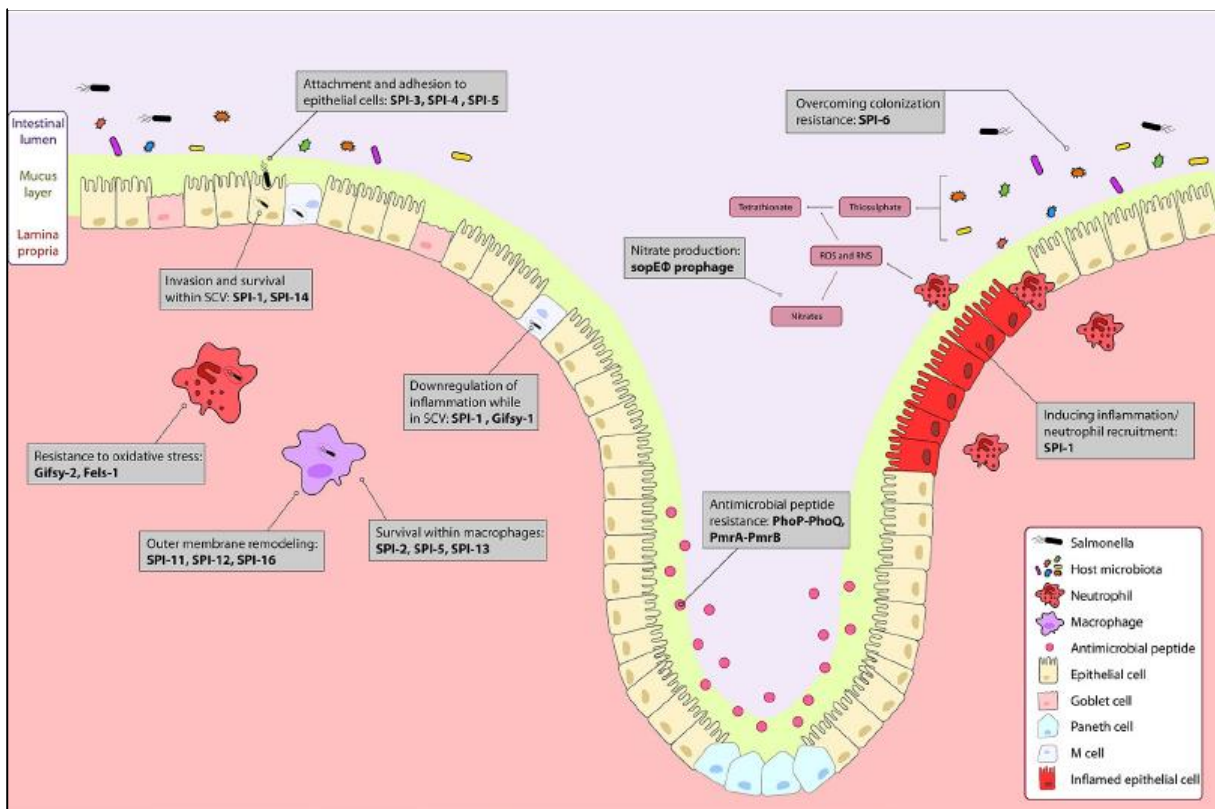


Figure 6 : Mécanismes d'infection de Salmonella dans l'épithélium intestinal (Ilyas et al. 2017).

A gauche du schéma, Salmonella arrive à pénétrer dans les cellules épithéliales et passer dans la lamina propria. Elle est alors phagocytée par un macrophage où elle va pouvoir survivre et se multiplier. Les SP sont les différents îlots de pathogénicité que la souche utilise pour survivre). A droite du schéma, la présence de cellules épithéliales inflammées par la présence des Salmonella met en place les mécanismes de défense recrutant des neutrophiles.

résolvent d'elles-mêmes en 5 – 7 jours sans besoin de traitements (Coburn *et al.* 2007). En moyenne, les sérotypes non typhoïdes persistent dans le tractus intestinal de 6 semaines à 3 mois (selon le sérotype) et 1 personne sur 1000 peut continuer à excréter *Salmonella* dans ses fèces sur des périodes excédant 1 an (Kurtz *et al.* 2017).

Les NTS peuvent avoir un caractère invasif, notamment chez des sujets plus faibles, comme les personnes immuno-déprimées, les jeunes enfants ou les personnes âgées. On parle alors de iNTS⁷ qui sont généralement causées par les sérotypes *S. Thyphimurium* et *S. Enteridis*. Cependant, d'autres sérotypes comme *Choleraesuis* et *Dublin* peuvent également être mis en cause (Fang and Fierer 1991; Jean *et al.* 2006; Aubry and Gaüzère 2018).

Les fièvres typhoïdes sont provoquées par l'infection de *S. Typhi* et les fièvres paratyphoïdes par *S. Paratyphi*. 21 millions de nouveaux cas chaque année de fièvres typhoïdes sont recensés dans le monde, conduisant à une estimation de 150 000 décès. Elles sont endémiques dans les pays en développement, la majorité des cas se produisant en Asie du Sud et en Afrique subsaharienne. Après une incubation de 1 – 2 semaines, une forte fièvre survient, accompagnée de diarrhée ou constipation, et d'une torpeur. La fréquence des signes cliniques est variable et rend le diagnostic clinique difficile. 1 à 4% des malades sont porteurs asymptomatiques, continuant d'héberger *S. Typhi* pendant des mois ou des années dans l'intestin ou la vésicule biliaire (Aubry and Gaüzère 2018). Les fièvres typhoïdes sont immédiatement traitées avec des antibiotiques à cause de la nature systémique de l'infection. Mais dès les années 1990, les médecins ont abandonné les antibiotiques de 1^e génération (comme le chloramphénicol, l'ampicilline) du fait de l'émergence d'une résistance généralisée parmi plusieurs sérotypes de *S. enterica* subsp *enterica* (Qamar *et al.* 2014). Les fluoroquinolones (comme la ciprofloxacine) sont ensuite devenues les traitements usuels. Cependant, les résistances à cette classe d'antibiotiques augmentent et la 3^e génération de céphalosporines devient aujourd'hui l'un des traitements préconisés pour les fièvres typhoïdes. Actuellement, il existe également 3 vaccins homologués contre *S. Typhi*. Le premier vaccin, visant à tuer les bactéries, n'a pas longtemps été fabriqué du fait d'un haut taux de réactogénicité. Le deuxième est un vaccin vivant atténué (Ty21a) qui, après plusieurs années

⁷ iNTS : Invasive non-typhoidal salmonellosis

d'utilisation, a été reconnu pour être bien toléré et non pathogène pour l'homme, mais avec une efficacité modérée (autour de 50%). Il est de plus non autorisé pour les enfants de moins de 6 ans (population qui est la plus susceptible de développer l'infection). Enfin, le troisième vaccin visant les polysaccharides capsulaires (Vi) bien que bien toléré et efficace à 60%, présente plusieurs limitations. La première est que la vaccination se fait par voie parentérale, ce qui nécessite une formation spécialisée qui le rend moins utile dans les pays en développement. Deuxièmement, ce vaccin ne génère pas de mémoire immunologique puissante ce qui le rend peu efficace chez les enfants de moins de 18 mois dont le système immunitaire est encore immature (Anwar *et al.* 2014; Kurtz *et al.* 2017).

c. Mécanisme de colonisation

Une fois ingérée, *Salmonella* colonise l'iléon terminal et le colon (Figure 5). Sa mobilité et ses systèmes de sécrétion de type III (T3SS⁸) travaillent ensemble pour permettre à une fraction de la population d'envahir les cellules épithéliales intestinales. Agissant comme une seringue moléculaire, le premier système de sécrétion T3SS-1 injecte des protéines effecteurs (Thiennimitr *et al.* 2012) qui sont codées par des îlots de pathogénicité (SPI⁹-1 et SPI-2) (Figure 6). Ces îlots, dont il est question plus loin, acquis historiquement par des événements de transferts horizontaux, incluent des clusters de gènes codant des mécanismes par lesquels *Salmonella* agit comme un pathogène virulent. Ces îlots sont localisés sur le chromosome bactérien ou sur un plasmide. Cependant, tous les sérotypes ne les possèdent pas. Aujourd'hui, chez *Salmonella*, 23 SPI ont été décrits bien que les fonctions des gènes contenus dans ces îlots n'aient pas encore été complètement élucidées (Hurley *et al.* 2014). Les protéines effectrices codées par les îlots de pathogénicité et injectées *via* le T3SS-1 vont induire des altérations dans le cytosquelette d'actine permettant d'internaliser *Salmonella*. Après leur entrée dans les cellules de la paroi intestinale, les bactéries survivent à l'acidification dans des vacuoles appelées SCV¹⁰ en acidifiant à leur tour leur cytoplasme (Chakraborty *et al.* 2015; Ilyas *et al.* 2017) (Figure 6). Les bactéries arrivent ensuite à accéder à la *lumina propria* (tissu conjonctif – Figure 6) où elles sont internalisées dans les macrophages

⁸ T3SS : Type 3 secretion system

⁹ SPI : *Salmonella* pathogenicity island

¹⁰ SCV : *Salmonella* containing vacuole

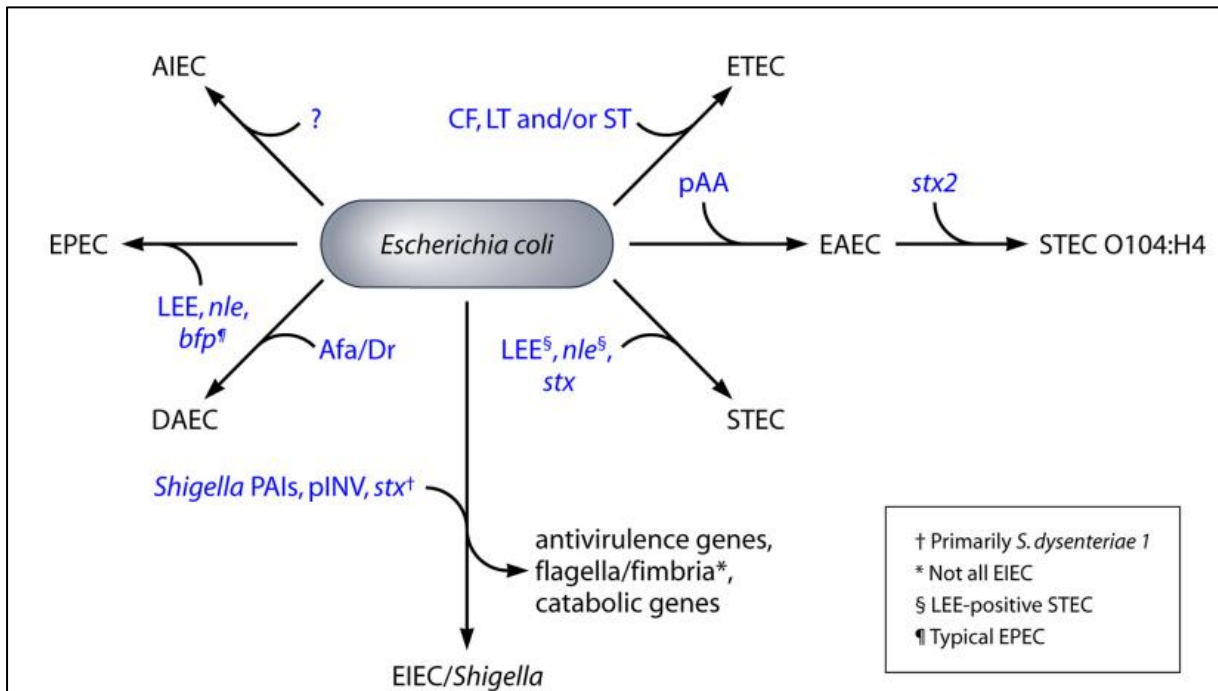


Figure 7 : Acquisition et perte de gènes menant aux différents pathotypes de *E. coli* (Croxen et al, 2013)

ETEC : *E. coli* entérotoxigénique, EAEC : *E. coli* entéroaggrégative, STEC : *E. coli* productrice de shiga-Toxine, EIEC : *E. coli* entéroinvasive, DAEC : *E. coli* à adhérence diffuse, EPEC : *E. coli* entéro-pathogénique.

Bfp : « bundle-forming pilus gene », LEE : « locus of enterocyte effacement », Afa/Dr : fimbriae, stx : gènes des shiga-toxines, pAA et pINV : plasmides, CF : facteurs de colonisation, LT/ST : entérotoxines

dans lesquels elles vont pouvoir se multiplier, voire même rejoindre les ganglions mésentériques (Thiennimitr *et al.* 2012; Kurtz *et al.* 2017) (Figure 6). Dans les macrophages, *Salmonella* utilise ensuite le second système de sécrétion T3SS-2, en association avec SPI-2, codant approximativement 30 molécules effectrices, pour interférer avec la maturation endosomale et échapper à la mort lysosomale. Ces effecteurs manipulent le recrutement membranaire, le trafic, ainsi que la récolte des nutriments. Ceci apparaît essentiel pour prévenir l'élimination et établir une niche intracellulaire répliquative de *Salmonella* (Zhang *et al.* 2018a). Certains bacilles sont capables de gagner le système sanguin où ils seront éliminés par les ganglions lymphatiques. Cependant, cette lyse entraîne la libération d'une endotoxine qui va se fixer sur les terminaisons nerveuses du système neurovégétatif abdominal, créant des lésions intestinales qui vont ensuite être envahies par d'autres *Salmonella*.

2. Les pathotypes de *Escherichia coli*

E. coli est un bacille à Gram négatif aérobie-anaérobie facultatif (AAF) faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Son habitat principal est le tractus intestinal inférieur des animaux à sang chaud où elle fait partie des AAF dominantes, même si les bactéries anaérobies strictes sont 100 à 1000 fois plus nombreuses (Berg 1996).

Bien que la plupart des *E.coli* soient des souches commensales non pathogènes, et même bénéfiques pour leur hôte, il existe certains pathotypes responsables de maladies humaines provoquant plus de 2 millions de morts chaque année dans le monde (Kaper *et al.* 2004)

a. Généralités et pathologies associées

Il existe 6 pathotypes intestinaux bien décrits : (1) les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), (2) *E. coli* entéro-pathogéniques (EPEC), (3) *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), (4) *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC), (5) les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) et (6) les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC). Ces pathotypes de *E.coli* sont caractérisés par des antigènes O (chaîne latérale O des lipopolysaccharides) et H (flagellaires) communs qui vont définir des « sérogroupes » (antigènes O seulement) ou « sérotypes » (antigènes O et H) (Nataro and Kaper 1998). *E. coli* est devenu pathogène par l'acquisition de certains gènes portés par des éléments génétiques mobiles ou transférables, tels que des transposons, plasmides ou phages (qui seront décrits

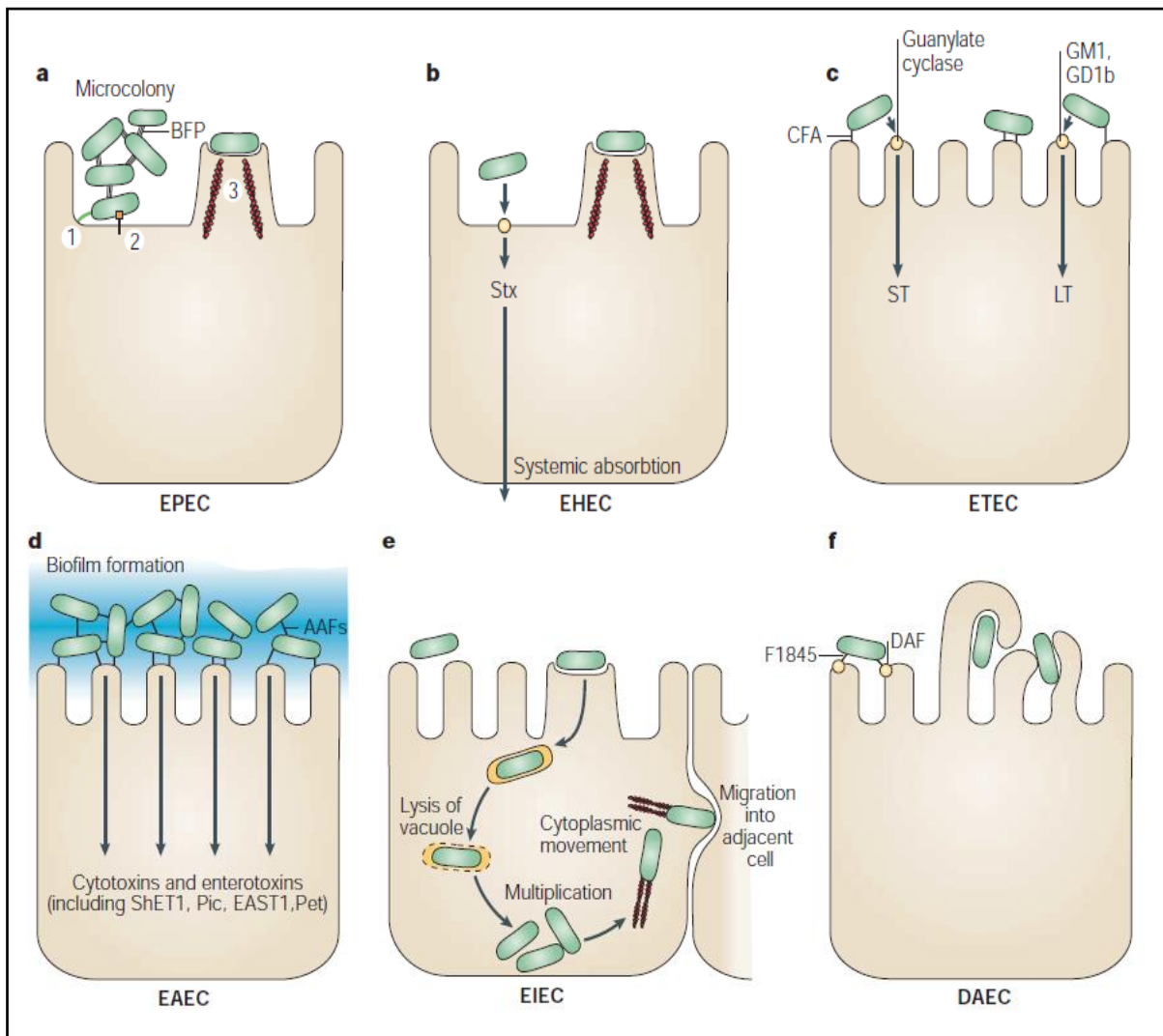


Figure 8: Schéma de pathogénèse des *E. coli* pathogènes selon leur pathotypes (Kaper et al. 2004).

a) Les EPEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle, détruisent les microvillosités, induisant la lésion A/E (1. Adhésion initiale, 2. Translocation de protéines par une sécrétion de type III, 3. Formation de piédestal).

b) Les EHEC induisent la lésion A/E dans le côlon et libère les shiga-toxines.

c) Les ETEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle sécrètent des entérotoxines thermolabiles (LT) et / ou thermostables (ST).

d) Les EAEC adhèrent aux épithéliums intestinaux en formant un épais biofilm sécrètent des entérotoxines et des cytotoxines.

e) les EIEC envahissent la cellule épithéliale du côlon, lysent les phagosomes et se déplacent à travers la cellule en formant des microfilaments d'actine. Les bactéries peuvent se déplacer latéralement dans l'épithélium en se propageant directement d'une cellule à l'autre.

f) Les DAEC induisent un effet de transduction de signal caractéristique dans les entérocytes de l'intestin grêle qui se manifeste par la croissance de longues projections cellulaires ressemblant à des doigts, qui enveloppent la bactérie.

AAF: aggregative adherence fimbriae; BFP: bundle-forming pilus; CFA: colonization factor antigen; DAF: decay-accelerating factor; EAST1: enteroaggregative *E. coli* ST1; LT: heat-labile enterotoxin; ShET1: Shigella enterotoxin 1; ST: heat-stable enterotoxin..

plus loin). Par exemple, les *E. coli* productrices de Shiga-toxine (STEC) seraient apparues par l'acquisition de gènes codant les shiga-toxines *via* un bactériophage (Figure 7) (Croxen *et al.*, 2013).

Trois syndromes cliniques généraux peuvent résulter d'une infection par l'un des pathotypes de *E. coli* : les maladies entériques / diarrhéiques, les infections du tractus urinaires (UTI) et les septicémies / méningites.

Les EHEC (sérotypes STEC pathogènes) sont généralement associées à des colites hémorragiques et/ou SHU¹¹. Le premier symptôme est une diarrhée accompagnée de fièvre, de crampes abdominales et de nausées. Après 5 jours, les diarrhées deviennent sanglantes dans la majorité des cas.

b. Mécanismes de colonisation

Les pathotypes de *E. coli* utilisent un schéma de pathogénèse en plusieurs étapes qui consistent en une colonisation d'un site muqueux, une évasion des défenses de l'hôte, une multiplication et des lésions de l'hôte (Kaper *et al.* 2004).

Pour infecter leur cible cellulaire, les *E. coli* pathogènes possèdent des facteurs d'adhérence spécifiques (adhésines) qui leur permettent de coloniser des sites inhabités habituellement par *E. coli*. Le plus souvent, ces adhésines sont des *fimbriae* (structure en forme de tubes creux de 5 – 10 nm de diamètre) ou des *curli* (structures de 2 à 4 nm longues et raides, ou bouclées et flexibles) (Cassels and Wolf 1995), mais elles peuvent inclure des protéines de la membrane externe telle que l'intimine. Certaines de ces structures de surface déclenchent, dans les cellules intestinales, des voies de transduction du signal ou des réarrangements cytosquelettiques pouvant mener à la maladie. De plus, certains pathotypes, comme les EHEC et ETEC, produisent des entérotoxines qui vont entraîner des modifications dans les transmissions de signaux et la synthèse des protéines des cellules infectées (Sears and Kaper 1996). Selon le pathotype, les méthodes de colonisation de la cellule intestinale ne seront pas les mêmes (Kaper *et al.* 2004) (Figure 8).

¹¹ SHU : syndrome hémolytique et urémique

c. Les E.coli productrices de Shiga-toxines (STEC)

Les sérotypes STEC sont des souches de *E. coli* qui produisent au moins un membre d'une classe des puissantes cytotoxines que sont les shiga-toxines, appelées ainsi pour leur ressemblance avec les toxines produites par *Shigella dysenteriae*. Si toutes les STEC ne sont pas pathogènes pour l'homme, un sous-groupe de souches dénommées *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables des infections humaines les plus graves comme les SHU.

i. Les réservoirs

Les ruminants, en particulier les bovins, constituent un vaste réservoir à STEC et notamment à EHEC, leurs fèces en hébergeant plus que les autres animaux à sang chaud. Une proportion d'animaux portant des EHEC, appelés « super-excréteurs », excrètent plus de EHEC que les autres. Bien que ces animaux représentent un faible ratio du bétail, il a été estimé qu'ils pouvaient être responsables d'au moins 95% de toutes les EHEC excrétées (Omisakin *et al.* 2003; Chase-Topping *et al.* 2007). Les STEC libérés dans l'environnement *via* les fèces des animaux, peuvent contaminer des produits alimentaires issus des bovins comme la viande ou encore le lait. Ils peuvent aussi contaminer l'eau, susceptible d'entrer ensuite dans la recette de boissons non pasteurisées ou servir pour arroser les légumes (Armstrong *et al.* 1996). Le fumier peut contenir des STEC viables durant plus de 7 semaines (Wang *et al.* 1996) ce qui augmente le risque de dissémination à travers le lessivage des sols près des fermes.

Plus de 435 sérotypes de STEC ont été collectés chez les bovins. Chez l'Homme, plus de 470 sérotypes ont été isolés d'individus malades. La plupart de ces sérotypes existent également chez les bovins (Beutin *et al.* 1993; Blanco *et al.* 2004). Malgré ce nombre, moins de 10 groupes O sont responsables de la majorité des cas. Dans beaucoup de pays (comme aux Etats-Unis ou en Chine), O157:H7 est le sérotype associé au plus grand nombre de maladies et de TIAC. En raison de l'occurrence de ce sérotype, il est courant de considérer les sérotypes de STEC dans 2 catégories principales : les O157 et les non-O157 (Gyles 2007). Le sérotype O157:H7 est responsable de 26% des 132 infections à STEC au Danemark (chiffre proche des résultats obtenus en Allemagne selon Beutin *et al.*, 2004) et 68% des STEC isolées appartenaient à 8 groupes O (O157, O103, O146, O26, O117, O145, O128 et O111 par ordre d'occurrence) (Nielsen *et al.* 2006).

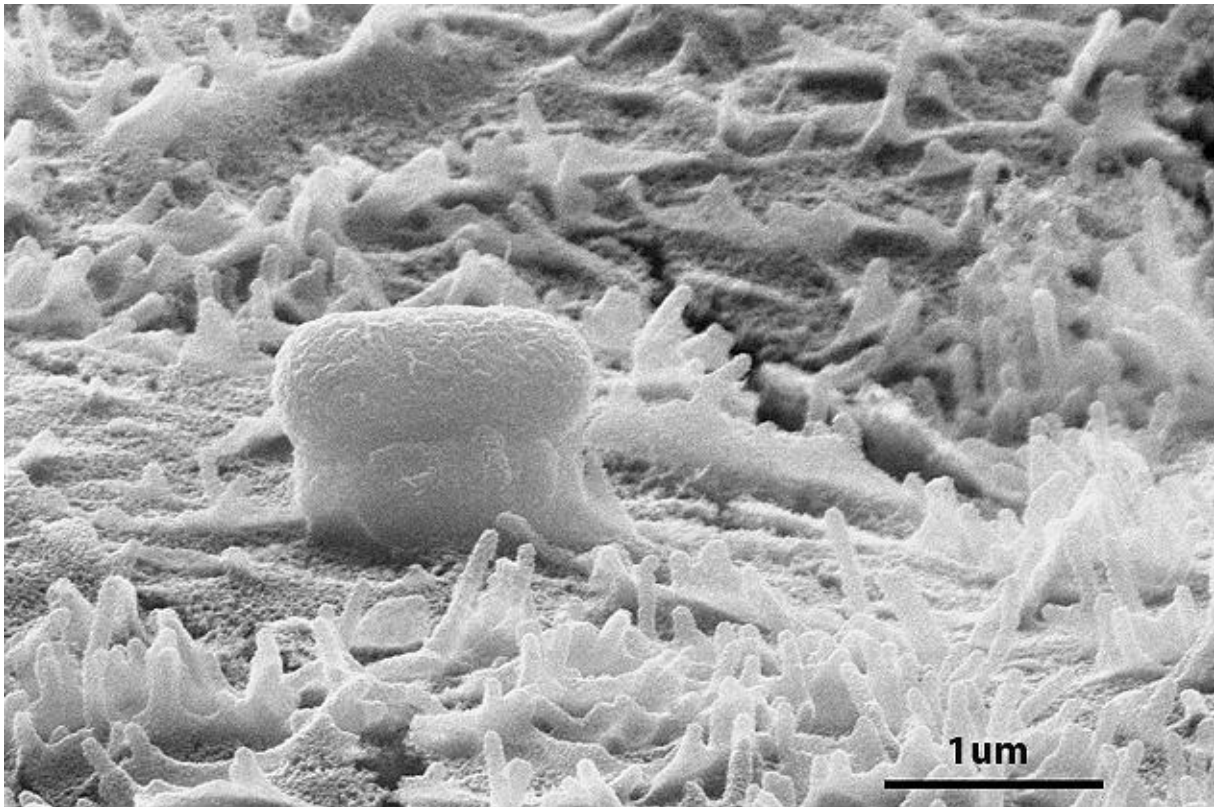


Figure 9: Image au microscope électronique à balayage du piedestal formé par une *E. coli* entérohémorragique dans le gros intestin humain. (Photo Ken Campellone / UConn)

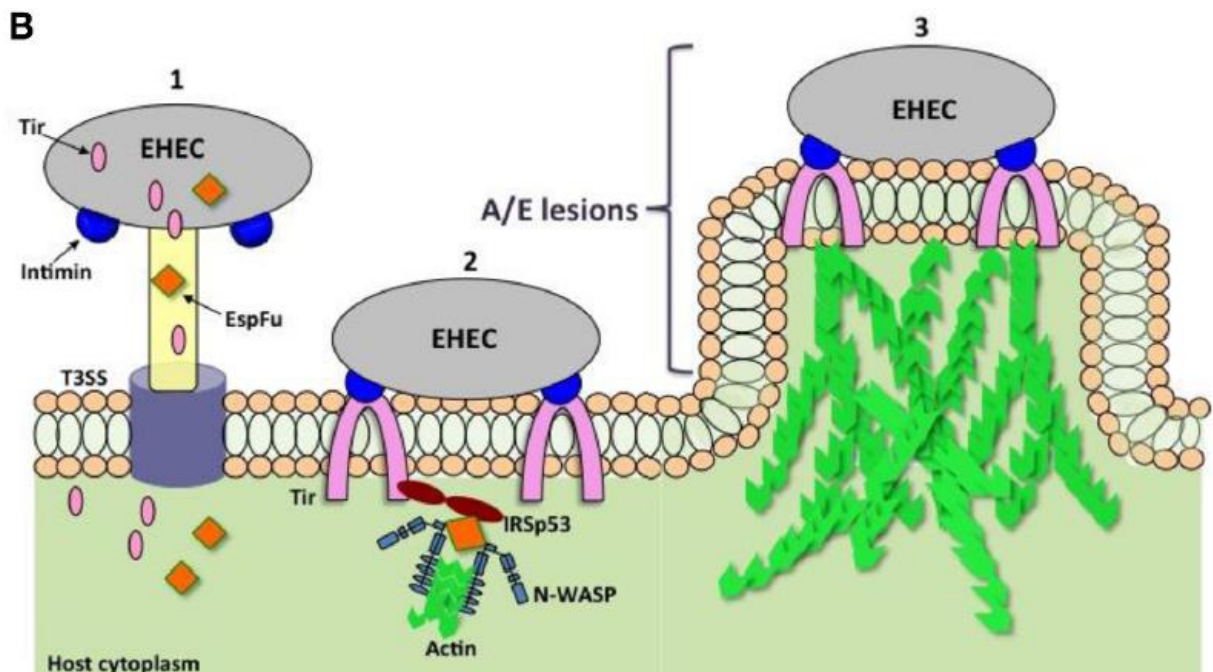


Figure 10: Schéma de la formation de lésions d'attachement et effacement (A/E) (Sperandio and Nguyen, 2012)
 EHEC injecte des protéines effectrices telles que Tir et EspFu dans le cytoplasme de l'hôte par le biais du T3SS (1). Tir se localise au niveau de la membrane de l'hôte et se lie à l'intimine (2) pour modifier le cytosquelette et la polymérisation de l'actine (3).

ii. Pathologies associées

L'homme est infecté par les EHEC lors d'ingestions d'aliments ou d'eaux contaminés, mais aussi par contact direct avec les animaux, ce qui peut entraîner des cas sporadiques de maladies ou des TIAC pouvant toucher plusieurs milliers de personnes. Le fait que les EHEC peuvent, encore plus que *Salmonella*, toucher rapidement un grand nombre de personnes est liée à sa DMI faible (< 100 UFC) et à une contamination inter-humaine possible (les EHEC font d'ailleurs partie des pathogènes de classe 3).

L'infection peut n'entraîner aucune maladie, ou des diarrhées aqueuses ou sanglantes, ou encore des SHU caractérisés par une insuffisance rénale aigüe, une anémie hémolytique, une microangiopathie¹² et une thrombocytopénie¹³. Les SHU se développent chez 5 à 10% des personnes infectées par O157:H7 et peuvent être accompagnées de séquelles à long terme (Griffin and Tauxe 1991; Institut de Veille Sanitaire 2019b)

iii. Mécanismes de colonisation

L'infection implique une colonisation de l'intestin et des dommages dus aux toxines. La colonisation est le processus par lequel les EHEC surmontent les mécanismes de défense de l'hôte, s'imposent et s'établissent dans l'intestin. L'adhésion aux cellules épithéliales intestinales est une caractéristique précoce de l'infection. Elle est associée à l'îlot de pathogénicité LEE¹⁴ décrit plus loin, qui possède de nombreux gènes notamment le gène *eae*, codant pour l'intimine, facteur d'adhésion. Les EHEC dits « positifs à *eae* » peuvent former une lésion d'attachement et d'effacement (A/E). La lésion A/E est caractérisée par la destruction des microvillosités, une adhésion intime de la bactérie à la surface de la cellule-hôte et une accumulation d'actine polymérisée sous le site d'attachement bactérien formant un piédestal pour une bactérie individuelle (Nataro and Kaper 1998; Kaper *et al.* 2004; Sperandio and Nguyen 2012) (Figures 9 et 10). Les gènes requis pour la formation de la lésion appartiennent à l'îlot de pathogénicité LEE.

Cet îlot est organisé en 5 principaux opérons, nommés de LEE1 à 5. Les produits du LEE

¹² Toute maladie atteignant les vaisseaux sanguins de petits calibres (Larousse médical)

¹³ Affection caractérisée par un nombre de plaquettes sanguines au-dessous de la normale (Larousse médical)

¹⁴ LEE : Locus of enterocyte effacement

sont, notamment, un système de sécrétion de type III (LEE1 à 3), un système de translocation de protéines (LEE4), un système d'adhérence constitué d'une protéine de la membrane externe appelée intimine (ou Eae) et de son récepteur Tir¹⁵ (LEE5), et de protéines effectrices transloquées par le système de sécrétion (Gyles 2007). Une fois injectée dans le cytoplasme de cellule-cible, la protéine Tir est dirigée vers la membrane cytoplasmique et est insérée comme une structure en épingle à cheveux, avec les extrémités N-terminale et C-terminale dans le cytoplasme, et le domaine central exposé à la surface (Kenny *et al.* 1997). Ce domaine interagit avec l'intimine pour former un attachement serré de la bactérie à la cellule eucaryote (Figure 10).

Le récepteur Tir, la protéine intimine, ainsi que d'autres protéines sécrétées activent un certain nombre de cascades de signalisation qui entraînent un réarrangement de l'architecture des cellules épithéliales intestinales et des modifications de la physiologie cellulaire (Gyles 2007) ce qui permet aux EHEC de coloniser la paroi intestinal.

Parallèlement à cette installation, les *E. coli* entérohémorragiques vont sécréter des shiga-toxines (Stx) dans la lumière de l'intestin. Ces toxines se lient alors aux cellules endothéliales exprimant le récepteur au GB3 (globotriaosylceramide-3), présent au niveau du tube digestif, des reins et du système nerveux central, puis pénètrent dans le cytoplasme et tuent la cellule. La lyse des cellules endothéliales intestinales permet alors la libération des toxines dans le sang, leur dissémination dans l'organisme et l'accès aux autres organes. Les bovins, qui sont les réservoirs des EHEC, n'ont les récepteurs au GB3 qu'au niveau du cerveau et des reins, ce qui fait que les shiga-toxines ne sont pas capables de se lier aux vaisseaux sanguins du tractus gastro-intestinal et de rendre l'animal malade (Pruimboom-Brees *et al.* 2000)

Initialement, deux types de Stx ont été décrits : Tout d'abord, Stx1 qui est une structure hautement conservée, identique à celle de la toxine shiga de *Shigella dysenteriae* et qui est plutôt associée à une maladie légère chez l'homme, voire sans aucun effet. Puis, Stx2 qui possède plusieurs variants nommés Stx2c, Stx2d, activables par Stx2d, Stx2e et Stx2f, qui diffèrent par leur activité biologique et leur association avec la maladie (Friedrich *et al.* 2002). Les Stx sont des protéines d'environ 70 kDa. Elles sont composées de 2 sous-unités majeures

¹⁵ Tir : Translocated intimin receptor

Mechanism of action of Shiga Toxin

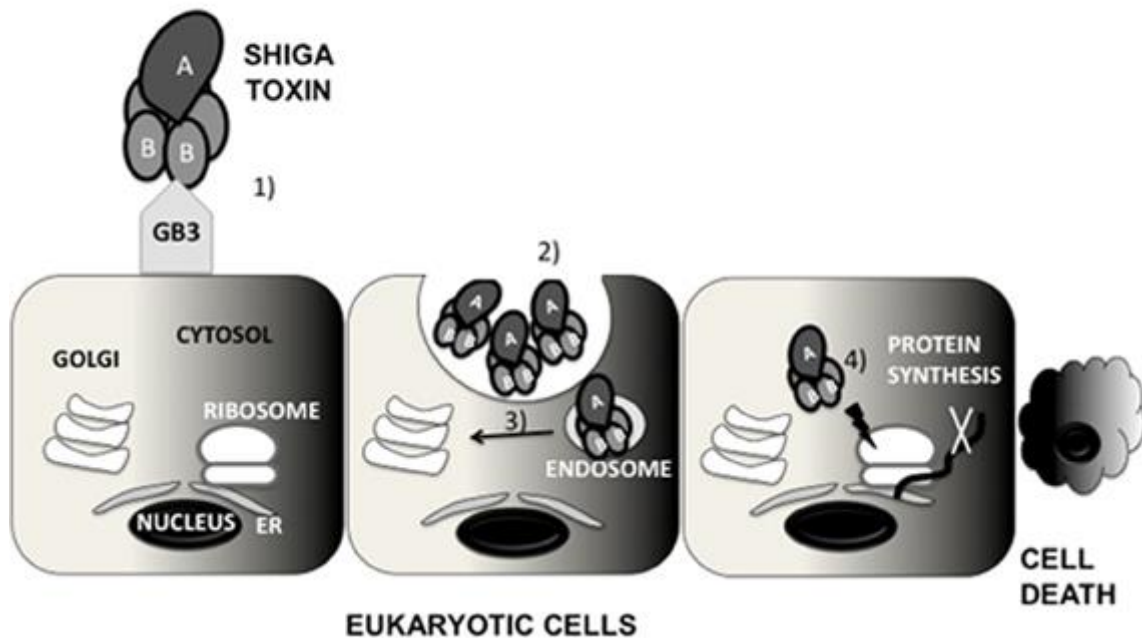


Figure 11: Mécanisme d'action cytotoxique des shiga-toxines lors de la colonisation des cellules épithéliales par une EHEC (Patcheco and Sperandio, 2012).

Les shiga-toxines sont constituées d'un pentamère de sous-unités B lié à une sous-unité A catalytique.

- 1) Les sous-unités B se lient au récepteur du globotriaosylcéramide (GB3) exprimé par certaines cellules eucaryotes.
- 2) Stx est intériorisée par endocytose.
- 3) Stx subit un transport rétrograde vers le réseau trans-golgien (TGN), puis vers le réticulum endoplasmique (RE) où la sous-unité A est divisée en deux sous-unités : A1 et A2.
- 4) La sous-unité A1 est transloquée dans le cytoplasme où elle rencontre le ribosome et l'inactive. La synthèse protéique ne se fait plus et la cellule épithéliale meurt par apoptose.

appelées A et B (Sperandio and Nguyen 2012). La sous-unité A possède une activité N-glycosylase sur une adénosine de l'ARN ribosomique 28S (Endo *et al.* 1988) ce qui inhibe la synthèse des protéines de la cellule-cible et induit l'apoptose des cellules. Elle est composée d'un fragment A1 (27.5kDa) contenant le site enzymatique et un fragment A2 de 7.5kDa (Paton and Paton 1998). La sous-unité B forme un pentamère qui se lie au récepteur GB3 et sa spécificité détermine où la shiga-toxine dirige sa physiopathologie. Après leur liaison à leur récepteur, les shiga-toxines semblent induire leur transport dans la cellule à l'aide de vésicules recouvertes de clathrine. Dans les cellules sensibles, ces vésicules sont transportées de manière rétrograde vers l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique, après quoi le fragment A entre dans le cytosol (Sandvig and van Deurs 1996). Une enzyme protéolytique de la cellule-cible attaque alors la sous-unité A et aboutit à une molécule dans laquelle les sous-unités A1 et A2 sont liées par une liaison disulfure, qui est ensuite réduite pour libérer les 2 fragments. La partie A1 est transloquée dans le cytoplasme jusqu'à la sous-unité 60S du ribosome où elle bloque la synthèse protéique, conduisant à la mort de la cellule (Patcheco and Sperandio, 2012) (Figure 11).

Nous avons vu les cas particuliers de deux pathogènes transmissibles par les aliments, *Salmonella* et les souches entérohémorragiques de *E. coli* (EHEC), mais de nombreuses autres bactéries pathogènes sont responsables de graves maladies pouvant entraîner la mort. Afin de lutter contre ces pathogènes et améliorer les conditions de santé et de vie, les molécules antibiotiques ont été développées et utilisées en masse. Elles ont également été introduites dans les élevages afin de favoriser la croissance des animaux et de prévenir l'apparition et la propagation de maladies. Cette utilisation non raisonnée depuis 70 ans a eu d'importantes répercussions sur la communauté bactérienne et aura certainement de graves conséquences sur le fonctionnement de notre système de santé, comme nous allons le voir.

B. La résistance bactérienne aux antibiotiques et ses supports génétiques

Les antibiotiques sont des molécules produites par les micro-organismes pour notamment conquérir des niches écologiques. C'est en 1928 qu'Alexander Fleming découvre le premier antibiotique : la pénicilline. A partir de ce moment, un grand nombre de molécules ont été découvertes et synthétisées, diminuant ainsi la mortalité humaine due aux infections

Tableau 1: Récapitulatif des classes d'antibiotiques et de leurs actions chez les bactéries (d'après Brötz-Oesterhelt and Brunner, 2008)

Classe	Exemple	Cible	Action	Activité <i>in vivo</i>	Spectre
<u>Synthèse du peptidoglycane</u>					
β-lactamines	Penicillines Carbapénèmes Céphalosporines	DD-transpeptidase aussi appelée protéines de liaison aux pénicillines (PLP)	Inhibe l'action des transpeptidases par analogie de structure avec le dipeptide D-Ala-D-Ala, leur substrat naturel	Bactéricide	Large (Gram+, certains -) Large (Gram+, nombreux -) Large (Gram+, certains -)
Glycopeptides	Vancomycine Téicoplanine	Lipide intermédiaire II	Inhibe l'action des DD-transglycolases par liaison sur le motif D-Ala-D-Ala de leur substrat	Bactéricide	Etroit (Gram+)
Fosfomycine		UDP-N-acétylglucosamine enolopyruvyltransférase (MUR A)	Inhibe la conversion de l'UDP-N-acétylglucosamine en acide UDP-N-acétylmuramique	Bactéricide	Large (Gram+, Gram-)
<u>Synthèse protéique</u>					
Macrolides	Erythromycine Azithromycine	ARNr 23S	Inhibe l'activité peptidyl-transférase de la sous unité 50S du ribosome	Bactériostatique	Etroit (Gram+)
Lincosamides	Clindamycine	ARNr 23S	Inhibe l'activité peptidyl-transférase de la sous unité 50S du ribosome	Bactériostatique	Etroit (Gram+)
Streptogramines	Pristinamycine	ARNr 23S	Inhibe l'activité peptidyl-transférase de la sous unité 50S du ribosome	Bactériostatique	Etroit (Gram+)
Phénicolés	Chloramphénicol	ARNr 23S	Inhibe l'activité peptidyl-transférase de la sous unité 50S du ribosome	Bactériostatique	Large (Gram+, Gram-)
Tétracyclines	Tétracycline Doxycycline	ARNr 16S	Inhibe la liaison de l'aminooacyl ARNt au site A de la sous-unité 30S du ribosome	Bactériostatique	Large (Gram+, Gram-)
Aminosides	Gentamycine Kanamycine Streptomycine	ARNr 16S	Inhibe la liaison de l'aminooacyl ARNt au site A de la sous-unité 30S du ribosome	Bactéricide	Large (Gram+, Gram- et mycobactéries)
Acide Fusarique		Facteur d'élongation EF-G	Inhibe la sortie de l'ARNt du site E en empêchant la libération de l'EF-G-GDP du ribosome	Bactériostatique	Etroit (Gram+)
<u>Réplication de l'ADN</u>					
Quinolones	Acide Nalidixique	ADN gyrase et/ou Topoisomérase IB	Inhibe la progression de l'ADN polymérase III par la formation d'un complexe irréversible ADN-topoisomérase-antibiotique	Bactéricide	Large (Gram+, Gram-)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine				
<u>Transcription de l'ADN</u>					
Ansamycines	Rifampicine	ARN polymérase ADN dépendante	Inhibe la synthèse de la chaîne ribonucléique par fixation sur la sous-unité β de l'ARN polymérase dans le canal ARN/ADN	Bactéricide	Large (Gram+, Gram-)
<u>Métabolisme des folates</u>					
Sulfamides	Sulfaméthoxazole	Dihydroptéroate synthétase (DHPS)	Inhibe l'action de la synthétase par analogie structurale avec l'acide para-aminobenzoïque (PAB)	Bactériostatique	Large (Gram+, Gram-)
Benzyl-diaminopyrimidines	Triméthoprime	Dihydrofolate réductase (DHFR)	Inhibe l'action de la réductase par analogie structurale avec l'acide tétrahydrofolique (THF)	Bactériostatique	Large (Gram+, Gram-)

bactériennes. Leur introduction et usage en médecine vétérinaire a également permis d'améliorer la santé et la productivité animale. Hélas, des dérives ont commencé lors de l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance (interdit dans l'Union Européenne depuis 2006) et l'application du principe de précaution qui fait utiliser des antibiotiques sur tout un élevage lorsqu'un animal semble malade.

Les antibiotiques peuvent avoir deux effets différents : bactériostatique, ce qui va ralentir ou stopper la croissance bactérienne, et bactéricide, ce qui entraîne une diminution de la population bactérienne. Selon les molécules actives utilisées, les antibiotiques vont cibler différentes fonctions physiologiques de la cellule.

Cinq modes d'action principaux peuvent être cités : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, de la synthèse des folates (impliqués dans la synthèse des acides nucléiques), de la réplication, de la transcription de l'ADN et de la synthèse protéique (Tableau 1) (Kohanski *et al.* 2010).

Une majorité des antibiotiques consommés sont peu absorbés par l'organisme. C'est ainsi que 30 à 90% du composé originel est rejeté dans l'environnement. En effet, les antibiotiques étant solubles dans l'eau, jusqu'à 90% d'une dose peut être excrétée *via* les urines et jusqu'à 75% dans les fèces d'animaux (Sarmah *et al.* 2006). Il faut cependant noter que les concentrations en antibiotiques relevées dans l'environnement sont généralement très faibles, de l'ordre du pg.mL^{-1} au ng.mL^{-1} , du fait de leur inactivation rapide notamment par les UV, alors que les concentrations sélectives sont de l'ordre du $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cependant il n'est pas à exclure que, dans certains microenvironnements, il puisse y avoir une accumulation d'antibiotiques, comme les boues de STEP ou les sols argileux, ou encore au sein de biofilms bactériens (Sarmah *et al.* 2006; Gothwal and Shashidhar 2015).

L'usage généralisé des antibiotiques a créé une pression de sélection sur la communauté bactérienne chez qui des mécanismes de défense extrêmement efficaces face aux molécules toxiques sont apparus. C'est ainsi que les phénomènes d'antibiorésistance ont émergé. L'antibiorésistance est définie comme la capacité de croissance d'un micro-organisme à une concentration en antibiotique supérieure à la concentration sérique toxique pour le patient. Cette résistance est dite « naturelle » lorsqu'elle est présente chez tous les individus d'un même groupe phylogénétique (espèce, genre, ...). Cependant, de nombreuses

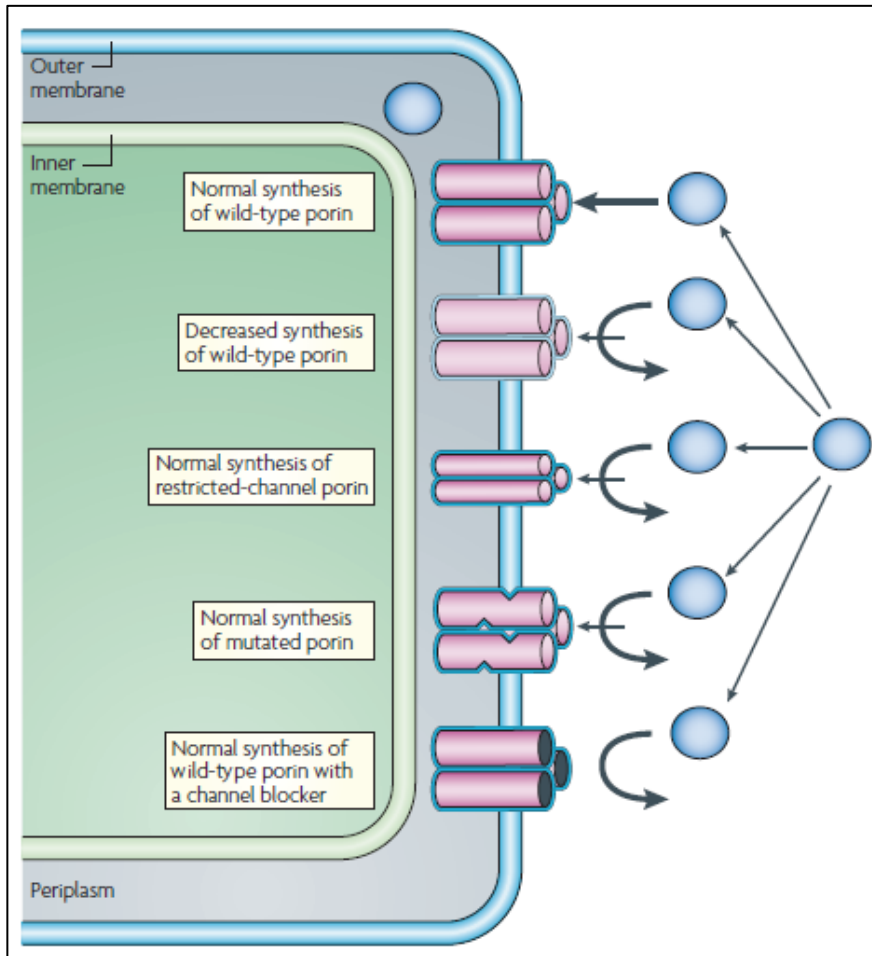


Figure 12 : les différents mécanismes de résistance associés à la modification de la porine (Paqès et al 2008).

Les molécules de β -lactame et les trimères de porine sont représentés par des cercles bleus et des cylindres roses, respectivement. L'épaisseur des flèches droites reflète le niveau de pénétration du β -lactame à travers les canaux poriques. Les flèches incurvées illustrent l'échec de l'absorption qui se produit avec: un changement (une diminution) du niveau d'expression de la porine; un échange dans le type de porine exprimé (porine à canal restreint); et mutation ou modification qui altère les propriétés fonctionnelles d'un canal de porine (porine mutée). L'effet des molécules bloquant les pores (cercles noirs) est présenté au bas de la figure.

résistances aux antibiotiques ne touchent qu'une partie du groupe et l'on parle alors de résistance « acquise », soit par mutation, soit par transfert horizontal des gènes de résistance.

I. Les mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques

Divers mécanismes, dont la nature et l'efficacité varient en fonction de la bactérie et de l'antibiotique, vont permettre aux cellules de se protéger de l'action toxique de ces molécules (jusqu'à une certaine concentration). Quatre stratégies majeures sont mises en place, la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques, la modification ou protection de leur cible et l'inactivation des molécules d'antibiotique (Walsh 2000)

1. Diminution de la concentration intracellulaire des antibiotiques

a. Perméabilité membranaire diminuée

La cible des antibiotiques est située à l'intérieur de la bactérie ou au niveau de l'enveloppe. Il est donc nécessaire que ces molécules traversent l'enveloppe pour agir. Cependant, cette pénétration peut être empêchée ou diminuée par modification de la perméabilité membranaire. Ceci affecte particulièrement les molécules hydrophiles comme les β -lactamines, tétracyclines ou certaines fluoroquinolones qui utilisent notamment les canaux de diffusion que sont les porines, pour franchir la membrane externe (Pagès *et al.* 2008).

Les porines OmpF, OmpC et PhoE chez *E.coli* sont impliquées dans ce mode de résistance. La chute de perméabilité peut être obtenue par trois processus principaux : (1) un changement du type de porine exprimé (régulation), (2) un changement du niveau d'expression (régulation) et (3) une altération de la fonction des porines (mutations spontanées) (Figure 12) (Pagès *et al.* 2008; Fernández and Hancock 2012; Kapoor *et al.* 2017). Toutefois, cette résistance est souvent faible et est généralement associée à d'autres mécanismes tels que les pompes à efflux (Nikaido 2003).

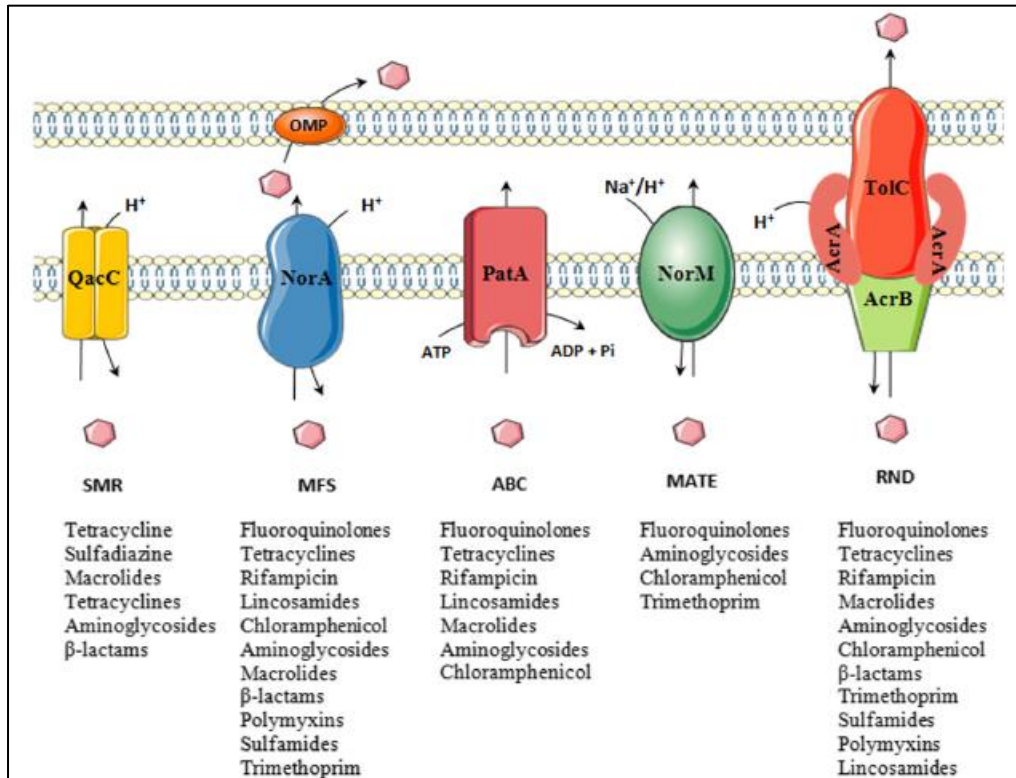


Figure 13: Les cinq grandes familles de pompes à efflux (Yılmaz and Özçengiz 2017)

b. Les pompes à efflux

Les pompes à efflux sont des protéines transmembranaires qui permettent le rejet à l'extérieur de la cellule de composés toxiques tels que les métaux lourds ou les antibiotiques. L'une des premières pompes décrites, dans les années 1980, était capable de rejeter la tétracycline du cytoplasme de *E.coli* (McMurry *et al.* 1980). Depuis lors, de nombreuses classes de pompes à efflux ont été caractérisées à la fois chez les Gram positifs et négatifs. Elles peuvent n'avoir qu'un seul substrat ou, au contraire, avoir une large spécificité (Poole 2005). Elles affectent l'efficacité d'un large éventail d'antibactériens comme les fluoroquinolones, les β -lactamines, les carbapénèmes ou les polymyxines

Comme présenté Figure 13, il existe 5 grandes familles de pompes à efflux qui sont les (1) MFS (Major Facilitator Superfamily), (2) SMR (Small Multidrug Resistance family), (3) RND (Resistance-Nodulation-cell-Division family), (4) ABC (ATP-Binding Cassette family) et (5) MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion family). Ces familles diffèrent en termes de conformations structurelles, de localisation, de zone de relargage, de source d'énergie, de gamme de substrats qu'elles peuvent expulser et de type d'organismes bactériens chez lesquels elles sont présentes (Piddock 2006; Yilmaz and Özcengiz 2017).

La famille MFS est l'un des exemples les mieux caractérisés et permet notamment la résistance aux tétracyclines, par expulsion des molécules en dehors de la cellule, grâce à l'énergie produite par l'échange de protons (force proto-motrice) (Figure 13). Les pompes SMR fonctionnent, elles aussi, avec la force proto-motrice, mais elles expulsent les molécules d'antibiotique dans le périplasme. Les pompes ABC utilisent l'énergie de l'ATP pour expulser une large gamme de molécules d'antibiotique dans le périplasme (Figure 13). Les pompes MATE utilisent des canaux à protons couplés à des canaux à sodium pour expulser notamment des fluoroquinolones, des phénicolés et des aminosides dans le périplasme. Enfin, les pompes RND fonctionnent avec des protons et peuvent transporter une large gamme de substrats en dehors de la cellule, permettant une résistance aux tétracyclines, chloramphénicol, fluoroquinolones, novobiocines et à certaines β -lactamines (Figure 13).

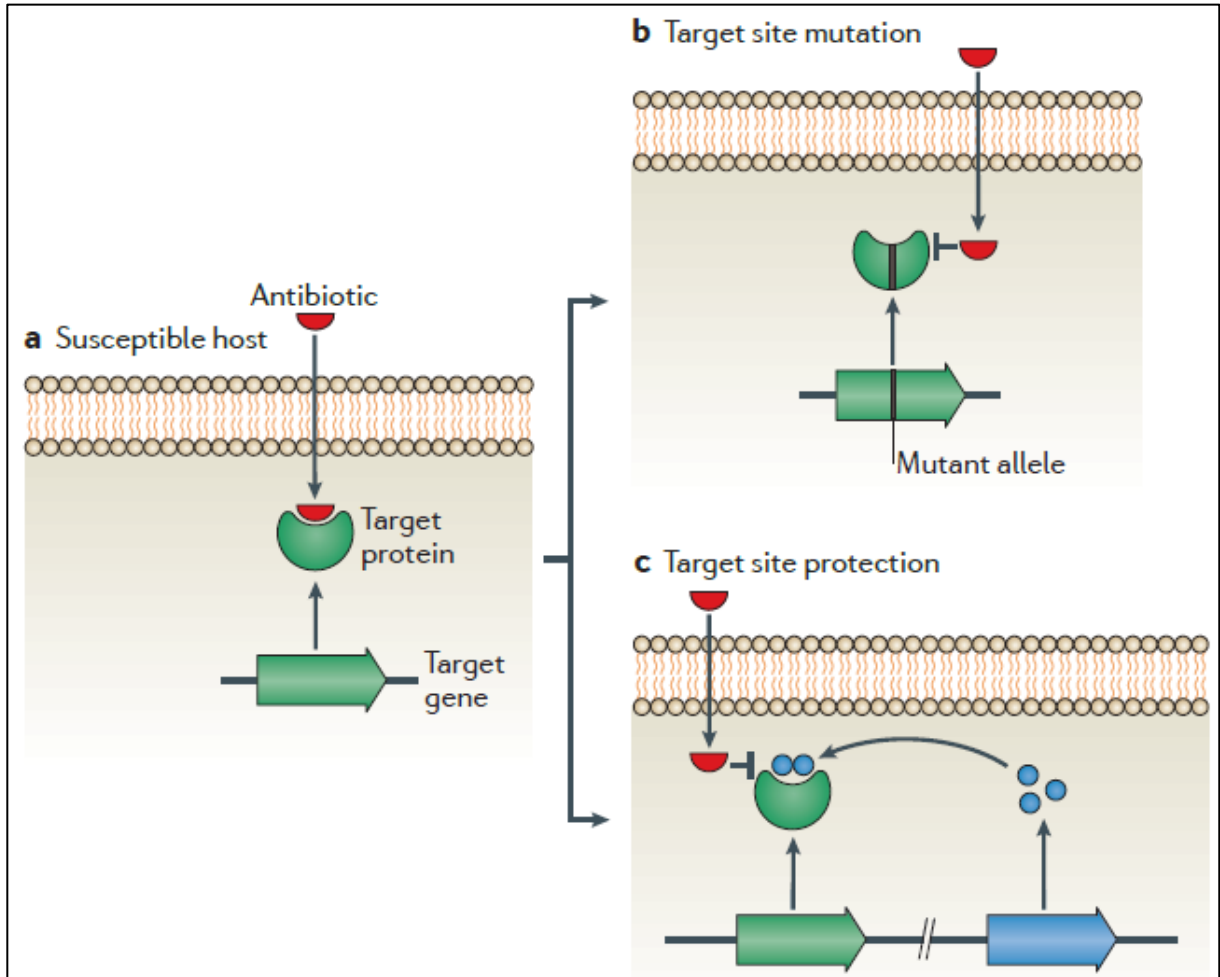


Figure 14 : Modifications des sites cibles des antibiotiques (Blair et al. 2015).

a) Interaction de l'antibiotique avec sa cible

b) Mutation du site cible

c) Modification par addition d'un groupement chimique

2. Modifications de la cible de l'antibiotique

a. Modification du site cible

Les modifications au niveau de la cible de l'antibiotique sont un mécanisme largement utilisé chez les bactéries pathogènes, car il touche à presque tous les composés antibactériens. Ces modifications peuvent consister en (1) des mutations ponctuelles dans les gènes codant les sites cibles, (2) des altérations enzymatiques du site de liaison et/ou (3) un remplacement ou contournement de la cible d'origine. Le but final est une diminution de l'affinité de l'antibiotique avec son site cible, mais sans altérer la fonction initiale de la cible qui intervient toujours dans les processus fondamentaux pour la bactérie.

i. Mutation du site cible

Parmi les résistances induites par une mutation du site cible se trouve la résistance à la rifampicine. La rifampicine bloque la transcription en inhibant l'ARN polymérase. En effet, son site de liaison est situé au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase (codée par *rpoB*) bloquant ainsi la sortie de l'ARN (Campbell *et al.* 2001). Certaines mutations ponctuelles dans le gène *rpoB*, conduisant à la substitution d'acides aminés, empêche la rifampicine de se lier à sa cible sans pour autant modifier l'activité catalytique de la polymérase (Floss and Yu 2005). Un autre exemple peut être donné avec la résistance aux fluoroquinolones, conférée par des modifications chromosomiques dans les gènes codant l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV (cibles des molécules antibactériennes) (Hooper 2002) (Figure 14).

ii. Altération enzymatique du site cible

La résistance aux macrolides peut être obtenue par méthylation du ribosome effectuée par une enzyme codée par les gènes *erm*. Ces enzymes sont capables de mono- ou diméthyliser un résidu d'adénine sur le domaine V de l'ARNr 23S de la sous-unité ribosomale 50S. Ce changement entraîne une altération de la liaison de l'antibiotique à sa cible. De plus, cela permet également une résistance aux lincosamides et streptogramines B qui ont aussi leur site de liaison au niveau de l'ARNr 23S (Leclercq 2002).

iii. Remplacement complet ou contournement du site cible

Ces stratégies consistent, pour les bactéries, à développer des « copies » remplissant des fonctions biochimiques similaires à celles de la cible d'origine, mais qui ne sont pas inhibés par la molécule antibactérienne.

Un exemple de cette stratégie est la résistance à la vancomycine, qui inhibe la synthèse du peptidoglycane. Pour ce faire, la molécule se lie à la D-Alanine-D-Alanine de la fonction pentapeptidique des précurseurs du peptidoglycane. La résistance va impliquer un groupe de gènes *van* qui codent un mécanisme biochimique permettant le remodelage de la synthèse peptidique grâce à (1) la modification du dernier D-Ala en D-lactate ou D-serine et (2) la destruction des précurseurs des extrémités « normales » D-Ala-D-Ala (Reynolds 1989; Miller *et al.* 2014).

Une autre stratégie bien décrite de contournement de cible consiste à sur-exprimer la cible dans le but de neutraliser l'antibiotique en augmentant le nombre de cibles disponibles. L'un des meilleurs exemples de ce mécanisme est le développement de la résistance au Triméthoprime-Sulfaméthoxazole (appartenant respectivement aux familles diaminopyrimidines et sulfamides). Ce médicament altère la synthèse bactérienne des purines et de certains acides aminés importants en perturbant le métabolisme des folates. La plupart des bactéries sont incapables d'incorporer du folate provenant de sources externes. La voie de synthèse du folate implique deux enzymes principales, à savoir l'acide dihydroptéroïque synthase (DHPS), qui forme du dihydrofolate à partir d'acide para-aminobenzoïque, et qui est inhibée par le sulfaméthoxazole, et la dihydrofolate reductase (DHFR), qui catalyse la formation de tétrahydrofolate dihydrofolate et qui est inhibée par le triméthoprime (Tableau 1).

Bien que la résistance aux sulfamides puisse être obtenue par plusieurs stratégies autres incluant des mutations dans les enzymes et l'acquisition de gènes externes codant pour des DHPS et DHFR moins sensibles, une stratégie de contournement « intelligente » est la surproduction de DHFR ou DHPS par le biais de mutations dans la région promotrice de l'ADN codant ces enzymes. Ces mutations entraînent une augmentation de l'expression de ces gènes et de la production d'enzymes, « écrasant » la capacité du médicament à inhiber la production

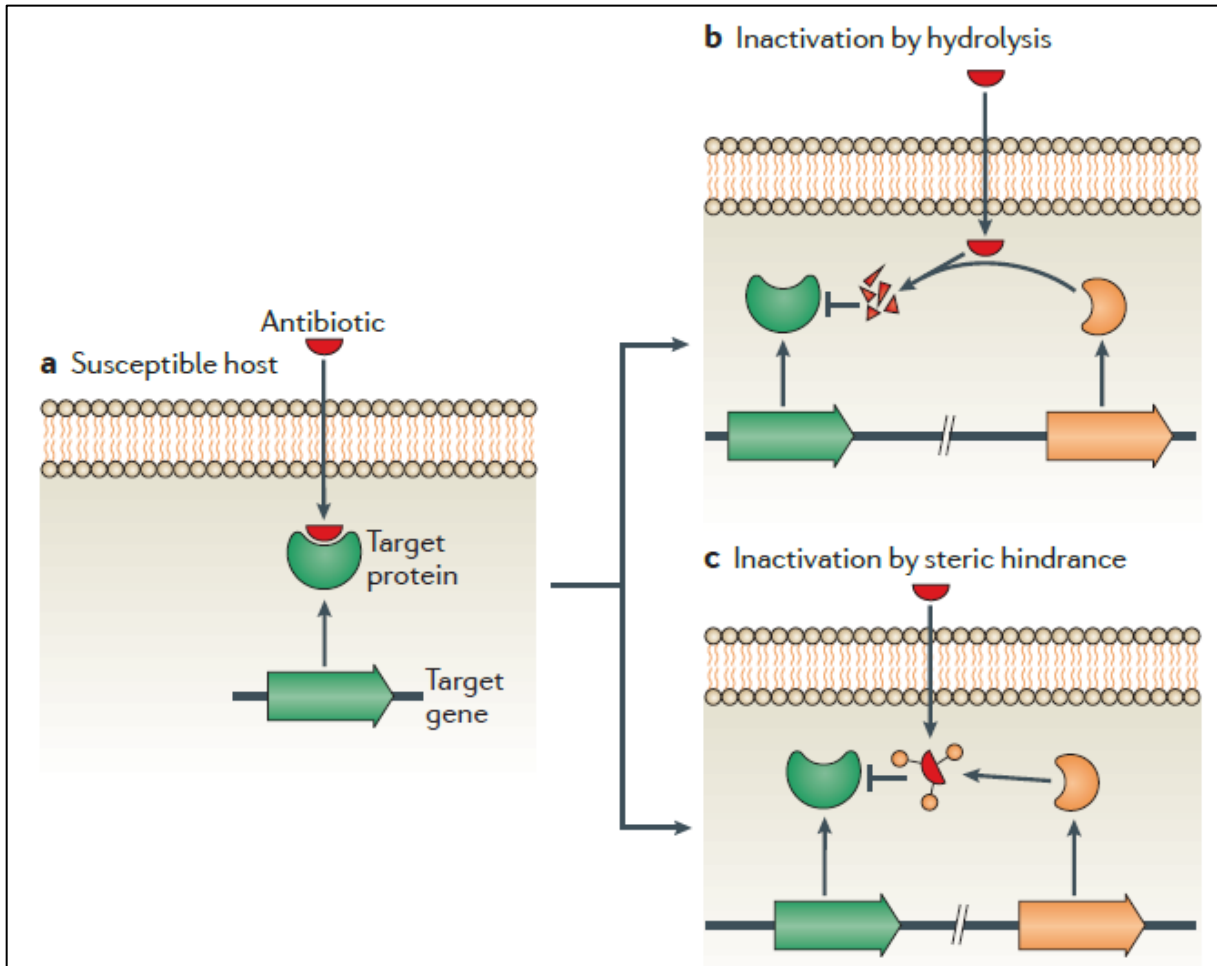


Figure 14: Inactivation des molécules antibiotiques.

- a) Interaction d'une molécule d'antibiotique avec son site cible.
- b) Destruction de l'antibiotique à l'aide d'enzymes.
- c) Altération chimiques de l'antibiotique (c) (Blair et al. 2015)

du folate et permettant la survie des bactéries (Flensburg and Sköld 1987; Eliopoulos and Huovinen 2001).

b. Protection de la cible

Le mécanisme de protection de la cible a été largement étudié dans le cadre de la résistance aux tétracyclines grâce, notamment, aux protéines Tet(M) et Tet(O) qui vont interagir et déloger la tétracycline de son site sur l'ARNr 16S. Tet(M) va venir interagir entre le domaine IV de l'ARNr 16S et le site de liaison de la tétracycline, expulsant cette dernière au passage. Cette interaction entre Tet(M) et le domaine IV modifie la conformation ribosomale, empêchant la tétracycline de venir se refixer sur son site de liaison (Dönhöfer *et al.* 2012). Tet(O), elle, entre en compétition avec la tétracycline pour le même espace ribosomal et modifie la géométrie du site de liaison de l'antibiotique déplaçant la toxine du ribosome et permettant à la synthèse protéique de reprendre (Li *et al.* 2013).

Un autre exemple de protection de la cible est la protéine de résistance aux quinolones QnR. Les quinolones agissent en se fixant sur l'ADN gyrase ou les topoisomérase ce qui inhibe la réplication. La protéine QnR agit comme un homologue de la toxine et entre en concurrence pour son site au niveau de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV. Cette interaction diminue fortement les chances de la molécule antibiotique de former un complexe stable avec l'ADN gyrase (Rodríguez-Martínez *et al.* 2011).

3. Inactivation des molécules antibiotiques

L'une des stratégies bactériennes les plus efficaces pour faire face à la présence d'antibiotiques consiste à produire des enzymes qui vont inactiver l'antibiotique en le dégradant ou en le modifiant (Figure 15).

a. Altérations chimiques de l'antibiotique

De nombreuses enzymes capables de modifier un antibiotique ont été décrites et les réactions qu'elles catalysent sont le plus souvent (1) l'acétylation (pour lutter contre les aminoglycosides, le chloramphénicol et les streptogramines), (2) la phosphorylation (dirigée contre les aminoglycosides et le chloramphénicol) et (3) l'adénylation (pour les

aminoglycosides et les lincosamides). Dans tous les cas, l'altération de la molécule est liée à un encombrement stérique qui va diminuer l'affinité de la molécule pour sa cible (Blair *et al.* 2015).

Les aminoglycosides sont particulièrement vulnérables et de nombreuses enzymes modificatrices d'aminoglycosides (AME) ont été décrites. Une nomenclature a été mise en place pour les classer selon : (1) leur activité biochimique (acétyltransférase [ACC], adényltransférase [ANT] ou phosphotransférase [APH]), (2) le site de modification (nombre entre 1 et 6 correspondant à la place du carbone sur le cycle du sucre) et une apostrophe simple ou double pour préciser si la réaction se produit sur la première ou deuxième fraction du sucre (Munita and Arias 2016).

Toutes les AME n'affectent pas les mêmes molécules. Par exemple, les APH(3'), chez les bactéries à Gram positif et négatif, modifient la kanamycine et la streptomycine. La ACC(6')-I, principalement présente chez les Gram négatifs, affectent d'autres aminoglycosides (gentamycine, amikacine). De même, au sein d'une même classe, différentes espèces bactériennes peuvent être concernées. Ainsi, les gènes codant ANT(4'), ANT(6') et ANT(9') sont hébergés chez les bactéries à Gram positif tandis que ANT(2'') et ANT(3'') sont prévalents chez les bactéries à Gram négatif (Ramirez and Tolmasky 2010).

b. Dégradation de la molécule antibiotique

Cette destruction des molécules antibiotiques est très bien illustrée par la résistance aux β -lactamines. En effet, cette résistance repose sur l'action des β -lactamases qui sont des enzymes clivant la liaison amide du cycle β -lactame. Les gènes codant ces enzymes sont appelés *bla*, suivi du nom de l'enzyme spécifique. Plus de 1000 β -lactamases ont été décrites et deux schémas de classification ont été proposés pour tenter de les regrouper : la classification d'Ambler (celle utilisée pour la suite) (Hall and Barlow 2005) et la classification de Bush-Jacoby (Bush and Jacoby 2010; Bush 2013).

Les β -lactamases de classe A (classification d'Ambler) ont un résidu de sérine dans le site catalytique. Ces enzymes comprennent un large éventail de protéines ayant des activités

Antibiotic class	Resistance type	Resistance mechanism	Common example
Aminoglycoside	Decreased uptake	Changes in outer membrane	<i>P. aeruginosa</i>
	Enzymatic modification	AGE's	Gram-negative bacteria
Beta-lactams	Altered PBP	PBP 2a	Mec A in <i>S. aureus</i> , CONS, <i>S. pneumoniae</i>
	Enzymatic degradation	Penicillinase which are classified as per ambler classification	Gram-negative bacteria
Glycopeptides	Altered target	D-alanyl-alanine is changed to D-alanyl-D-lactate	Vancomycin resistance in <i>E. faecium</i> and <i>E. faecalis</i>
Macrolides	Altered target	Methylation of ribosomal active site with reduced binding	<i>erm</i> -encoded methylases in <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , and <i>S. pyogenes</i>
	Efflux pumps	Mef type pump	<i>S. pneumoniae</i> and <i>S. pyogenes</i>
Oxazolidinones	Altered target	Mutation leading to reduced binding to active site	<i>E. faecium</i> and <i>S. aureus</i>
	Altered target	Mutation leading to reduced binding to active site(s)	Mutations in <i>gyr A</i> in enteric Gram-negative bacteria and <i>S. aureus</i>
Quinolones	Efflux	Membrane transporters	Mutations in <i>gyr A</i> and <i>par C</i> in <i>S. pneumoniae</i> . <i>Nor-A</i> in <i>S. aureus</i>
	Altered target	Production of proteins that bind to the ribosome and alter the conformation of the active site	<i>tet</i> genes encoding efflux proteins in Gram-positive and Gram-negative bacteria
Tetracyclines	Efflux	New membrane transporters	<i>tet</i> (M) and <i>tet</i> (O) in Gram-positive and Gram-negative bacteria species
	Altered target	Chloramphenicol acetyl transferase	CAT in <i>S. pneumoniae</i>
Chloramphenicol	Antibiotic inactivation	Chloramphenicol acetyl transferase	CAT in <i>S. pneumoniae</i>
	Efflux pump	New membrane transporters	<i>cml A</i> gene and <i>flo</i> gene efflux in <i>E. coli</i>
Sulfa drugs	Altered target	Mutation of genes encoding DHPS	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>

DHPS=Dihydropteroate synthase, *P. aeruginosa*=*Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*=*Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*=*Streptococcus pneumoniae*, *E. faecium*=*Enterococcus faecium*, *E. faecalis*=*Enterococcus faecalis*, *S. pyogenes*=*Streptococcus pyogenes*, *E. coli*=*Escherichia coli*, PBP=Penicillin binding protein, AGE's=Aminoglycoside modifying enzymes, CAT=Chloramphenicol acetyl transferases

Figure 16 : Tableau non exhaustif des principaux mécanismes de résistance mis en place par les bactéries selon les différentes classes d'antibiotiques (Kapoor et al. 2017)

catalytiques différentes, allant des pénicillinases (TEM-1 et SHV-1), aux ESBL¹⁶ (CTX-M) et carbapénémases (KPC) (Munita and Arias 2016).

Les enzymes de classe B sont appelées métallo- β -lactamases, car elles utilisent un ion métallique (généralement le zinc) comme cofacteur pour l'attaque nucléophile du cycle β -lactame. Il y a environ dix types de métallo-carbapénémases, mais la plupart d'entre elles appartiennent seulement à quatre familles (Munita and Arias 2016).

Enfin, les β -lactamases de classe C confèrent une résistance à toutes les pénicillines et céphalosporines. L'enzyme la plus connue est AmpC, qui est une céphalosporinase (Jacoby 2009).

Enfin les β -lactamase de classe D incluent un large éventail d'enzymes qui ont la capacité d'hydrolyser les antibiotiques et montrent une faible inhibition par l'acide clavulanique. Le premier antibiotique dont la dégradation par ces enzymes a été mise en évidence était l'oxacilline (classe des pénicillines) qui a donné son nom aux enzymes (OXA). De nombreux variants d'OXA ont été décrits, y compris des enzymes capables de dégrader des céphalosporines (OXA-11) et des carbapénèmes (OXA-23) (Munita and Arias 2016).

La Figure 16 rassemble les divers mécanismes de résistance développés par les bactéries pour lutter contre les différentes classes d'antibiotiques.

II. L'acquisition des gènes de résistances par transfert horizontal

1. Les transferts horizontaux

La circulation des gènes par transfert horizontal a un rôle primordial dans le développement et la propagation des antibiorésistances parmi les bactéries pathogènes et environnementales (Alonso *et al.* 2001; von Wintersdorff *et al.* 2016).

Les transferts horizontaux sont très fréquents et essentiels chez les procaryotes, plutôt courants chez les eucaryotes unicellulaires et rarissimes chez les organismes supérieurs (plantes). Chez les procaryotes, ils permettent l'échange de matériel génétique (plasmides ou fragments chromosomiques) entre deux bactéries d'une même génération, l'une donatrice et

¹⁶ ESBL : Extended-Spectrum Beta-Lactamase

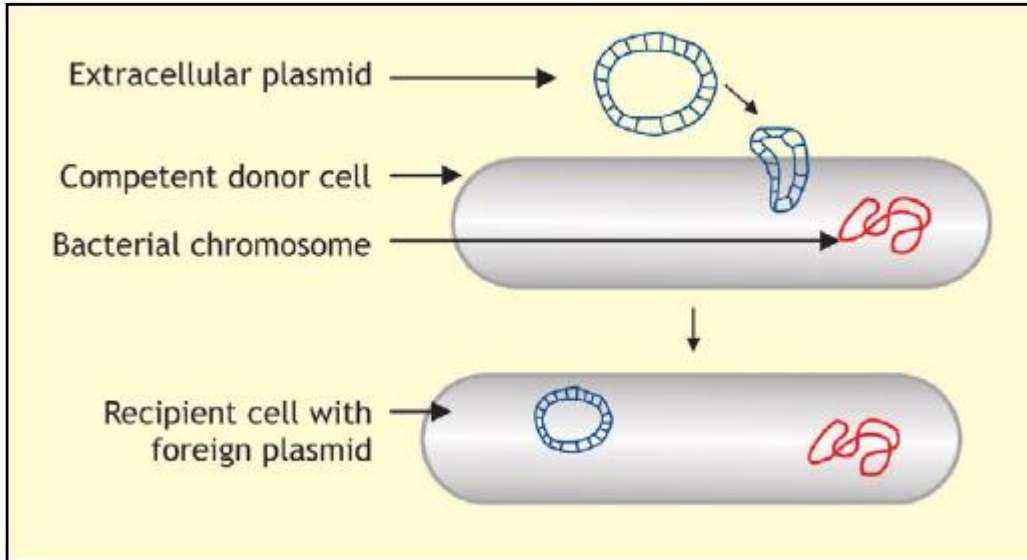


Figure 17 : Plasmide extracellulaire transféré à une cellule compétente par le processus de transformation (Banu and Prasad, 2017)

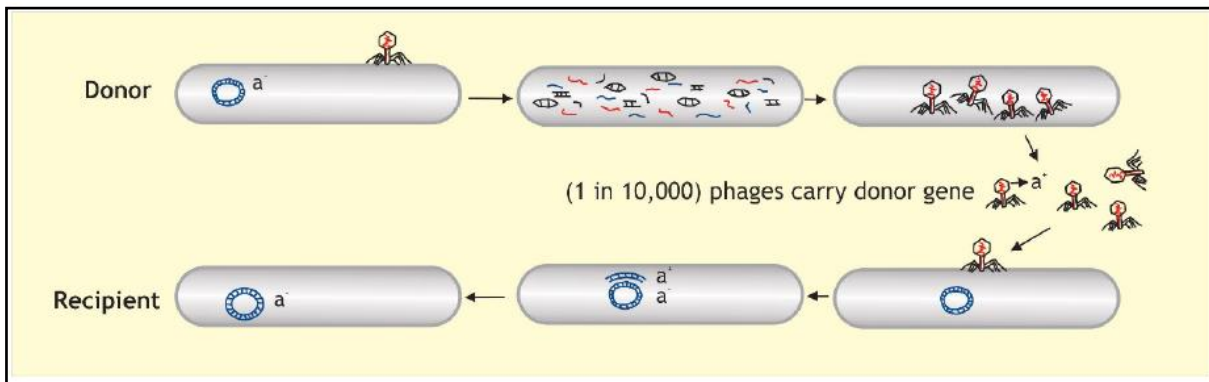


Figure 18: Transfert de gènes par transduction entre des bactériophages et une bactérie (Banu and Prasad, 2017)

l'autre réceptrice. Il existe trois mécanismes permettant ces transferts : la transformation, la transduction et la conjugaison

a. La transformation

La transformation fut le premier mécanisme mis en évidence par Frederick Griffith en 1928. Il a été montré que ce mécanisme jouait un rôle important dans la résistance aux β -lactamines de *Streptococcus pneumoniae*.

La transformation (Figure 17) permet l'acquisition d'ADN extracellulaire nu provenant de la lyse de cellules bactériennes, par une bactérie en état de compétence. Cet état de compétence est un état physiologique particulier dans lequel la bactérie va développer une perméabilité aux macromolécules d'ADN grâce à un système de sécrétion de type IV (T4SS¹⁷) (Banu and Prasad 2017). Ce système permet la sécrétion de complexes, notamment de complexes protéiques, mais aussi d'ADN, à travers l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. La compétence d'une bactérie est généralement un état transitoire, induit en réponse à des conditions environnementales particulières, sauf pour *Neisseria gonorrhoeae* chez qui cet état est constitutif (Davison 1999; Heuer and Smalla 2007).

b. La transduction

La transduction (Figure 18) est un transfert de gènes bactériens par l'intermédiaire de bactériophages transducteurs entre une bactérie infectée (donatrice) et une bactérie réceptrice. Au cours du cycle lytique, lors de l'encapsidation du génome viral, des gènes bactériens peuvent être insérés dans les capsides virales par erreur. On parle alors de transduction généralisée. Ce mode de transfert peut concerner des fragments chromosomiques ou des plasmides, à condition que leur taille soit proche de celle du génome phagique.

Il existe aussi une transduction dite spécialisée, réalisée par des phages tempérés dont le génome est capable de s'intégrer au chromosome bactérien lors de la lysogénie. En cas de stress génotoxique, le prophage s'excise et peut emporter, par erreur, des gènes bactériens adjacents au site d'intégration. Lors d'une nouvelle infection, le bactériophage va injecter dans

¹⁷ T4SS : Type 4 secretion system

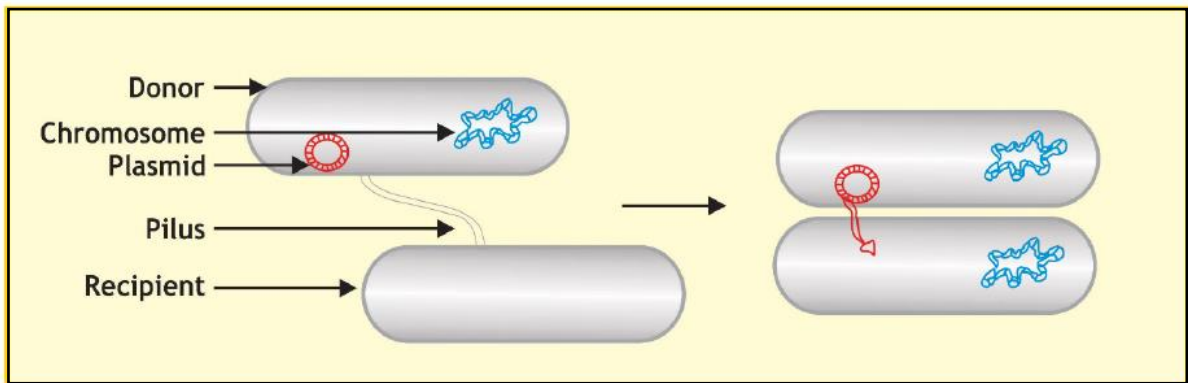


Figure 19: Transfert de plasmide entre bactéries par conjugaison (Banu and Prasad, 2017).

la bactérie réceptrice les gènes bactériens encapsidés, qui, par homologie de séquences et recombinaison homologue, peuvent s'introduire dans le génome de la nouvelle bactérie hôte (Davison 1999; Heuer and Smalla 2007; Banu and Prasad 2017).

c. La conjugaison

La conjugaison (Figure 19) est un processus par lequel de l'information génétique (plasmide autotransférable ou ICE¹⁸, abordés dans le paragraphe suivant) est transférée unidirectionnellement, par l'intermédiaire d'un contact cellulaire étroit entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice. Ce transfert résulte de la mise en place d'une machinerie protéique complexe, codée par de nombreux gènes *tra* (gène de transfert) et mettant en jeu un T4SS (chez les Gram négatifs), des pili et des adhésines (Thomas and Nielsen 2005; Wozniak and Waldor 2010; Banu and Prasad 2017).

Chez les Gram négatifs, la première étape est initiée par un contact étroit entre la cellule donatrice et réceptrice grâce à la rétraction d'un pilus de conjugaison (dépolymérisation) accroché à un récepteur de la bactérie réceptrice. Ce contact engendre la formation d'un pont de conjugaison (T4SS), appelé complexe Mpf¹⁹. Ceci provoque l'envoi d'un signal à un ensemble protéique, le relaxosome, qui permet l'initiation du transfert d'un brin d'ADN à partir de l'origine de transfert *OriT*. La réplication des brins d'ADN est réalisée durant l'étape de transfert, par un mécanisme de cercle roulant chez la bactérie donatrice et par réplication discontinue chez la bactérie réceptrice. A la fin du transfert, chaque bactérie possède une copie de l'élément conjugatif (Frost *et al.* 2005; Thomas and Nielsen 2005). Il est à remarquer qu'il s'agit du seul mécanisme de transfert où la bactérie donatrice reste en vie.

La conjugaison est considérée comme le mode de transfert le plus important dans la dissémination de l'antibiorésistance (von Wintersdorff *et al.* 2016). C'est aussi celui qui a été le plus étudié.

¹⁸ ICE : Elément intégratif conjugatif

¹⁹ Mpf : Mating pair formation

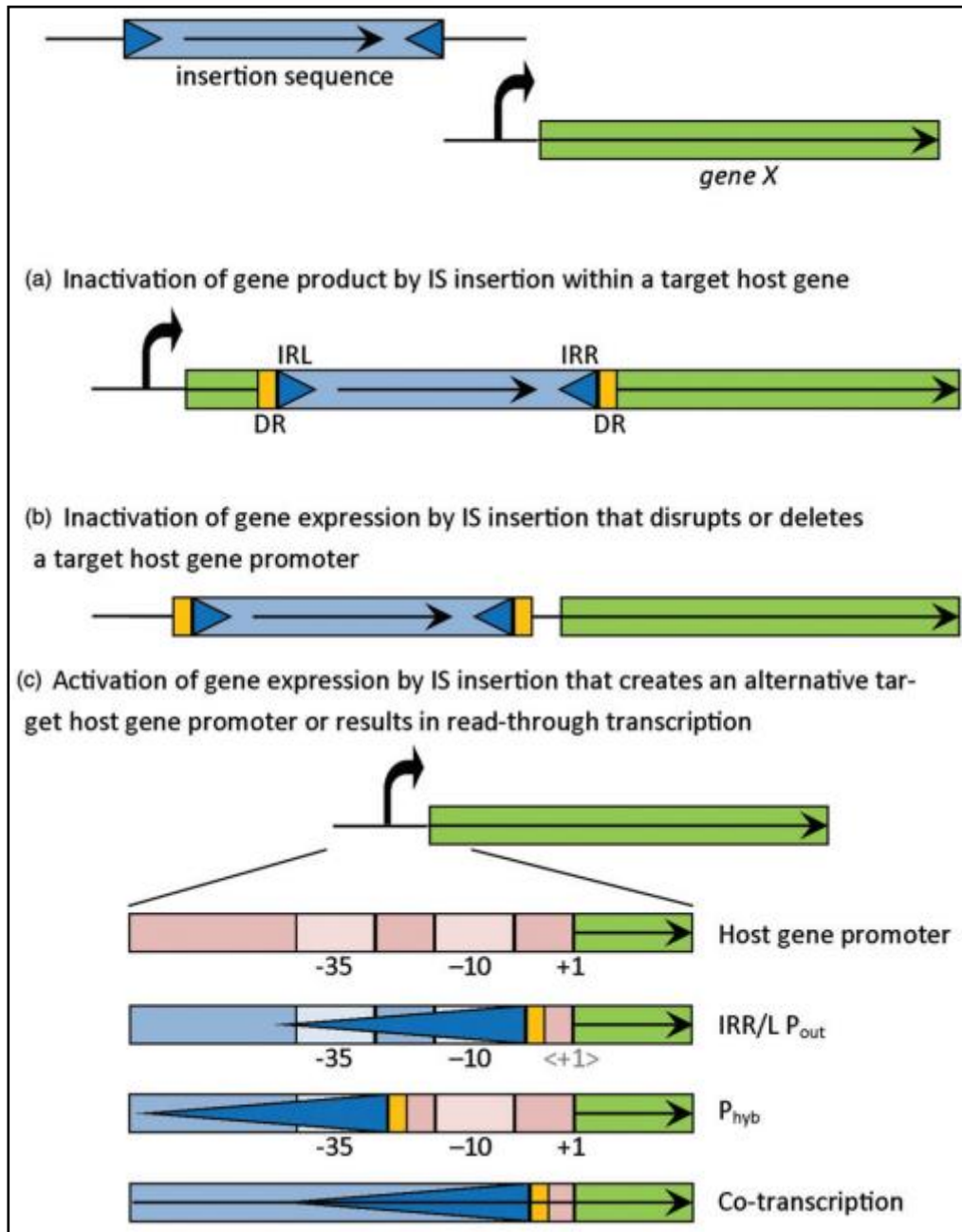


Figure 11: Effets possibles de la transposition d'IS dans la fonction et l'expression d'un gène cible. Les IS sont représenté par un rectangle bleu délimité par de courtes répétitions inversées (IR; triangles bleus) et flanqué de répétitions dirigées (DR; rectangles jaunes) et le gène cible par un rectangle vert. Les transcrits d'ARNm sont représentés par des flèches droites, la séquence du promoteur du gène cible est représentée par une flèche incurvée et détaillée par les composants -35 et -10 et par le site d'initiation de la transcription (+1). Pour les éléments IS portant un promoteur complet dirigé vers l'extérieur (P_{out}), le début de la transcription du gène cible est modifié et désigné par <+1>.

2. Les éléments génétiques mobiles impliqués dans l'antibiorésistance

Les transferts horizontaux que nous venons de voir mettent en jeu des éléments génétiques capables d'être transférés et de se maintenir au sein de la cellule hôte. Ces éléments contribuent à l'évolution rapide des génomes bactériens. Dans le cadre de la dissémination de l'antibiorésistance, ces éléments transférables sont souvent porteurs d'éléments génétiques dits « mobiles ».

Dans la suite de ce travail, nous appellerons élément génétique transférable tout élément capable de se transférer d'une cellule à une autre. Un élément génétique mobile sera défini comme étant un élément capable de se déplacer d'un réplicon²⁰ à un autre, ou d'un point à l'autre d'un même réplicon, au sein de la même cellule. Le chromosome, les plasmides ou les ADN de phage peuvent donc, au sein d'une même bactérie, acquérir ou échanger des éléments génétiques mobiles. Ceci contribue grandement à la dynamique de circulation des informations génétiques chez les procaryotes.

a. Les séquences d'insertions

Les séquences d'insertion (IS²¹) (Figure 20) sont des éléments génétiques mobiles et la plus petite forme des éléments dits « transposables » (possédant un gène codant la transposase). Elles ont une taille comprise entre 0,7 et 2,5 kb et ne codent aucune autre fonction que celle nécessaire à leur mobilité par transposition (recombinaison site-spécifique). Les IS sont capables de s'insérer à différents endroits dans le génome bactérien ou sur un plasmide, par transposition non répllicative. (Siguier *et al.* 2006; Siguier *et al.* 2014; Vandecraen *et al.* 2017). Elles sont bordées par des séquences IR²² de 2 à 40 pb. Ces séquences IR sont spécifiques de chaque IS et sont indispensables à la transposition. La plupart des IS contiennent un seul cadre de lecture qui code une transposase. Certaines, cependant, à partir du même cadre de lecture, codent une protéine de régulation de la transposition.

Les séquences d'insertion sont regroupées dans différentes familles en fonction de différents critères tels que la taille et la séquence des IR, l'organisation de leur cadre ouvert

²⁰ Réplicon : molécule support de l'information génétique capable de se répliquer

²¹ IS : Insertion sequence

²² IR: Inverted repeat

de lecture ou encore les sites d'insertion ciblés (Siguier *et al.* 2014). En 2017, environ 4500 IS ont été recensées, appartenant à 29 familles différentes (Vandecraen *et al.* 2017). Ces IS représenteraient généralement moins de 3% du génome bactérien, et de 5% à 20% des plasmides de plus de 20 kb (Siguier *et al.* 2006).

Les IS ne possèdent pas de gènes de résistance aux antibiotiques, mais peuvent intervenir dans leur expression, soit en les inactivant par interruption, soit, de façon exceptionnelle, en les activant par insertion (Figure 19). En effet, certaines IS contiennent une séquence promotrice complète ou partielle à leur extrémité dont l'orientation permet l'expression des gènes situés en aval grâce à la formation d'un promoteur hybride ou à l'utilisation du promoteur complet. L'insertion d'une IS peut également interrompre un gène répresseur rendant constitutive l'expression du ou des gènes contrôlés, ou un gène activateur inhibant l'expression du ou des gènes contrôlés (Depardieu *et al.* 2007; Vandecraen *et al.* 2017).

Une classe atypique d'IS impliquée dans la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques est appelée ISCR²³. Ces ISCR sont très proches de la famille atypique des *IS91* (Toleman *et al.* 2006). Les *IS91* et *IS91*-like diffèrent des IS classiques par leur structure et leur mécanisme de transposition. En effet, elles ne présentent pas de séquences IR à leurs extrémités et possèdent un seul cadre de lecture dont la séquence protéique putative est similaire à celle des protéines de la famille Rep²⁴ (Chandler and Mahillon 2002). Ainsi, elles se transposeraient par un mécanisme de transposition par cercle roulant permettant parfois de transposer également l'ADN adjacent.

b. Les transposons

Les transposons sont, eux aussi, des éléments transposables (mobiles par transposition puisque codent une transposase). Il existe différents types de transposon : les composites et les non-composites.

²³ ISCR : IS with common region

²⁴ Rep : Replication initiator protein

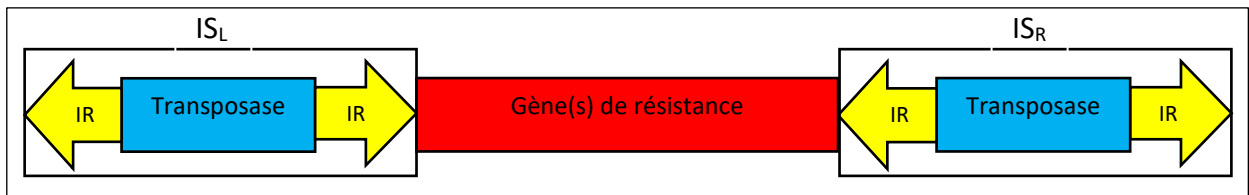


Figure 21: Structure d'un transposon composite.
IS : Insertion Sequence ; IR : Inverted Repeat sequence

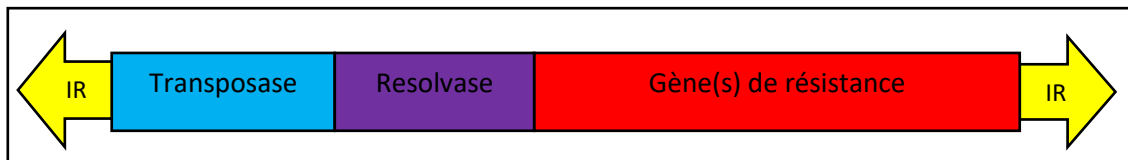


Figure 22: Structure d'un transposon non composite

i. Les transposons composites

Les transposons composites (Figure 21), d'une taille comprise entre 3 et 11 kb, sont constitués de deux copies d'une même IS, en orientation directe ou inverse, qui encadrent un segment d'ADN. Le plus souvent, seule l'une des deux IS du transposon code une transposase fonctionnelle permettant sa transposition non répliquative. Le segment d'ADN encadré par les IS n'intervient pas dans la transposition et correspond le plus souvent à des gènes de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds (Merlin and Toussaint 1999; Haniford and Ellis 2015). Les célèbres transposons composites Tn5, Tn9 et Tn10, largement répandus chez les bactéries à Gram négatif, portent respectivement les résistances à la kanamycine/bléomycine/streptomycine, au chloramphénicol et à la tétracycline (Chandler and Mahillon 2002; Reznikoff 2008; Haniford and Ellis 2015).

ii. Les transposons non composites

Les transposons non composites (Figure 22) se caractérisent par l'absence d'IS à leurs extrémités, mais par la présence de séquences IR. Ces transposons sont de taille variable (jusqu'à 70 kb pour Tn4651) et la plupart codent une transposase (TnpA) et une résolvasse (TnpR) qui catalysent leur transposition répliquative. Ils codent également des fonctions auxiliaires, dont des résistances aux antibiotiques (Merlin and Toussaint 1999). Le plus connu de ces transposons est le Tn3 (4,9 kb) qui confère la résistance à l'ampicilline. Ce transposon est largement distribué chez les bactéries à Gram négatif (Chandler and Mahillon 2002). D'autres exemples sont le Tn1546 qui joue un rôle important dans la dissémination du cluster de gènes *van* au sein des isolats cliniques d'*Enterococcus faecium* ou le Tn21 et ses variants qui confèrent la résistance au mercure et à différents antibiotiques grâce notamment à la présence d'un intégron de classe 1 qui piège des cassettes de résistance (Arthur *et al.* 1993; Liebert *et al.* 1999).

c. Les ICE

Les « éléments intégratifs conjugatifs », appelés ICE, sont des éléments génétiques de taille variable (18 à 600 kb), mobiles et transférables par conjugaison. Ils peuvent s'exciser du

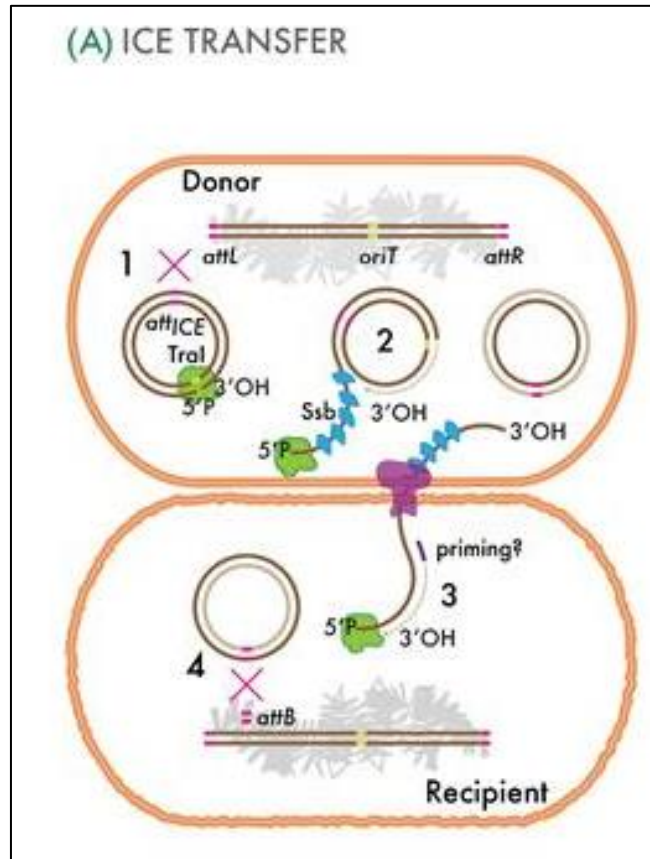


Figure 23: Modèle conceptuel généralisé de transfert des ICE (Delavat et al, 2017)

Le ICE est intégré dans le chromosome de l'hôte (barres marrons) mais peut être excisé par recombinaison spécifique au site (croix rouge) entre les extrémités d'attachement (attL et attR), un processus induit par une intégrase spécifique de l'ICE.

1) Le ICE est excisé.

2) Il subit un clivage simple brin à l'origine du transfert (oriT), se déroule et se reconstitue par réplication en cercle tournant résultant de l'activité de la relaxe Tral.

3) Une copie simple brin couverte par la protéine de liaison à l'ADN simple brin (Ssb) passe à travers un canal de conjugaison de type IV (structure membranaire rose et grise) ou autre dans une cellule receveuse.

4) L'ADN double brin est reconstitué et le site se recombine spécifiquement avec le site d'attachement du receveur pour se réintégrer.

chromosome de la bactérie donatrice, se recirculariser et se répliquer au cours de leur transfert vers une bactérie réceptrice (Burrus *et al.* 2006; Burrus 2017).

Cette famille d'éléments, définie pour la première fois en 2002, rassemble une classe particulière de transposons (les transposons conjugatifs) et les îlots génomiques autotransférables. Les ICE s'excisent du chromosome par un mécanisme de recombinaison site-spécifique, au niveau des sites bordants *attL* et *attR*, grâce à une intégrase et, parfois avec l'aide d'un facteur directionnel de recombinaison (Xis). L'intermédiaire circulaire résultant, qui n'est pas un réplicon, est transféré par conjugaison et inséré dans le chromosome de la bactérie réceptrice par l'intégrase, qui catalyse une recombinaison entre le site chromosomique *attB* et la séquence *attP* (ou *attI*) de l'ICE reconstituée à partir de *attL* et *attR* (Figure 23) (Burrus *et al.* 2006; Wozniak and Waldor 2010; Bellanger *et al.* 2014; Delavat *et al.* 2017).

Certains ICE peuvent s'intégrer au niveau de nombreux sites chez des hôtes d'espèces différentes, alors que d'autres sont spécifiques d'un seul site et d'une espèce (Bellanger *et al.* 2009; Roberts and Mullany 2009). Le premier transposon conjugatif de résistance aux antibiotiques, le Tn916, a été identifié chez une souche d'*Enterococcus faecalis* lui conférant la résistance à la tétracycline grâce à un gène *tet(M)*. Depuis, il a été mis en évidence chez de nombreuses autres bactéries à Gram positif (Roberts and Mullany 2009). Chez les bactéries à Gram négatif, l'ICE le plus caractérisé est l'élément STX impliqué dans les résistances aux sulfamides, triméthoprim, chloramphénicol et à la streptomycine (Cheng *et al.* 2000; Beaber *et al.* 2002; Böltner *et al.* 2002; Wozniak and Waldor 2010).

d. Les îlots génomiques

Les îlots génétiques mobiles sont des grandes régions chromosomiques (10 à 200 kb) dont les caractéristiques nucléotidiques diffèrent du reste du chromosome (pourcentage en G+C, fréquence tétra-nucléotidique, usage de codons). Ces îlots confèrent généralement de nouvelles fonctions à la cellule hôte telles que la résistance aux antibiotiques et métaux lourds ou l'utilisation de nouvelles voies métaboliques (Dobrindt *et al.* 2004; Bellanger *et al.* 2014). Ils

sont flanqués à leurs extrémités de séquences DR²⁵ qui codent les protéines nécessaires à leur mobilité telles que les intégrases. Leur insertion et excision sont catalysées par deux recombinases site-spécifiques. Leur mécanisme de transfert entre bactéries, s'il existe, n'a pas encore été mis en évidence (Hanssen and Ericson Sollid 2006). En fonction des gènes qu'ils portent, ils sont appelés îlots de pathogénicité, de symbiose, métabolique, de fitness ou de résistance (Juhas *et al.* 2009). Les îlots de résistance sont impliqués dans la multirésistance aux antibiotiques et l'un des mieux caractérisés est le SCCmec de *Staphylococcus aureus* (Deurenberg *et al.* 2007). Nous avons également vu le rôle essentiel des îlots de pathogénicité dans la virulence de la plupart des sérotypes de *Salmonella* (paragraphe A-II-1-c).

e. Les intégrons

Les intégrons (Figure 24) sont des systèmes génétiques de capture et d'expression de cassettes codant des résistances aux antibiotiques. Ces éléments ne sont, par eux-mêmes, ni mobiles, ni transférables, mais sont souvent associés à des éléments génétiques mobiles et/ou transférables tels que les transposons, ISCR, ICE, îlots génomiques ou plasmides (Toleman *et al.* 2006; Mazel 2006; Schlüter *et al.* 2007).

Les intégrons sont l'un des supports génétiques importants de la multirésistance aux antibiotiques chez les Enterobactéries, ainsi que chez d'autres genres bactériens à Gram négatif comme *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Campylobacter* ou *Vibrio*, et quelques genres à Gram positif comme *Enterococcus*, *Corynebacterium* ou *Staphylococcus* (Rowe-Magnus and Mazel 2002; Fluit and Schmitz 2004; Boucher *et al.* 2007; Kaushik *et al.* 2018).

Les cassettes sont de petites unités circulaires non répliquatives composées d'ADN bicaténaire, qui portent des séquences d'antibiorésistance, mais sans promoteur pour les exprimer. Elles possèdent également une séquence palindromique de recombinaison, le site *attC*, qui leur permet de s'intégrer dans l'intégron. Plusieurs cassettes de résistance peuvent exister en tandem dans un même intégron formant ainsi un opéron, et entraîner une résistance multiple aux antibiotiques. Elles peuvent également s'exciser et circuler d'un intégron à un autre. Elles pourraient, en cela, être considérées comme mobiles.

²⁵ DR: Direct repeat

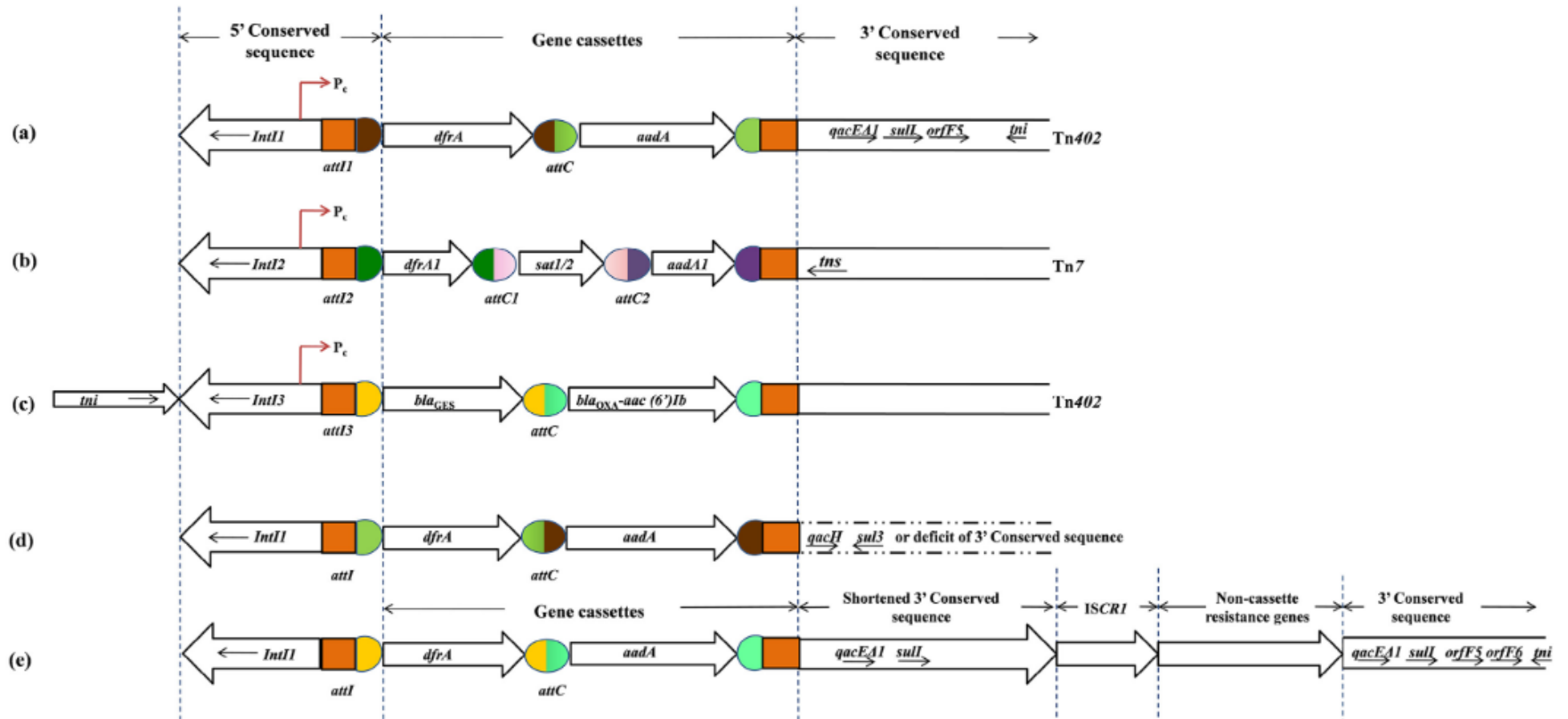


Figure 24: Caractéristiques générales de différentes classes d'intégrons (Kaushik et al, 2018).

La structure de base d'un intégron consiste en un gène *intI* codant une intégrase, un promoteur *P_c*, et un site de recombinaison primaire associé à l'intégron, *attI*, suivi de cassettes de résistance (des cassettes de gènes représentatives sont montrées; des variations sont généralement trouvées.)

a) Les intégrons de classe 1 associés au transposon Tn402 sont caractérisés par la présence de deux séquences conservées, le 5'CS étant constitué du gène *intI1*, du promoteur *P_c* et du site *attI1*, tandis que les 3'CS consiste en un gène *qacEΔ1*, un gène *sul1* et *orf5* suivi d'une région de transposition *tni*. Des cassettes de gènes sont incorporées dans ces séquences conservées, formant la région variable codant principalement pour la résistance au triméthoprim (dfrA) et aux antibiotiques aminoglycosides (*aadA*). Des gènes supplémentaires de résistance aux antibiotiques peuvent également être intégrés.

b) Les intégrons de classe 2 associés au transposon Tn7 sont caractérisés par la présence d'un 5'CS avec le gène *intI2*, le promoteur *P_c* et le site *attI2*. Des cassettes de gènes typiques *dfrA1* – *sat1/2* – *aadA1* se trouvent dans l'intégron de classe 2, suivies d'une région de transposition *tns*.

c) Les intégrons de classe 3, associés à une région de transposition *tni* dirigée de manière opposée au sein du transposon Tn402, sont caractérisés par la présence d'un 5'CS avec le gène *intI3*, le promoteur *P_c* et le site *attI3*. Les cassettes de gènes formant la région variable sont *bla_{GES}* et une cassette de gènes fusionnés de *bla_{OXA}* et *aac(6')-Ib* codant pour la résistance aux β-lactames et aux aminoglycosides.

d) Les intégrons atypiques de classe 1 sont caractérisés par la présence d'un gène 5'CS avec le gène *intI1*, suivi par les cassettes de gènes formant la région variable de l'intégron. Un intégron atypique de classe 1 est caractérisé par le remplacement des gènes *qacEΔ1* et *sul1* par les gènes *qacH* et *sul3*, respectivement, dans le 3'CS, ou par la perte complète de 3'CS.

e) Les intégrons complexes de classe 1 sont caractérisés par la présence d'un 5'CS et d'un 3'CS raccourci encadrant les cassettes de gènes. La 3'CS est suivie par *ISCR1*, les gènes de résistance « non-cassette » (non associés aux sites *attC*), une 3'CS dupliquée et une région de transposition *tni*.

De leur côté, les intégrons sont formés d'une région conservée 5' qui assure les fonctions d'intégration, d'excision et d'expression des cassettes, et d'une partie variable contenant l'ensemble dynamique de cassettes. Tous les intégrons caractérisés sont composés de trois éléments clés nécessaires à la capture et à l'expression des cassettes de résistance : un gène (*intI*) qui code une intégrase, un site primaire de recombinaison (*attI*), et un promoteur (Pc). L'intégrase catalyse l'insertion des cassettes au niveau du site *attI* par recombinaison site-spécifique entre *attI* et *attC*, juste en aval du promoteur Pc qui permet la transcription et l'expression des cassettes capturées (Figure 24) (Mazel 2006; Stalder *et al.* 2012; Kaushik *et al.* 2018).

Cinq classes d'intégrons sont connues pour posséder des cassettes de résistance aux antibiotiques, de la classe 1 à la classe 5. Parmi celles-ci, les intégrons de classe 1, 2 et 3 sont les mieux caractérisés (Mazel 2006; Stalder *et al.* 2012; Kaushik *et al.* 2018). Les classes 4 et 5 ont été identifiées chez le genre *Vibrio* où ils augmentent la résistance au triméthoprim.

i. Les intégrons de classe 1

Les intégrons de classe 1 sont les intégrons les plus fréquemment retrouvés et sont les plus ubiquitaires (Mazel 2006). Ils sont généralement constitués de trois régions (Figure 24) : une région 5' conservée, une région de taille variable contenant les cassettes de résistance et une région 3' conservée. La région 5' conservée est composée du gène d'intégrase (*intI1*) qui code une protéine de 337 acides aminés, de la région promotrice et du site spécifique de recombinaison *attI*. La région promotrice présente un promoteur Pc, situé dans le gène *intI1* qui permet la transcription des cassettes insérées (Fluit and Schmitz 2004). Chez la majorité des intégrons de classe 1, la région 3' conservée est un segment de 2 kb qui commence en aval de la dernière cassette et contient trois cadres de lecture : un gène tronqué de résistance aux ammoniums quaternaires (*qacEΔ1*), un gène de résistance aux sulfamides (*sul1*) et un cadre de lecture de fonction inconnue (ORF5) (Hall *et al.* 1994). Ces gènes sont transcrits à partir de leur propre promoteur, P4 pour *qacEΔ1-sul1* et P5 pour ORF5. Cependant, certains intégrons de classe 1 ne possèdent pas, ou seulement partiellement, cette région 3' (Rosser and Young 1999; Laroche *et al.* 2009).

Les intégrons de classe 1 sont souvent retrouvés sur des plasmides et des transposons de la famille du Tn3 (Tn21, Tn1696) ou du Tn402 (Mazel 2006; Labbate *et al.* 2008) et moins sur les chromosomes bactériens (Kaushik *et al.* 2018). Ils sont très répandus dans le secteur médical où leur fréquence est estimée entre 10 et 50% des Enterobactéries commensales portées par des individus sains, y compris chez les nouveau-nés (Gillings 2014). Les intégrons de classe 1 sont aussi présents dans l'environnement, où ils sont portés par 1 à 5% des bactéries du sol et leur prévalence peut atteindre 40% dans l'eau (Laroche *et al.* 2009; Stalder *et al.* 2012; Stalder *et al.* 2014; Gillings 2017).

ii. Les intégrons de classe 2

Les intégrons de classe 2 possèdent, comme les intégrons de classe 1, une structure tripartite (Figure 24). Ils sont le plus souvent localisés sur le transposon Tn7 et ses dérivés : Tn1825, Tn1826, Tn4132 (Sundström *et al.* 1991; Young *et al.* 1994). Chez ces intégrons, le gène qui code l'intégrase (*intI2*) est non fonctionnel, interrompu par un codon stop (TAA) qui entraîne l'arrêt précoce de la traduction de l'ARNm et la perte de la fonction d'intégrase (Hansson *et al.* 2002). Cependant, il a été montré, d'une part, que la mutation d'un codon était suffisante pour rétablir sa fonction, et d'autre part, que le gène d'intégrase de classe 1 pouvait mobiliser les cassettes au sein des intégrons de classe 2 (Mazel 2006).

L'intégron du Tn7 contient classiquement quatre cassettes : *dfrA1*, *sat1* et *aadA1* qui confèrent respectivement les résistances au triméthoprim, à la streptothricine, et à la streptomycine/spectinomycine, suivies de *orfX* de fonction inconnue. Les intégrons portés par les transposons dérivés du Tn7 possèdent la même structure avec l'absence d'une cassette ou la substitution d'une cassette par une autre (Young *et al.* 1994; Biskri and Mazel 2003). Il n'est pas rare d'identifier chez une même souche bactérienne, voire sur le même plasmide, des intégrons de classe 2 avec des intégrons de classe 1 (Roe *et al.* 2003; Rodríguez *et al.* 2006; Laroche *et al.* 2009; Flores Ribeiro *et al.* 2012; Laroche-Ajzenberg *et al.* 2014).

Les intégrons de classe 2 sont retrouvés en milieu médical, mais aussi dans l'environnement (Laroche *et al.* 2009; Flores Ribeiro *et al.* 2012; Laroche-Ajzenberg *et al.* 2014; Stange *et al.* 2016; Sidhu *et al.* 2017).

iii. Les intégrons de classe 3

La structure des intégrons de classe 3 est moins bien décrite que celle des précédents, probablement car ils sont peu fréquemment rencontrés. Le premier intégron de classe 3 a été identifié chez une souche de *Serratia marcescens* et contenait deux cassettes de résistance, *bla_{IMP}* et *acc'6-Ib* conférant respectivement les résistances à l'imipénème et aux aminoglycosides (Arakawa *et al.* 1995). Plus tard, Collis *et al.* (2002) ont montré que cet intégron était suivi d'une courte région du transposon Tn402. Un deuxième intégron de classe 3 a été identifié chez *Klebsiella pneumoniae* (Correia *et al.* 2003). Ces deux intégrons possèdent dans leur région 5' un gène d'intégrase (*intI3*) et un site *attI3* (Figure 24).

f. Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques, capables de se répliquer de façon autonome (réplicon). Ce sont des éléments génétiques transférables et ils peuvent circuler d'une bactérie à une autre grâce aux modes de transfert horizontaux décrits précédemment (transformation, transduction, voire conjugaison). Ils sont généralement circulaires, parfois linéaires et la majorité d'entre eux font entre 4 et 250 kb (Norman Anders *et al.* 2009). Ils sont retrouvés au sein des 3 domaines phylogénétiques : *Archae*, *Bacteria* et *Eucarya*. En fonction de sa taille, un plasmide aura une capacité codante plus ou moins élevée, mais l'information génétique portée n'est généralement pas nécessaire à l'hôte en conditions normales. Néanmoins, de nombreux plasmides portent des gènes qui donnent à la bactérie un avantage sélectif fort dans certains milieux.

Une bactérie peut porter plusieurs plasmides différents, chaque plasmide présentant un nombre de copies donné, plus ou moins important en fonction du plasmide. Ainsi, un plasmide peut être multicopies ou à faible nombre de copies, voire mono-copie. Ceci est souvent en relation avec sa taille (un petit plasmide sera plus probablement multicopies) et peut également dépendre de la bactérie hôte.

Les plasmides présentent une structure modulaire où les gènes sont souvent clustérisés : les gènes codant une même fonction sont, en effet, majoritairement rassemblés dans une même zone du plasmide (Osborn *et al.* 2000; Norman Anders *et al.* 2009). Deux régions principales sont pratiquement toujours observées : le « core génome » et le « génome

cargo » (Thomas 2000; Norman Anders *et al.* 2009; Garcillán-Barcia *et al.* 2011). Le « core génome » rassemble au minimum les fonctions permettant au plasmide de réaliser sa réplication comme l'origine de réplication *oriV* et des protéines ou ARN impliqués dans la régulation de la réplication. Le « génome cargo », quant à lui, rassemble des gènes apportant un phénotype qui peut se révéler avantageux pour la cellule hôte, comme des gènes de résistance ou de virulence (Norman Anders *et al.* 2009; Garcillán-Barcia *et al.* 2011; Harrison and Brockhurst 2012).

i. Réplication et contrôle

Pour se maintenir dans une population bactérienne, les plasmides doivent se répliquer dans la cellule hôte et, en cas de division, être distribués dans les cellules filles. Trois modes principaux de réplication végétative sont connus pour les plasmides circulaires chez les bactéries : la réplication en thêta, uni ou bi-directionnelle et, de façon exceptionnelle, la réplication en cercle roulant (Solar *et al.* 1998; Garcillán-Barcia *et al.* 2011). Pour ces trois mécanismes, la réplication est initiée au niveau de l'origine de réplication *oriV* et se termine au niveau de la séquence *ter*. Cette réplication nécessite, de façon plus ou moins importante, l'utilisation du système de réplication de la bactérie hôte (appelé éléments *trans*, comme les ADN polymérase I et III). Des molécules régulatrices plasmidiques (ARN, ARN anti-sens ou protéines) vont cependant contrôler l'initiation de la réplication du plasmide. Différentes stratégies sont employées par les plasmides pour contrôler l'initiation de leur réplication, mais elles sont toujours basées sur une répression de l'initiation. De façon générale, cette régulation met en jeu un initiateur, dont le rôle est d'ouvrir l'*oriV* et de la rendre accessible au réplisome et aux ADN polymérase, et au moins un répresseur, dont le rôle est de s'opposer à cette ouverture. La répression dépend de la concentration en répresseur dans la cellule, et donc, du nombre de copies du plasmide. Ces molécules interagissent entre elles ou avec des sites spécifiques sur le plasmide. L'un des modèles le plus répandu repose sur l'action d'une protéine qui se fixe sur des sites plasmidiques appelé itérons, et qui, en fonction de sa concentration (et donc du nombre de copies du plasmide), sera initiateur ou répresseur de la réplication du plasmide (Solar *et al.* 1998; Solar *et al.* 2002).

ii. Les groupes d'incompatibilités Inc

Il existe une grande diversité de ces systèmes génétiques contrôlant la réplication plasmidique. Il est possible de classer les plasmides en fonction de leur système de régulation au sein de groupes d'incompatibilité, appelés Inc (Novick 1987; Carattoli *et al.* 2005). En effet, un groupe d'incompatibilité rassemble des plasmides proches, qui ne peuvent cohabiter de façon stable dans une bactérie et sa descendance, car ils utilisent le même système de régulation et produisent le même répresseur. Ceci entrave leur réplication respective et entraîne la disparition de l'un des plasmides au fil des générations. *A contrario*, deux plasmides dont la réplication est régulée par des répresseurs différents, et donc appartenant à deux groupes Inc différents, pourront se maintenir sans difficulté au sein des cellules d'une population bactérienne en croissance. Il existe 28 groupes d'incompatibilité connus chez les *Enterobacteriaceae*, distingués depuis 2005, en utilisant une méthode de typage moléculaire nommée PBRT²⁶.

Chaque groupe d'incompatibilité possède un spectre d'hôtes donné. Ainsi, il existe les groupes IncA/C, IncP, IncQ, IncH, IncN et IncL/M, entre autres, qui sont à large spectre d'hôtes, pouvant se maintenir de manière stable chez de nombreuses espèces bactériennes, voire différents genres. D'autres, comme les groupes IncF ou IncI sont à spectre d'hôtes étroit (Rozwandowicz *et al.* 2018). Certaines résistances aux antibiotiques peuvent être associées à des groupes d'incompatibilité. Ainsi les IncF sont souvent associés à la résistance aux aminoglycosides et les IncP sont corrélés avec les résistances aux sulfamides, aminoglycosides et tétracycline (Rozwandowicz *et al.* 2018).

i. Autres méthodes de classification des plasmides

Les plasmides peuvent être différenciés selon leur mode de transfert. Il existe ainsi des plasmides auto-transférables, appelés conjugatifs, généralement de grande taille (> 30 kb) et à faible nombre de copies. Ils possèdent toute la machinerie cellulaire indispensable pour leur transfert : les gènes *tra* nécessaires à la conjugaison, et l'origine de transfert (*oriT*) à partir de laquelle débute le transfert d'un brin vers la bactérie réceptrice.

²⁶ PBRT :PCR-based replicon typing

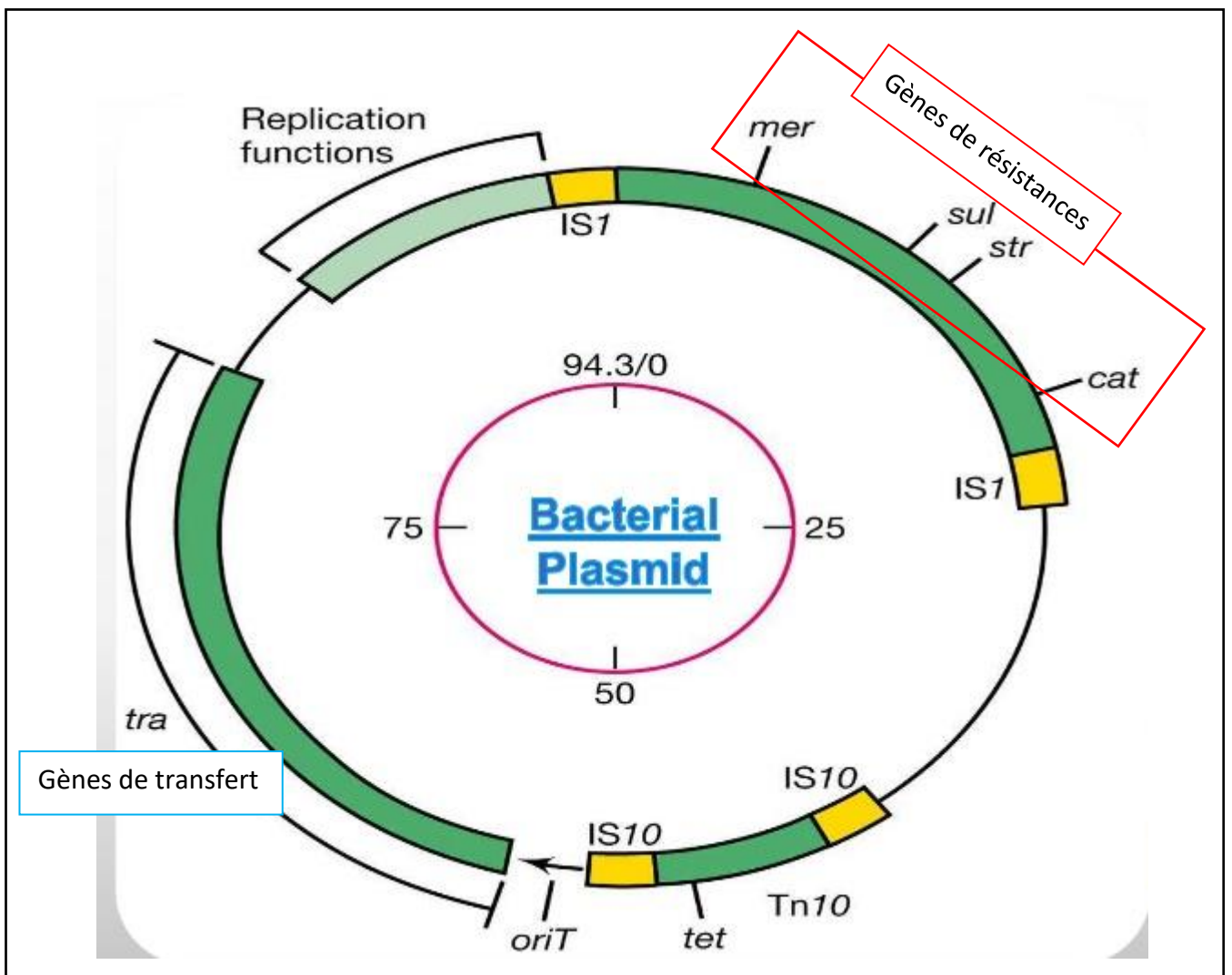


Figure 25 : Schéma d'un plasmide de résistance (image.slidesharecdn.com/bacterialplasmid)

Il y a aussi des plasmides mobilisables. Ils ne possèdent pas de gènes *tra* fonctionnels, mais contiennent une séquence *oriT* et une région *mob* de mobilisation qui leur permet d'être transférés dans une autre bactérie en présence d'un plasmide conjugatif.

Enfin, les plasmides non transférables par conjugaison (ni conjugatifs, ni mobilisables) sont le plus souvent de petite taille et multi-copies. Ils peuvent cependant être transférés entre bactéries par transformation ou encore transduction (Francia *et al.* 2004; Garcillán-Barcia *et al.* 2011).

Les plasmides peuvent aussi être distingués selon les fonctions supplémentaires qu'ils apportent aux bactéries hôtes. Il y a ainsi les plasmides de résistance, conférant, comme leur nom l'indique, des résistances aux antibiotiques et/ou aux métaux lourds (Figure 25). Ils font parti des plasmides les plus répandus et les plus disséminés entre les bactéries.

Les plasmides de virulence vont, eux, rendre les bactéries pathogènes, comme cela est le cas pour les pathotypes d'*Escherichia coli* EPEC et EHEC (Burland *et al.* 1998; Tobe *et al.* 1999; Johnson and Nolan 2009; Banu and Prasad 2017). Ils peuvent aussi augmenter la pathogénicité de souches déjà pathogènes, comme c'est le cas pour le plasmide SpV de *Salmonella* (Gulig and Doyle 1993; Zhu *et al.* 2007; Haneda *et al.* 2012).

Il existe aussi des plasmides métaboliques (ou cataboliques) qui codent des enzymes particulières permettant l'utilisation de l'urée et du soufre notamment, et la dégradation de certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et pesticides (Chakrabarty 1976; Hada and Sizemore 1981; Foght and Westlake 1996; Nogales *et al.* 2017).

i. Maintien du plasmide

Plusieurs stratégies de maintien du plasmide peuvent exister (Figure 25).

Un plasmide présent en faible nombre de copies (généralement les plasmides de grande taille) devra être parfaitement distribué dans chaque cellule fille lors de la division cellulaire pour ne pas être perdu au fil des générations. Ainsi, des systèmes sont présents sur certains plasmides, notamment le système de résolution de multimères *mer* (éléments transitoires dûs à la recombinaison de plusieurs copies du plasmide) et le système de partition *par* (Norman Anders *et al.* 2009; Sengupta and Austin 2011; Garcillán-Barcia *et al.* 2011). Les petits plasmides multicopies se répartissent de façon aléatoire entre les cellules filles. Si l'une de ces

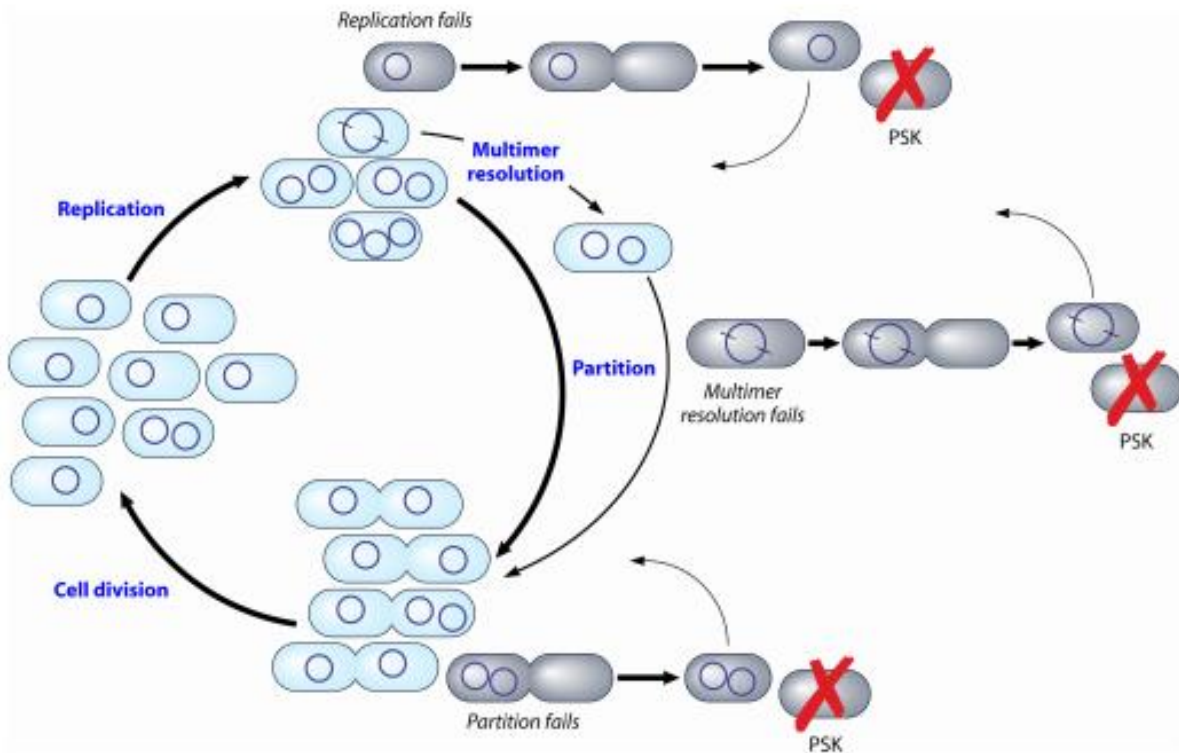


Figure 26: Les systèmes de maintien des plasmides dans les cellules bactériennes (Sengupta and Austin, 2011).

Le cycle cellulaire de cellules bactériennes (cellules bleues) contenant un plasmide à faible nombre de copies est représenté à gauche. La réplication plasmidique double le nombre de plasmides dans chaque cellule. Certaines cellules contiennent des dimères plasmidiques formés par recombinaison homologue. Ceux-ci sont réduits en monomères par le système de résolution de multimères. Les plasmides répliqués sont soumis à une partition active garantissant que la division cellulaire produit deux cellules, chacune contenant au moins une copie de plasmide.

Les cellules grises représentent les rares cellules où le système de réplication, de résolution de multimères ou de partition du plasmide n'a pas fonctionné correctement. La destruction post-ségrégation (PSK) est déclenchée dans ces cellules qui n'ont pas de copie du plasmide, ce qui les supprime et garantit ainsi que toutes les cellules viables de la population conservent le plasmide.

dernières est mal servie, le plasmide se réplique après la division pour atteindre le bon nombre de copies.

Un autre mécanisme, le système toxine / antitoxine, assure également une grande stabilité aux plasmides qui les portent. La toxine et l'antitoxine sont exprimées en quantité équivalente par le plasmide, mais la toxine est plus stable que l'antitoxine. Ainsi, si une cellule fille ne reçoit pas le plasmide, l'antitoxine se dégrade et la toxine va tuer la cellule qui a perdu le plasmide (Van Melderen 2010). Ainsi, la population ne peut pas (ou difficilement) s'enrichir de bactéries sans plasmides.

Malgré la présence de ces systèmes développés par les plasmides pour se maintenir dans la population bactérienne, le coût métabolique d'un plasmide pour la cellule hôte reste un point critique. En présence d'une pression de sélection, le plasmide confère un avantage indéniable, mais si la pression disparaît, le plasmide peut devenir un fardeau métabolique pour la bactérie hôte et sa perte devenir un avantage pour la cellule. Il semble évident que, pour les plasmides de grande taille ou multicopies, l'expression des protéines plasmidiques et, éventuellement, de la machinerie de conjugaison soient un réel coût pour la bactérie hôte (Norman Anders *et al.* 2009). Il semblerait d'ailleurs, que, pour limiter ce coût, les bactéries et les plasmides évoluent ensemble (Harrison and Brockhurst 2012). L'un des principaux processus de co-évolution serait la perte des fonctions de conjugaison plasmidique.

C. Les mécanismes d'adaptation des bactéries entériques à l'environnement

Afin de pouvoir survivre dans des écosystèmes qui ne leur sont pas favorables, les bactéries, et notamment les entériques, ont développé divers systèmes, comme la formation de biofilm ou, de façon beaucoup plus précaire, l'entrée en état viable non cultivable (VNC). Mais la première étape de toute colonisation est l'adhésion à une surface.

I. L'adhésion : étape clé de la colonisation ?

La colonisation d'une surface par des bactéries implique pour ces dernières la transition d'un mode de vie planctonique autonome dans un liquide à un état sessile. Et la première étape pour cela est d'atteindre la surface.

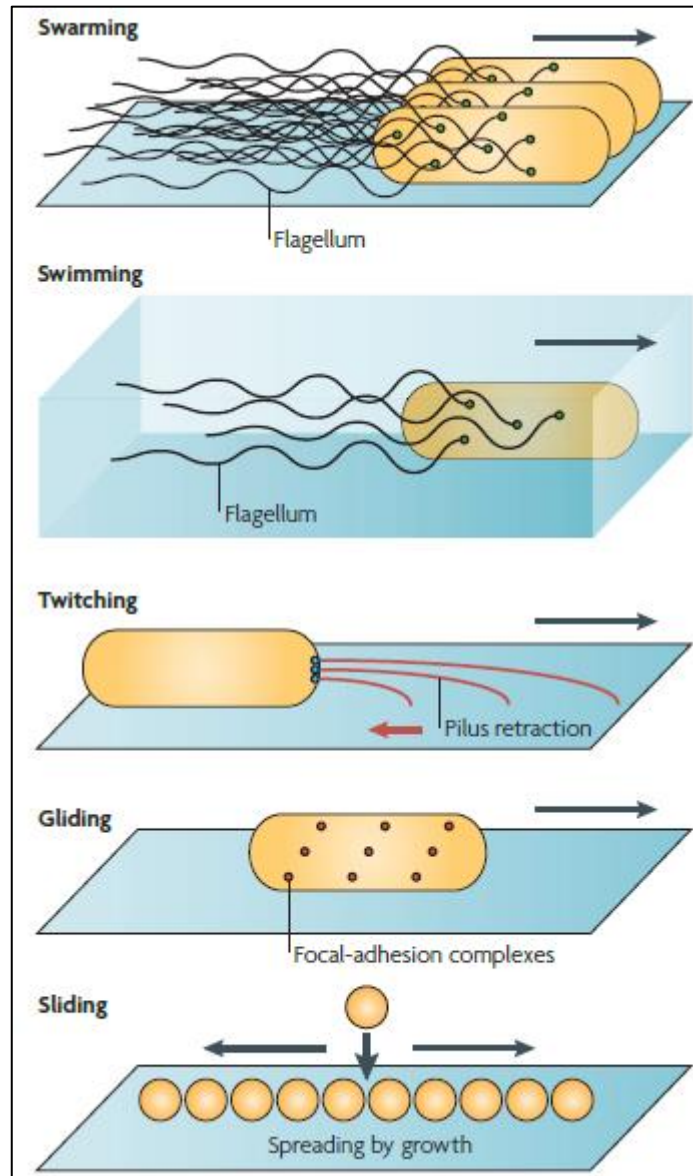


Figure 27 : Les différents types de mobilité bactérienne (Kearns 2010)

1. Première étape : le rapprochement de la surface

Pour initier la fixation à une surface, les bactéries doivent s'en rapprocher. Pour ce faire, elles peuvent utiliser les transports passifs, aléatoires et peu efficaces, tels que les forces de gravitation, les mouvements brownien ou encore l'écoulement du liquide (Donlan 2002). En présence de stimuli (attractifs ou répulsifs), les bactéries peuvent utiliser la mobilité active.

a. Les différents types de mobilités

En 1972, Jorgen Henrichsen a étudié la mobilité de surface de centaines de souches de 40 espèces bactériennes appartenant à 18 genres différents. Il a ainsi pu identifier six catégories différentes de motilité: « swimming », « swarming », « gliding », « twitching », « sliding », et « darting ». Si les 5 premiers ont été bien étudiés et décrit depuis, aucune nouvelle donnée ne semble disponible dans la littérature sur le « darting » défini comme « une sorte de translocation de surface produite par les forces d'expansions développées dans un agrégat de cellules à l'intérieur d'une capsule commune et entraînant l'éjection de cellules de l'agrégat » (Henrichsen 1972).

Le « twitching » (Figure 27) a été défini à l'origine comme un mouvement intermittent et saccadé principalement affiché par des cellules individuelles. Cette forme de mobilité, apparaissant chez une grande variété de bactéries, nécessite une surface humide et permet aux cellules de se déplacer à la fois en avant et en arrière à une vitesse de quelques dixièmes de micromètre par seconde. Il est maintenant clair que l'extension et la rétraction active des pili de type IV (décrits plus loin) sont impliquées dans la mobilité de contraction (Merz *et al.* 2000; Harshey 2003; Craig *et al.* 2006; Kearns 2010).

Le « Gliding » (Figure 27) est défini comme un mouvement régulier des cellules, généralement le long du grand axe de la cellule, et est particulièrement visible dans trois grands groupes bactériens, les myxobactéries (vitesse de 0,025 à 0,1 $\mu\text{m/s}$), les cyanobactéries (à des vitesses approchant les 10 $\mu\text{m/s}$) et l'espèce *Cytophaga flavobacterium* (2 à 4 $\mu\text{m/s}$).

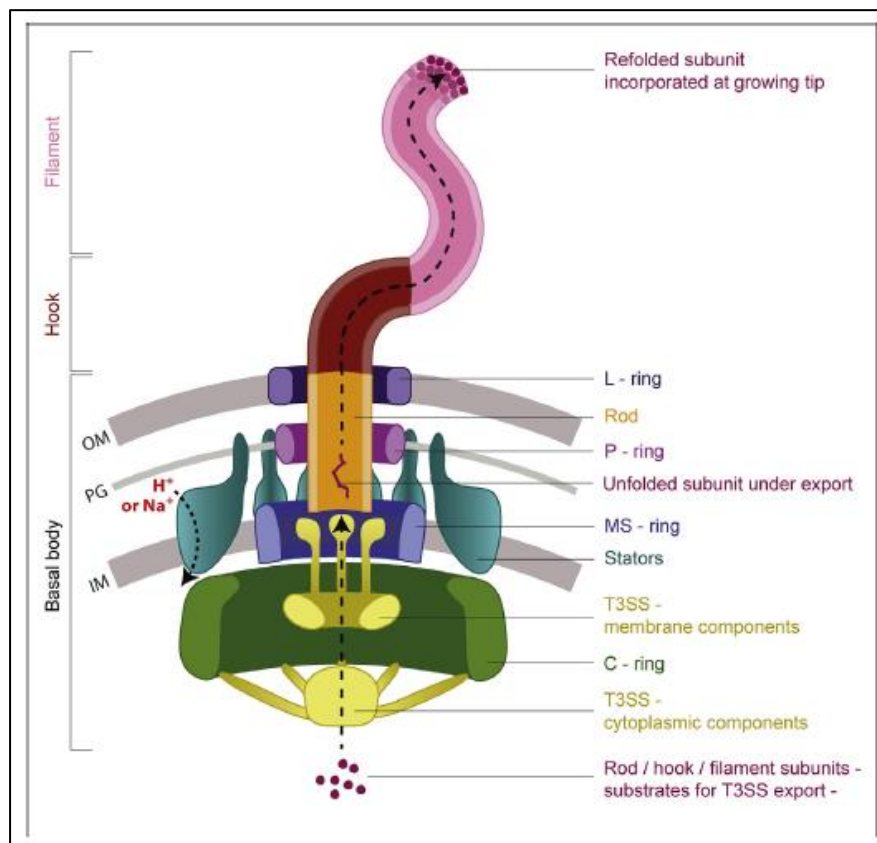


Figure 28 : Structure d'un flagelle bactérien (Chaban et al. 2015).

La figure est basée sur les bactéries modèles Gram négatif *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*. Au cours de l'assemblage, les composants T3SS du corps basal se déploient et exportent des sous-unités de la tige, du crochet et du filament en vue de leur incorporation à l'extrémité distale des cellules de la structure en croissance. Les complexes de stator dans le corps basal interagissent avec l'anneau en C pour provoquer la rotation du filament extracellulaire pour la motilité.

OM: membrane externe; PG: couche de peptidoglycane; IM: membrane interne

De nombreux modèles différents ont été proposés pour expliquer cette mobilité, cependant, il n'existe aucune preuve claire à l'appui d'un modèle spécifique et il est possible que plusieurs mécanismes différents soient impliqués (Harshey 2003; Kearns 2010).

Le « Sliding » (Figure 27) est produit par les forces expansives d'une colonie en croissance, associées à une tension superficielle réduite, et a été observé chez de nombreuses bactéries. Il existe une forte corrélation entre la production de tensioactifs tels que les lipopeptides, les lipopolysaccharides (LPS) et les glycolipides, et le phénomène de glissement / propagation. Bien que passif, ce mode de translocation joue probablement un rôle important dans la colonisation de la surface bactérienne.

Le « Swimming » comme le « Swarming » sont corrélés à la présence d'un flagelle (Figure 26). Le « Swimming » est le type de mobilité le plus répandu en milieu liquide et semi-solide (Harshey 2003; Kearns 2010). La rotation flagellaire va générer une force de propulsion qui va jouer un rôle dans l'attachement bactérien initial (Pratt and Kolter 1998).

Le « Swarming » est le mouvement d'un groupe de bactéries. C'est une alternative au « Swimming » qui est observée lorsque les bactéries flagellées se retrouvent sur un milieu solide (Harshey 2003).

b. Flagelles et autres appendices protéiques

Le flagelle (Figure 28) est considéré comme le « moteur » de la mobilité active. Il s'agit d'un appendice long et fin qui possède une structure hélicoïdale. Ce complexe supramoléculaire est composé de 3 grandes parties : le corps basal (moteur réversible), le crochet (joint entre les deux parties) et le filament (hélice hélicoïdale composé de flagelline) (Zhao *et al.* 2014; Minamino and Imada 2015; Chaban *et al.* 2015). Il permet aux bactéries de se déplacer en réponse à un stimulus qui peut être attractif ou répulsif, comme nous le verrons ci-dessous. D'autres appendices protéiques permettent le contact entre les bactéries et des surfaces biotiques et abiotiques. Il s'agit de structures comme les pili, les curli ou encore des systèmes de sécrétion (Figure 29).

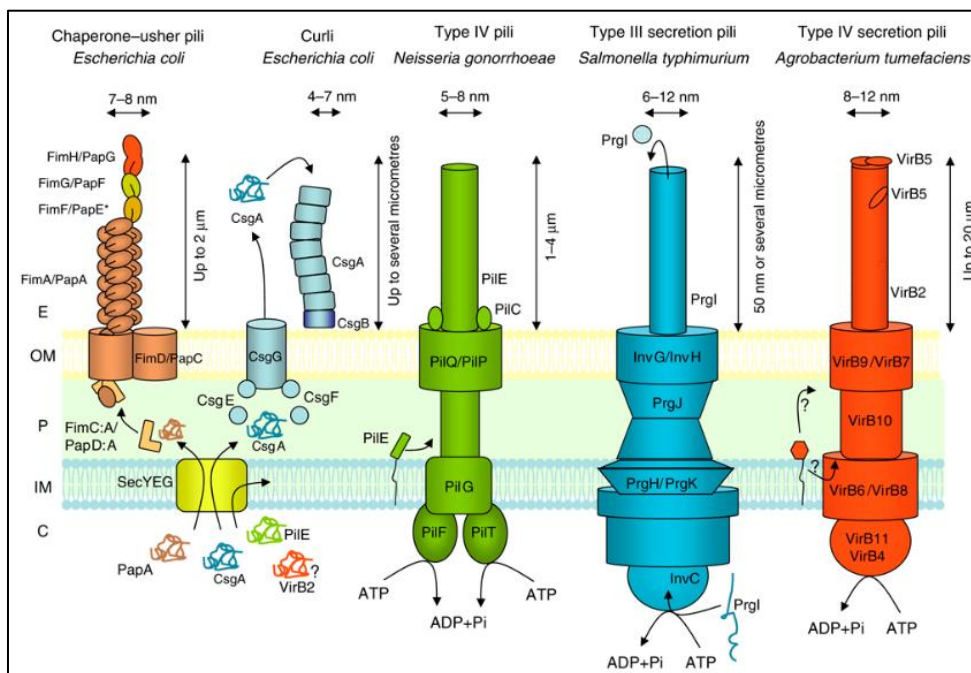


Figure 29: Les différentes adhésines de surface et leurs machines d'assemblage au sein des bactéries à Gram négatif (Fronzes et al, 2008).

Les Chaperone-usher pili (CU) et curli sont des fibres attachées à la surface de la cellule. Pour les pili de CU, les sous-unités de pilus P et de type 1 et les protéines d'assemblage sont illustrées. * indique (1) qu'il existe 5 à 10 sous-unités de PapE dans l'extrémité fibrillaire du pilier P, alors que la sous-unité équivalente du système de pilus de type 1, FimF, n'est présente que dans un seul exemplaire; (2) que l'adaptateur PapK entre les polymères PapE et PapA n'a pas d'équivalent dans les pili de type 1. Les pili et curli en CU sont assemblés au moyen de systèmes simples situés au niveau de la membrane externe. Les systèmes de sécrétion de type IV, type III et de type IV sont assemblés par de grands complexes multi-sous-unités traversant toute l'enveloppe de la cellule bactérienne.

Les pili sont des organites adhésifs localisés à la surface des bactéries. Ils peuvent être utilisés comme appendices pour le transfert de matériel génétique lors de la conjugaison bactérienne (pili de conjugaison), mais jouent aussi des rôles dans la fixation aux surfaces biotiques et abiotiques, la mobilité et la formation de biofilm. Identifiées initialement uniquement chez des organismes à Gram négatif tels que *E. coli*, ces structures filamenteuses comprennent une tige ancrée à la membrane bactérienne externe avec un facteur d'adhérence bactérienne ou une adhésine située à son extrémité, qui confère la spécificité de liaison (Pizarro-Cerdá and Cossart 2006; Fronzes *et al.* 2008; Hori and Matsumoto 2010a; Berne *et al.* 2015).

Il existe plusieurs types de pili. Par exemple, les pili de type I et les pili P, bien connu chez *E. coli* et *Salmonella*, interviennent dans la virulence des bactéries en leur permettant d'adhérer à leur cible. Ces pili sont plutôt péritriches, à l'inverse des pili de type IV qui sont polaires. Au contraire des pili de type I et P, assemblés dans l'espace extracellulaire bactérien, les pili de type IV sont formés au niveau de la membrane cytoplasmique, puis ils sont expulsés au travers la membrane externe. Ils peuvent faire jusqu'à 30 microns (10 fois la taille d'une bactérie) et sont produits en quelques microns secondes (Craig *et al.* 2006). La caractéristique la plus frappante des pili de type IV est leur capacité à se rétracter à travers l'enveloppe bactérienne, tandis que la pointe du pilus reste fermement adhérente à la surface de la cible. Cette rétraction est nécessaire pour la mobilité active des bactéries notamment sur des surfaces semi-solides (telles que l'épithélium des muqueuses). Les pili de type IV sont aussi impliqués dans la formation des biofilms, par liaisons non spécifiques aux surfaces ou par liaisons spécifiques permettant l'adhésion bactérienne aux cellules hôtes des pathotypes de *E. coli* EPEC, EHEC et *Salmonella Typhi* (Pizarro-Cerdá and Cossart 2006; Fronzes *et al.* 2008; Hori and Matsumoto 2010a; Berne *et al.* 2015).

Les curli, eux, sont de fines fibres, structurées en boucles souples, qui appartiennent à la classe des fibres amyloïdes. Elles vont permettre aux bactéries de s'agréger entre elles et d'adhérer aux surfaces biotiques et abiotiques. Les curli sont donc importants dans le développement d'un biofilm en développant les interactions bactéries-bactéries (Oh *et al.* 2016; DeBenedictis *et al.* 2016).

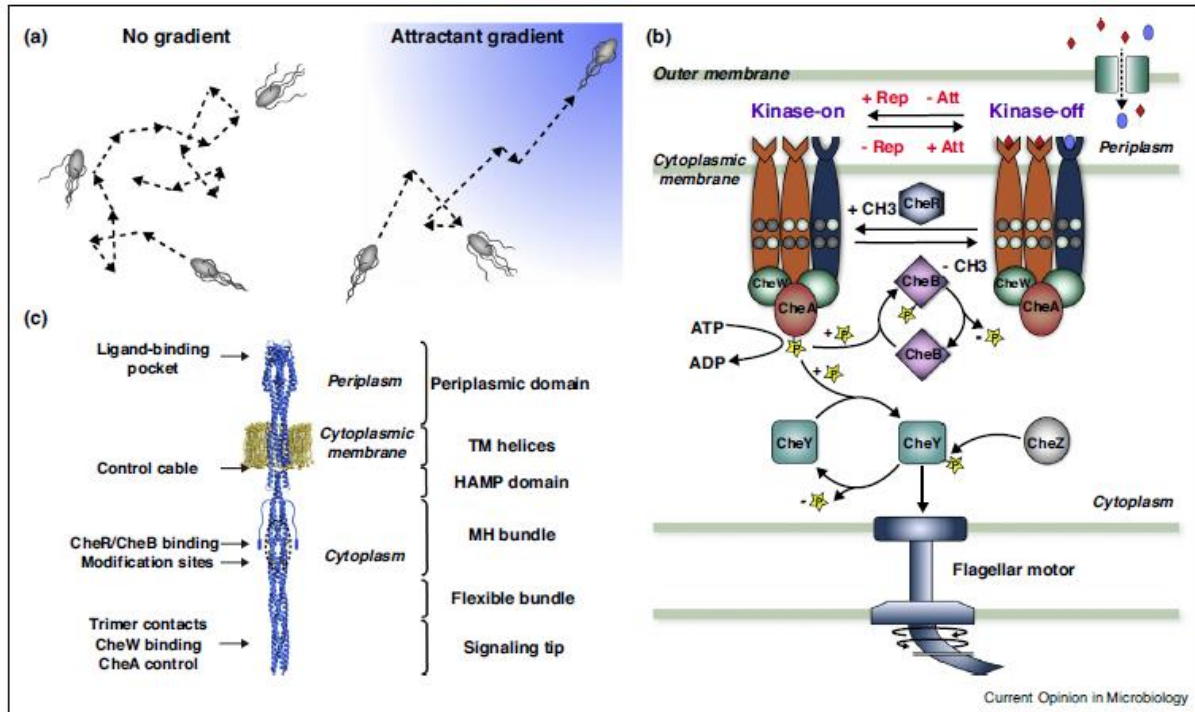


Figure 30 : Le chimiotactisme chez *E. coli* (Bi and Sourjik, 2018).

a) Stratégie de chimiotactisme : en l'absence d'un gradient d'effet chimio-effecteur, le mouvement des cellules d'*E. coli* consiste en lignes droites (≈ 1 s) interrompues par des culbutes transitoires ($\approx 0,1$ s). Dans un gradient attractif, les bactéries effectuent une marche aléatoire biaisée, allongeant les périodes de ligne droite dans la direction du gradient.

b) Voie de signalisation : les attractifs (Att; indiqués par des losanges / ovaux colorés) favorisent un état inactif (kinase-off) des complexes sensoriels, ce qui conduit à une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre de moteurs flagellaires et à des cycles droits. Les répulsifs (Rep) favorisent un état kinase-on, conduisant à une rotation du moteur dans le sens des aiguilles d'une montre et à des culbutes. CheR et CheB règlent la méthylation du récepteur en fonction de l'état d'activité du récepteur.

(c) Structure de l'homodimère du récepteur, représentée par le diagramme en ruban avec indication des domaines et des caractéristiques spécifiques.

Un autre exemple d'appendices protéiques sont les systèmes de sécrétion. Le système de sécrétion de type 1 (T1SS) sécrète une famille de protéines Bap²⁷ qui semble impliquée dans l'adhésion des cellules aux surfaces abiotiques et dans la formation de biofilms chez les bactéries à Gram positif et négatif. La première Bap a été identifiée chez *Staphylococcus aureus* et, depuis, de nombreux autres membres de la famille Bap ont été mis en évidence. D'autres systèmes de sécrétion entrent en jeu comme les T3SS (impliqués dans la virulence) et les T4SS (impliqués dans les mécanismes de transformation et de conjugaison, et la sécrétion de complexes protéiques de la bactérie aux cellules eucaryotes) (Berne *et al.* 2015).

c. Le chimiotactisme : guide de la mobilité

Le chimiotactisme est le processus par lequel les bactéries détectent leur environnement et dirigent leur mouvement. Les bactéries décèlent et suivent des gradients chimiques dans leur environnement au moyen de chimiorécepteurs transmembranaires appelés « protéines chimioréceptrices acceptant le méthyle ». Ces récepteurs forment de grands complexes de signalisation qui s'organisent en grappes dans la membrane cytoplasmique et vont contrôler le comportement de la nage de la bactérie en générant des signaux de moteurs faisant tourner les flagelles dans le sens horaire. Cela provoque un changement de direction suivant si les gradients chimiques sont attractifs ou répulsifs (Parkinson *et al.* 2015). *E.coli* va nager préférentiellement vers les sucres (glucose, galactose et maltose), les acides aminés (aspartate et sérine), les accepteurs d'électrons (oxygène, nitrate, fumarate), les pyrimidines, les dipeptides, et va s'éloigner des composés potentiellement nocifs tels les acides gras et les alcools (Parkinson *et al.* 2015). Cependant, cette nage n'est jamais en ligne droite, elle est faite d'une alternance de courses et de culbutes, avec allongement de la course lorsque le gradient est positif (Bi and Sourjik, 2018) (Figure 30).

Pour les bactéries pathogènes, l'interaction entre la mobilité et le chimiotactisme dirige la colonisation des organismes sur des sites hôtes particuliers. Ainsi dans l'intestin, le chimiotactisme permet ainsi à *Helicobacter pylori* de coloniser préférentiellement les sites de lésions gastriques (Aihara *et al.* 2014), et les chimio-attractants tels que les mucines et les glycoprotéines, qui sont le principal constituant du mucus intestinal, poussent *Campylobacter*.

²⁷ Bap : biofilm-associated protein

jejuni à coloniser les cryptes remplies de mucus dans l'intestin (Bolton 2015). D'autres pathogènes, tels que *Salmonella*, semblent se déplacer activement à travers la couche de mucus intestinal, de manière dirigée vers l'épithélium. Ceci laisse supposer Le chimiotactisme serait indispensable à une colonisation efficace de l'intestin dans les modèles murins (Stecher *et al.* 2004).

Le chimiotactisme est également important pour les phytopathogènes. Il est nécessaire pour les agents pathogènes des plantes présents dans le sol, comme *Agrobacterium tumefaciens* (Hawes and Smith 1989; Merritt *et al.* 2007) et *Ralstonia solanacearum* (Yao and Allen 2006; Yao and Allen 2007), afin de détecter les racines cibles dans leur environnement de sol. De même, *Pseudomonas syringae*, pathogène foliaire, utilise la mobilité flagellaire et le chimiotactisme pour infecter la surface des feuilles (Yu *et al.* 2013).

2. Deuxième étape : interactions avec la surface

Lorsque les bactéries approchent de la surface, le taux d'adhésion est dicté par la somme des forces attractives et répulsives entre la cellule et la surface. Lorsque les forces attractives l'emportent sur les forces répulsives, le contact entre la surface et la cellule se poursuit

a. Interactions réversibles

Les premières forces physico-chimiques que vont subir les bactéries sont les interactions de Van der Waal (généralement attractives), les interactions électrostatiques modulées par la force ionique et le pH de l'environnement, et les interactions hydrophobes acide-base (Berne *et al.* 2018).

En raison de la charge négative nette de leur enveloppe cellulaire, les bactéries sont soumises à des forces électrostatiques répulsives à l'approche des surfaces chargées négativement. Les bactéries rencontrent des forces hydrodynamiques répulsives comme les forces de cisaillement qui apparaissent près de la surface (Palmer *et al.* 2007; Berne *et al.* 2015). Cependant, près de la surface, l'ampleur des forces de Van der Waal est plus forte et conduit à l'adhésion des bactéries. Et, en plus de propulser activement les bactéries vers la surface, le flagelle joue aussi un rôle important dans l'adhésion en fournissant un contact physique avec la surface et en agissant comme une adhésine (Palmer *et al.* 2007). En effet, les bactéries

peuvent utiliser le flagelle pour explorer la topographie de la surface et accéder à des zones inaccessibles au corps cellulaire comme des crevasses et initier une adhésion polaire (Friedlander *et al.* 2013). La topographie de la surface, ainsi que sa composition chimique, vont aussi jouer sur l'adhésion. Par exemple, une surface présentant des aspérités est plus propice à l'adhésion des bactéries qu'une surface lisse, car ces aspérités vont notamment permettre aux bactéries de se protéger des forces de cisaillement.

b. Interactions irréversibles

Une fois que les bactéries ont surmonté les forces répulsives près de la surface et ont initié le contact, elles doivent sécuriser et renforcer leur adhésion. Ces étapes sont dictées par les interactions à courtes portées médiées par les appendices protéiques de surface vus précédemment, et les liaisons hydrogènes, puis par le renforcement des liaisons par réarrangement des composants bactériens et de surface.

Certaines bactéries vont passer d'une fixation réversible à irréversible en repositionnant leur corps cellulaire en position longitudinale. Ce repositionnement s'explique notamment par deux phénomènes : (1) les cellules liées par leur pôle cellulaire peuvent tourner sur leur axe et se détacher plus facilement et (2) le positionnement longitudinal maximise la surface de contact entre la bactérie et la surface (Berne *et al.* 2018). Cependant, ce n'est pas la seule stratégie pour avoir une adhésion irréversible. Les réarrangements structuraux de la surface bactérienne entrent aussi en jeu. Ainsi, chez *E.coli*, l'adhésine FimH présente à la pointe des pili de type I subit un changement de conformation qui permet une adhésion plus étroite. Cette adhésine est composée de deux sous-unités, un domaine piline qui l'ancre au pilus et un domaine lectine qui reconnaît spécifiquement les fragments mannoses terminaux. La liaison de FimH à ces mannoses va dépendre de la contrainte de cisaillement. A faible cisaillement, FimH va former de faibles liens de courte durée et la bactérie est entraînée en aval lorsque les liens se rompent. Avec un cisaillement plus élevé, FimH va changer de conformation ce qui entraîne une fixation plus forte de la bactérie à la surface (Thomas 2008).

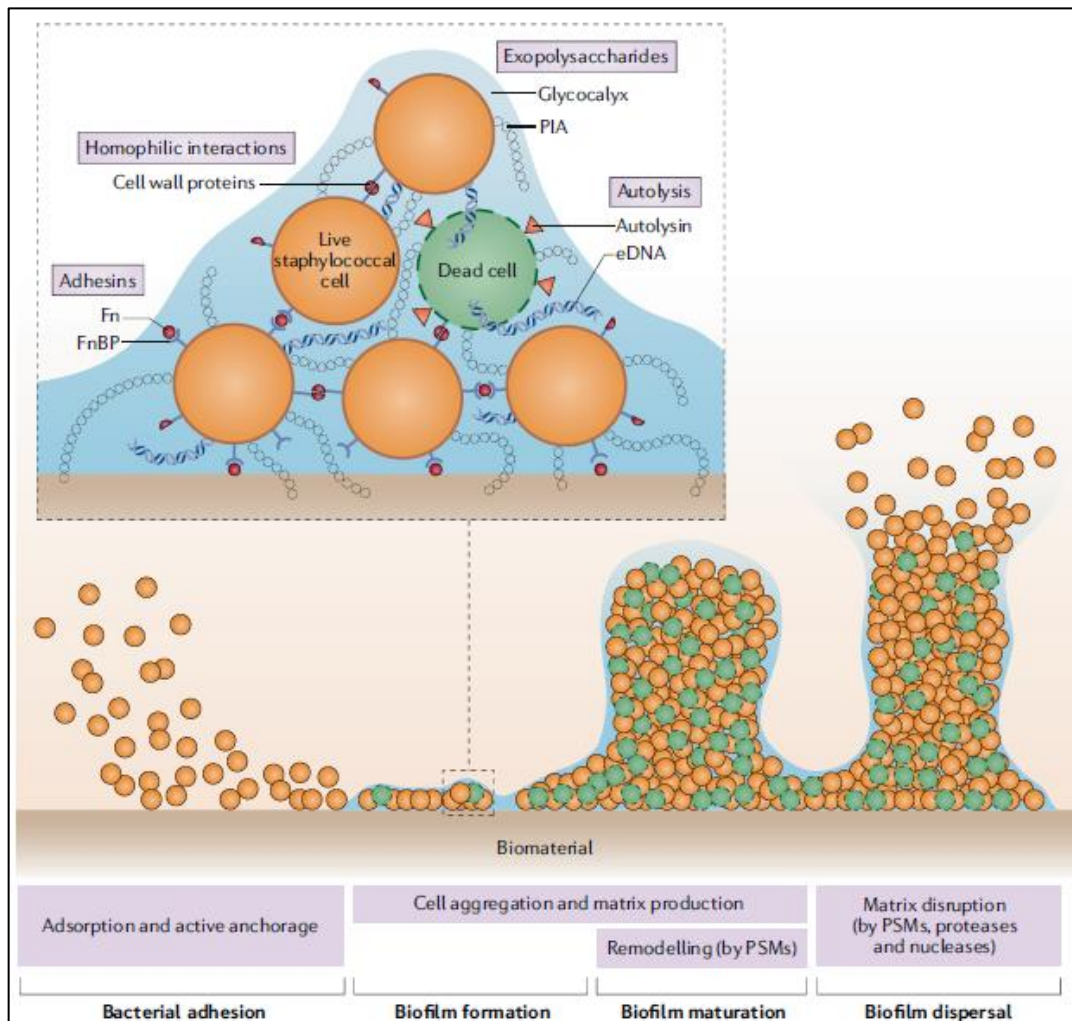


Figure 31: Étapes de la formation de biofilms chez *Staphylococcus* (Arciola et al, 2018).

L'ancrage stable des bactéries est généralement suivi par la formation d'un biofilm. Les interactions intercellulaires médiées par les adhésines et les protéines de la paroi cellulaire amènent les bactéries à se regrouper, formant des microcolonies. Par exemple, chez *Staphylococcus aureus*, les protéines liant la fibronectine (FnBP) se lient aux molécules de fibronectine (Fn), formant un pont, et cette interaction favorise l'agrégation bactérienne. La production de EPS fait partie du processus de maturation du biofilm, au cours duquel la matrice du biofilm s'accumule progressivement et de plus grands agrégats bactériens se développent. Dans *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm incluent l'expression de l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA) et la libération d'ADN extracellulaire (eDNA) dérivé de l'autolyse bactérienne et de cellules hôtes mortes. Chez *S. epidermidis*, la sous-classe β de modulines solubles dans le phénol (PSM) contribue à la structuration du biofilm et conduit à la formation de canaux hydrologiques caractéristiques, qui sont observés dans des biofilms matures. Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, les PSM sont également impliqués dans la dispersion du biofilm, avec les protéases et les nucléases

Une fois la bactérie en contact plus étroit avec la surface, les forces d'adhésion déclenchent des contraintes mécaniques et de légères déformations de l'enveloppe cellulaire ce qui peut stimuler la production d'adhésine. Chez *E.coli*, ce contact étroit déclenche un système à deux composants qui induit la transcription de curli (Berne *et al.* 2015).

Dans une grande majorité des cas, mais pas tous, une fois les bactéries adhérentes à une surface, elles vont s'organiser sous forme de biofilm.

II. Les biofilms bactériens

Un biofilm (Figures 31 et 32) est une communauté structurée de cellules bactériennes enfermées dans une matrice autoproduite composée principalement de polysaccharides et adhérent à une surface (vivante ou inerte). Dans la plupart des biofilms, les micro-organismes ne représentent que 10% de la masse sèche alors que la matrice peut en représenter plus de 90% (Flemming and Wingender 2010; Satpathy *et al.* 2016). Cette matrice consiste en un agglomérat de différents types de polymères appelés substances polymériques extracellulaires (EPS²⁸). Ces EPS peuvent représenter de 50 à 90% du carbone organique total des biofilms et peuvent être considérées comme le matériau principal du biofilm. Les biofilms contiennent aussi de l'ADN extracellulaire qui fait partie intégrante de la matrice. L'origine de cet ADN semble différer selon les espèces bactériennes formant le biofilm. Toutefois, la lyse cellulaire n'est pas la seule source et la sécrétion active ne peut être exclue (Donlan 2002; McDougald *et al.* 2012; Arciola *et al.* 2018).

1. Composants d'un biofilm

Les cellules d'un biofilm sont entourées d'EPS (Figure 31) dont la fraction majeure est constituée par des polysaccharides. Certains exopolysaccharides sont des homopolysaccharides, notamment des glucanes et fructanes dérivés du saccharose et de la cellulose. Néanmoins, la plupart des exopolysaccharides sont des hétéropolysaccharides constitués d'un mélange de résidus de sucres neutres et chargés (Skillman *et al.* 1998). Les EPS contiennent aussi d'autres molécules telles que des protéines, des lipides et des acides nucléiques. La matrice peut contenir de grandes quantités de protéines qui, prises ensemble,

²⁸ EPS : Extracellular Polymeric Substances

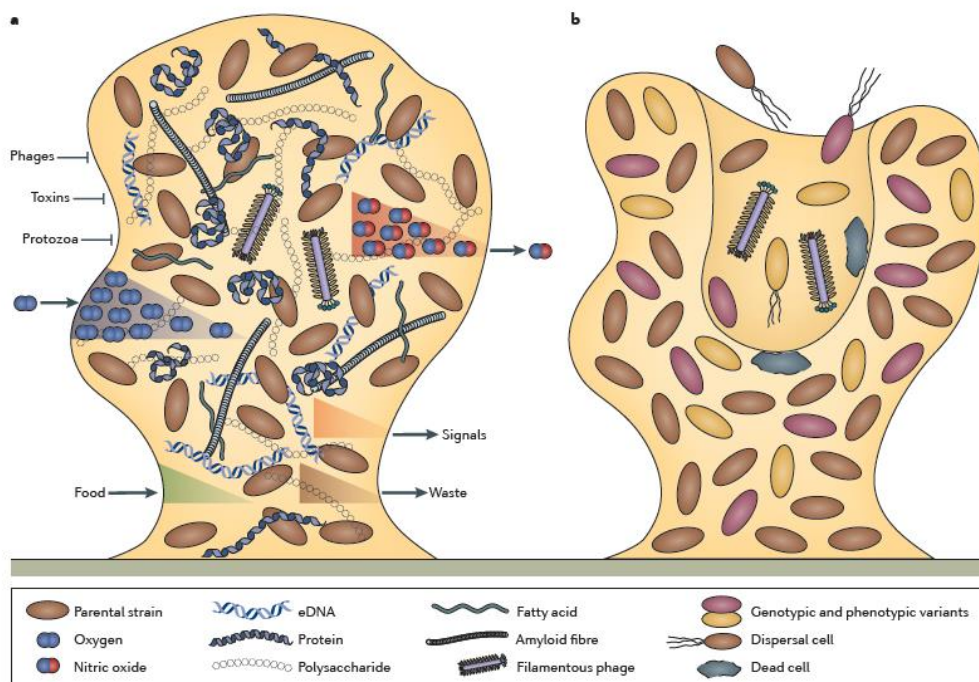


Figure 32 La structure complexe des biofilms bactériens (McDougald et al, 2012).

a) Les micro-colonies présentes dans le biofilm mature sont caractérisées par une matrice de substances polymères extracellulaires (EPS), composée d'ADN extracellulaire (ADNe), de polysaccharides, de protéines, de fibres amyloïdes et de bactériophages. La matrice de EPS agit comme un bouclier pour protéger la communauté bactérienne ou la population contre les prédateurs tels que les protozoaires ou les phages lytiques, ainsi que contre les toxines chimiques (par exemple, les biocides et les antibiotiques). La matrice EPS peut aider à séquestrer les nutriments et, avec les bactéries sous-jacentes, est également responsable de l'établissement de gradients (par exemple, l'oxygène et les nutriments diffusant vers l'intérieur, et les déchets ainsi que des signaux tels que l'oxyde nitrique diffusant vers l'extérieur).

b) Au moment de la dispersion, les micro-colonies subissent une mort cellulaire et une lyse, ainsi qu'une dispersion active de bactéries mobiles, laissant les micro-colonies creuses.

peuvent dépasser la masse de polysaccharides contenue (Conrad *et al.* 2003). Des polymères tels que des glycopeptides et des lipopolysaccharides forment un échafaudage et maintiennent le biofilm (Flemming and Wingender 2010).

Diverses enzymes peuvent potentiellement dégrader des composants des EPS lorsqu'il y a épuisement des nutriments au sein du biofilm. Les exopolysaccharides sont principalement dégradés par les hydrolases et les lyases, mais leur dégradation est lente. Les substrats de ces enzymes extracellulaires comprennent des polymères hydrosolubles et des composés insolubles dans l'eau (cellulose, chitine, lipides), ainsi que des particules inorganiques piégées dans le biofilm. Les enzymes extracellulaires peuvent être efficacement retenues dans la matrice du biofilm par leur interaction avec les polysaccharides. Cet arrangement conserve l'activité enzymatique à proximité des cellules bactériennes, leur permettant d'absorber les produits enzymatiques en tant que nutriments. De plus, les interactions entre les enzymes et les exopolysaccharides structuraux améliorent la thermostabilité des enzymes et leur résistance à la protéolyse (Flemming and Wingender 2010).

Les protéines non enzymatiques de la matrice telles que les lectines (protéines de liaison aux glucides extracellulaires) participent à la formation et à la stabilisation du réseau et constituent un lien entre la surface bactérienne et les EPS extracellulaires. Les autres composants protéiques ubiquitaires de la matrice sont notamment des curli (fibres amyloïdes) qui sont impliqués dans l'adhésion aux surfaces et fonctionnent également comme cytotoxines pour les cellules végétales et certaines bactéries (Otzen and Nielsen 2008) (Figure 32).

Enfin, les appendices bactériens protéiques tels que les pili, fimbriae, curli et flagelles peuvent également agir en tant qu'éléments structurels en interagissant avec d'autres composants de la matrice. Par exemple, chez *S. Typhimurium* et *E.coli*, la co-production de pili agrégatifs et de cellulose entraîne la formation d'une matrice extracellulaire rigide et hydrophobe (Zogaj *et al.* 2001).

2. Avantages des biofilms

Les EPS immobilisent les cellules bactériennes du biofilm et les maintiennent à proximité, permettant ainsi des interactions intenses. Cette proximité des cellules est idéale pour la création de gradients de nutriments, l'échange de gènes et la détection d'un quorum nécessaire à une action collective des bactéries (quorum-sensing). Les biofilms peuvent être composés d'une seule ou de plusieurs espèces, facilitant la mise en place de mutualisme ou de coopération (interactions écologiques) entre les différents métabolismes bactériens (Donlan 2002). Comme vu précédemment, la présence d'enzymes dégradant les composants des EPS font de la matrice un système digestif externe qui va décomposer les biopolymères en produits de plus faible masse moléculaire. La matrice EPS a aussi un rôle de barrière physique. Elle contribue à la résistance aux antimicrobiens en empêchant le transport massif d'antibiotiques à travers le biofilm (Donlan 2000). C'est aussi un environnement hautement hydraté qui se déshydrate plus lentement que son environnement, ce qui protège les cellules du biofilm des fluctuations hydriques (Roberson and Firestone 1992). Enfin, les biofilms sont aussi un haut lieu d'échange de matériel génétique. En effet, la conjugaison se produit plus rapidement entre les cellules d'un biofilm qu'entre des cellules planctoniques. Il a été démontré que le pilus conjugatif du plasmide F joue un rôle de facteur d'adhésion pour les interactions surface et cellule (Ghigo 2001).

3. Dispersion du biofilm

Bien que le biofilm apporte des avantages non négligeables aux bactéries, sa croissance peut finir par contrarier la survie des bactéries. En effet, à mesure que le biofilm grandit, certaines cellules s'éloignent de l'interface avec le milieu et ainsi, des sources essentielles d'énergie et de nutriments circulants. Bien que le biofilm, par dégradation de la matrice EPS, produise des nutriments, cela entraîne sa diminution et demande aux bactéries d'utiliser de l'énergie pour reconstituer le biofilm, ce qui entraîne de nouveau un besoin de nutriment. De plus, l'accumulation de déchets et de toxines représente une menace supplémentaire pour la survie bactérienne. Il faut donc un moyen pour les bactéries de s'échapper de ce biofilm (Figures 30 et 31). Il existe ainsi au moins trois types de « fuite » différents que sont la désorption, le détachement et la dispersion.

La désorption est le transfert direct des bactéries de la matrice au milieu extérieur. Elle peut être observée aux premiers stades du développement du biofilm lorsque le premier contact entre les bactéries et la surface est initié (Petrova and Sauer 2016).

Le détachement a longtemps été considéré comme le processus principal limitant le développement d'un biofilm (Van Loosdrecht *et al.* 1997). Il se produit lorsque les forces externes, telles que la contrainte de cisaillement, deviennent trop élevées, ou au contraire, trop faibles pour maintenir la structure du biofilm. Quatre mécanismes distincts permettant le détachement des cellules ont été décrits. Il s'agit de l'abrasion, du pâturage, de l'érosion et de la « mue » (sloughing). L'abrasion est la libération des cellules d'un biofilm à la suite de collisions avec des particules présentes dans le milieu extérieur. Le pâturage est la prédation par des micro-organismes eucaryotes (protozoaires par exemple). L'érosion, quant à elle, est la perte continue de petites portions de biofilm à cause des forces de cisaillement du fluide. Les organismes se trouvant près de l'interface biofilm / liquide sont les seuls sensibles à cette forme de détachement. Bien que similaire à l'érosion, la mue fait référence à l'élimination de morceaux de biofilms intacts ou de tout le biofilm par des forces de friction (Petrova and Sauer 2016).

Le troisième mécanisme de libération cellulaire est le processus de dispersion. Il se distingue de la libération passive par l'implication de détection de signaux et leur transduction à travers des réseaux de régulations. Ces signaux vont permettre des changements physiologiques facilitant la libération cellulaire des biofilms. La dispersion, au contraire des deux autres mécanismes qui nécessitent des facteurs exogènes affaiblissant la matrice, nécessite la production directe par les bactéries du biofilm d'enzymes dégradant la matrice (Petrova and Sauer 2016). En fonction de la source des signaux de déclenchement, deux types de dispersion vont être distingués : « native et induite ». La dispersion « native » se produit lors de la détection de molécules de signalisation auto-synthétisées par les bactéries. Elle est généralement considérée comme le stade terminal de développement d'un biofilm, et peut conduire à la translocation des bactéries vers de nouveaux sites de colonisation. Après différenciation des cellules à l'intérieur des micro-colonies (le biofilm étant formé de nombreuses micro-colonies côte à côte) en un phénotype mobile, et de la périphérie en « phénotype de paroi » non mobile, les cellules évacuent le biofilm de manière coordonnée par des points de rupture locaux. Cette dispersion implique rarement le biofilm entier.

Généralement, seules des micro-colonies ou des zones ciblées la subissent, de manière souvent dépendante du diamètre de la micro-colonie. La dispersion « induite » est déclenchée par des facteurs et des modifications de l'environnement externe. Elle se produit après la détection de conditions externes défavorables telles qu'un appauvrissement en nutriment (carence nutritive) ou un stress oxydatif. Cette dispersion coïncide avec l'élimination de 80% ou plus de la biomasse du biofilm (Petrova and Sauer 2016).

I. Les bactéries Viables Non Cultivables

L'état viable non cultivable des bactéries (VNC) est un état particulier où les bactéries sont toujours en vie (elles conservent une activité métabolique faible), mais ont perdu leur capacité à produire de la biomasse et ne parviennent plus à se développer dans les conditions normales de culture (pas de revivification classique possible). Cet état physiologique peut être atteint à la suite de plusieurs stress simultanés et peut expliquer une persistance inattendue des bactéries, non détectable par des méthodes culturales (Ayrapetyan *et al.* 2018). L'état VNC a été décrit chez de nombreuses bactéries non pathogènes et pathogènes (Oliver 2005a).

1. Induction de cet état

Les cellules entrent en état de VNC en réponse à plusieurs stress environnementaux et/ou chimiques (le plus souvent simultanés), la liste des nombreux facteurs étant variée. Elle comprend la privation de nutriments (Cook and Bolster 2007), une température de croissance en dehors de la normale (Besnard *et al.* 2002), des variations dans la concentration en oxygène, la présence de métaux lourds et même l'exposition à la lumière blanche ou un choc osmotique. Ces stress seraient mortels si les cellules ne se mettaient pas dans cet état. Ainsi, certains processus supposés bactéricides, comme la pasteurisation du lait (Gunasekera *et al.* 2002) ou la chloration des eaux usées (Oliver *et al.* 2005), peuvent entraîner l'entrée des bactéries dans l'état VNC.

Il fut établi que le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) pouvait jouer un rôle important dans l'induction de l'état VNC. Il a été déterminé que certaines cellules de *E.coli* ayant perdu leur capacité de croître sur un milieu solide pouvaient être à nouveau cultivables lorsqu'elles étaient sur un milieu comprenant de la catalase ou du peroxyde de sodium (Mizunoe *et al.* 1999). Il a aussi été constaté que, chez la bactérie *Vibrio vulnificus*, les basses températures, induisant la perte

de la capacité de culture, empêchent aussi l'activité de la catalase et sa synthèse *de novo*, ce qui rend les cellules très sensibles au peroxyde présent dans le milieu de culture (Oliver 2005b). Ainsi l'induction de l'état VNC serait, notamment, directement lié à un stress oxydatif.

Dans cet état, il peut être observé une diminution importante du transport des éléments nutritifs, de la vitesse de respiration et de la synthèse protéique (Oliver 2005b). La biosynthèse ne cesse toutefois pas. De nouvelles protéines peuvent être formées et l'expression des gènes continue. Le taux d'ATP reste élevé, ainsi que le potentiel membranaire. Il y a aussi des modifications importantes dans la composition en acides gras membranaires et des réarrangements dans les membranes externes et les parois cellulaires des bactéries, notamment chez *E.coli* (Signoretto *et al.* 2002; Muela *et al.* 2008).

2. Sortie de l'état VNC

Il a été rapporté que les bactéries peuvent rester à l'état de VNC pendant de longues périodes (mois ou années). Ainsi, *Pseudomonas fluorescens* peut rester dans cet état dans le sol pendant plus d'un an (Oliver 2005b) et *Vibrio fluvialis* (bactérie marine) a pu être « réanimée » 6 ans après le passage en VNC dans des sédiments marins (Amel *et al.* 2008). L'état de VNC ne peut être considéré comme un moyen de survie que si les cellules sont capables de redevenir cultivables, et de retrouver un état de croissance végétatif normal. Les conditions de sortie de cet état sont généralement peu maîtrisées et mal connues, mais ont été les plus étudiées chez *V. vulnificus*, dont l'état de VNC est induit par incubation à des températures inférieure à 10°C. Un simple changement de température entraîne la réanimation des cellules (Oliver *et al.* 1995).

3. VNC, antibiorésistances et TIAC

L'une des conséquences de l'entrée des agents pathogènes dans l'état VNC, en plus de l'impossibilité de détection par les méthodes culturales classiques, est la résistance aux antibiotiques (Ayrapetyan *et al.* 2018). Il est envisageable que ces cellules, ayant une activité métabolique très faible, deviennent résistantes aux antibiotiques, tout en étant capables de se réactiver et d'initier une infection. A la suite de différents travaux (Rivers and Steck 2001), des résultats ont suggéré que des bactéries *E.coli* uropathogènes, non détectées par méthode culturale standard, n'avaient pas été éliminées par les traitements antibiotiques. En effet, ces

cellules, ont provoqué ensuite des infections récurrentes, indiquant un retour à un état métabolique actif.

Le fait que les cellules à l'état de VNC soient capables ou non de provoquer une infection humaine est un aspect très important de cet état physiologique. Il semble que la virulence soit préservée et que l'infection ne soit initiée qu'après « réanimation », lorsque les activités métaboliques sont pleinement actives. Par exemple, il a été constaté que les bactéries VNC de *Vibrio harveyi* cessaient d'exprimer le gène de l'hémolysine et ne causaient pas la mort des poissons zèbres lorsqu'elle était inoculée. Cependant, après réactivation (par augmentation de la température), les cellules deviennent létales ce qui indique que les bactéries à l'état VNC ont gardé leur pouvoir pathogène (Sun *et al.* 2008). Suite à une TIAC provoquée par *E.coli* O157:H7 au Japon en 1998, environ 0.75 – 1.5 cellule cultivable semblait être responsable de la contamination, un nombre jugé trop faible pour l'infection. Cependant, la preuve qu'un plus grand nombre de bactéries existant à l'état VNC dans les sushis impliqués et qu'elles étaient à l'origine de la TIAC a été apportée (Makino *et al.* 2000).

D. Sources et voies de contamination des plantes par des bactéries entériques multirésistantes aux antibiotiques et/ou pathogènes

Nous venons de voir que les bactéries sont capables de s'adapter, ou au moins de survivre, par diverses stratégies aux nouveaux environnements parfois défavorables qu'elles peuvent rencontrer. Ceci peut aider à comprendre comment elles sont capables de survivre sur les végétaux. La question qui reste est de savoir comment elles sont capables d'entrer en contact avec les plantes.

I. Les sources de contamination des productions végétales

Les sources et les voies de contamination des produits végétaux varient selon le site de production. En effet, chaque exploitation présente une combinaison distincte de facteurs de risques environnementaux tels que la topographie, l'utilisation des sols ou même le climat, mais présentent aussi des facteurs de risque liés aux itinéraires techniques appliqués

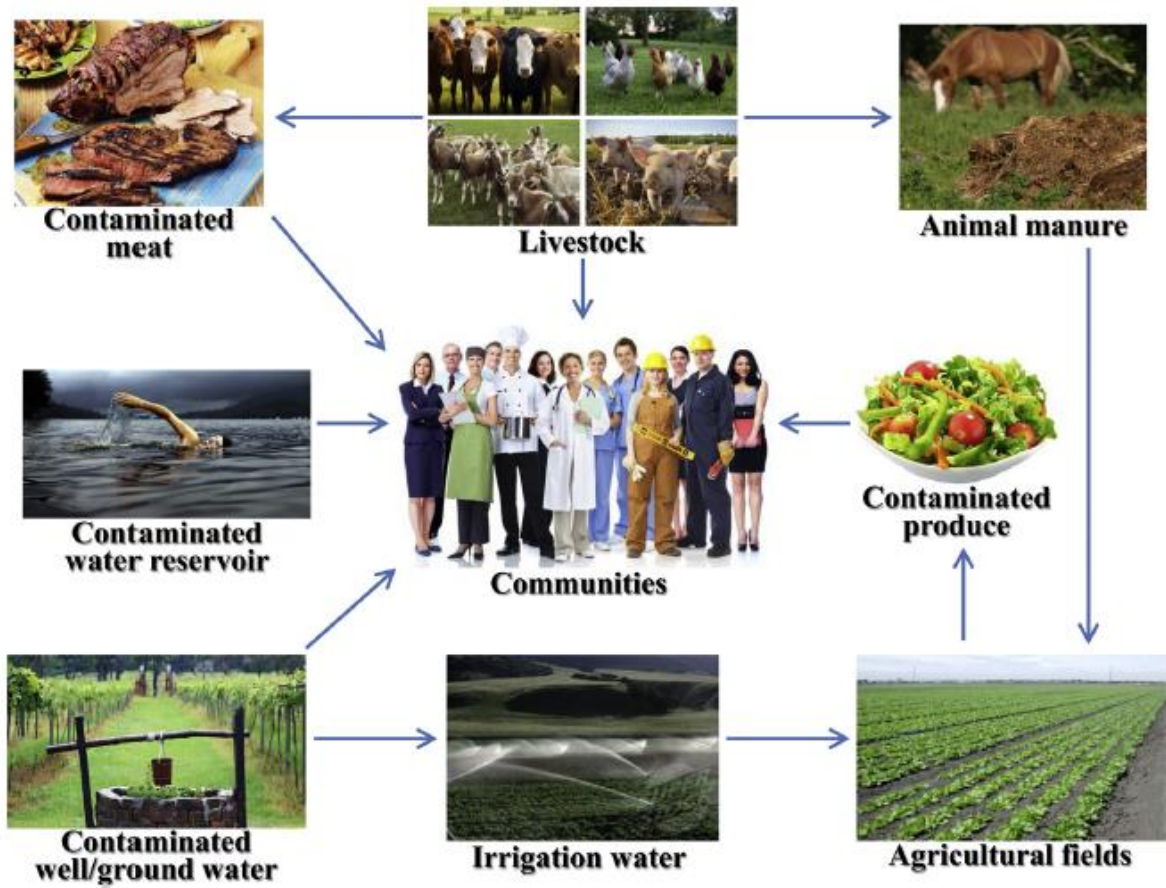


Figure 33 : Voies de circulation et de contamination par des bactéries pathogènes entériques (Amézquita-López et al. 2018)

(irrigation, épandage, ...). La combinaison de ces facteurs de risques particuliers influe sur la fréquence et la transmission d'agents pathogènes d'origine alimentaire, puis sur le risque de contamination des produits (Strawn *et al.* 2013). Les agents pathogènes peuvent contaminer les produits sur le terrain par diverses voies, notamment : les dépôts atmosphériques, l'utilisation de fumier et de compost bruts (ou mal traités), l'exposition à de l'eau contaminée souterraine ou de surface, le transfert par des insectes ou la contamination fécale générée par le bétail ou des animaux sauvages (Harris *et al.* 2003; Cooley *et al.* 2007; Lynch *et al.* 2009; Uyttendaele *et al.* 2015; Amézquita-López *et al.* 2018) (Figure 33).

1. Le sol

L'utilisation de matières organiques, telles que les fèces du bétail, les déchets d'abattoirs, les boues d'épuration, ainsi que le traitement des déchets industriels et municipaux, comme amendements pour le sol est assez répandu (Avery *et al.* 2005). Ces amendements constituent une très grande réserve d'éléments nutritifs et enrichissent le sol, parfois appauvri par une surexploitation. Cependant, ils véhiculent aussi des bactéries entériques, potentiellement pathogènes pour l'Homme, qui peuvent aller contaminer les cultures. Sur des champs de pâturage, Avery *et al.* (2004b) ont montré que *E.coli* pouvait persister pendant 5 à 6 mois sur l'herbe malgré un taux de réduction décimal moyen de 38 jours.

De nombreuses études rapportent la présence de *E.coli* et *Salmonella* dans le fumier et le lisier (Hess *et al.* 2004; Avery *et al.* 2005) et montrent leur persistance dans le sol après épandage. Il a ainsi été démontré que *E.coli* pouvait survivre au moins deux mois après application de fumier dans le sol (Cools *et al.* 2001; Avery *et al.* 2005; Côté and Quessy 2005) et *Salmonella a minima* 6 semaines (Côté and Quessy 2005; Holley *et al.* 2006; Barak and Liang 2008). Cependant, il peut exister de grandes disparités dans les taux de survie pour une même bactérie et plusieurs facteurs peuvent intervenir. Par exemple, la composition du fourrage donné au bétail va modifier la composition du fumier obtenu et avoir un impact sur la survie des bactéries. Franz *et al.* (2005) ont démontré que *E. coli* O157:H7 présentait un déclin plus rapide dans un fourrage à base de paille que dans un fourrage à base d'herbe, facilement digérée, et de maïs. Ainsi, la teneur en fibre et le pH du fumier va avoir un impact important sur la survie de *E.coli* (Franz *et al.* 2005).

Pour limiter la potentielle contamination fécale de l'environnement, les fumiers peuvent subir des traitements tels que le compostage, qui est le plus utilisé. Le compostage consiste en une dégradation des matières organiques en conditions contrôlée. Cette dégradation provoque une augmentation de la température au sein du compost, permettant de diminuer la densité bactérienne. Cependant, des études démontrent que ces techniques ne sont pas toujours efficaces. Ainsi, pour des températures aux alentours de 50°C, une baisse initiale de la densité bactérienne est observée avec une repousse ultérieure lorsque le compost refroidit (Hess *et al.* 2004).

Le fumier et le compost sont généralement incorporés dans le sol. La nature du sol va alors jouer un rôle important dans la survie des pathogènes. De nombreuses études ont montré que les sols plutôt sableux filtraient et renaient mieux les micro-organismes que les sols argileux où les bactéries traversent rapidement au niveau de fissures pour se retrouver dans les eaux souterraines (Cools *et al.* 2001; Côté and Quessy 2005; Lang and Smith 2007; Sharma *et al.* 2016). La profondeur d'incorporation va également être déterminante dans la survie des bactéries. En effet, il semble que *E. coli* O157:H7 survivent mieux en surface que dans le sol (à 25 cm de profondeur) (Avery *et al.* 2004a). De plus, le taux d'humidité du sol et la température entrent aussi en jeu. Ainsi, il a été montré qu'avec un taux d'humidité de 100% et une température de 5°C, *E. coli* pouvait être détectée dans le sol jusqu'à 80 jours, alors qu'avec une humidité de 60% et une température de 25°C, la limite de détection est de 38 jours (Cools *et al.* 2001). Enfin, les bactéries endogènes du sol entrent en compétition avec les bactéries pathogènes, diminuant ainsi leur chance de survie. Dans un sol autoclavé supplémenté avec du fumier, *E. coli* O157:H7 survit jusqu'à 77 jours à 5°C et 231 jours à 21°C. Cependant, dans le même sol mais non autoclavé, les bactéries ont décliné plus rapidement du fait de la présence des bactéries autochtones et de la prédation par des protozoaires (Jiang *et al.* 2002).

Les *E. coli* provenant de contaminations fécales peuvent donc survivre de longues périodes en dehors du tractus intestinal et sont même capables de s'y multiplier dans des climats tempérés (Ishii and Sadowsky 2008). Cette installation peut s'expliquer en partie par la formation de biofilm (évoquée plus haut) qui vont protéger les bactéries entériques des

conditions environnementales hostiles comme les rayonnements UV, la dessiccation, les prédateurs protozoaires et chimiques (désinfections et antibiotiques) (Lee *et al.* 2006; McDougald *et al.* 2012). Il semblerait même que certaines puissent être « naturalisées » c'est-à-dire devenir une partie de la microflore endogène des environnements (Ishii *et al.* 2006).

2. L'eau d'irrigation

L'eau d'irrigation est largement identifiée comme potentielle source de contamination des productions végétales (Uyttendaele *et al.* 2015). Il existe différentes eaux d'arrosage : l'eau de ville (issue du réseau de distribution d'eau potable), qui est la plus propre, mais aussi la plus coûteuse, ensuite, les eaux souterraines qui sont plus ou moins protégées des contaminations bactériennes en fonction du sol se trouvant en couverture, suivies des eaux de surface (fleuves, rivières, mares, lacs) et des eaux de pluie récupérée dans des bassins de stockage. Le fait que ces deux dernières ressources soient ouvertes à l'environnement les rend plus vulnérables que les autres. Les bassins de stockage à l'air libre, se transformant souvent en mares ou étangs (eaux stagnantes), permettent le développement d'une faune qui va venir contaminer l'eau par excrétion de fèces. De plus, les bactéries pathogènes ont tendance, lorsqu'elles survivent, à s'intégrer aux sédiments aquatiques. Ainsi, il a été montré qu'il pouvait y avoir 10 à 1000 fois plus de bactéries dans les sédiments que dans l'eau prélevée au même moment, montrant un effet d'accumulation (Benjamin *et al.* 2013). Les fleuves et rivières, quant à eux, sont souvent le réceptacle des effluents de STEP et la destination finale des eaux de ruissellement du bassin versant. Ainsi, leurs eaux véhiculent fréquemment un nombre important de bactéries d'origine fécale (Laroche *et al.*, 2009). Les eaux souterraines sont, elles, sujettes à la contamination par lixiviation²⁹ du sol, à la suite des phénomènes de ruissellement qui entraînent les bactéries non seulement vers les cours d'eau, mais aussi, parfois, vers les eaux profondes. Les fortes pluies, provoquant plus de ruissellements et de lixiviation des sols et augmentant le débit des eaux courantes, élèvent l'apport de pathogènes dans les eaux. En effet, des études ont démontré que *E.coli* O157 :H7 peut être retrouvée à 135 m d'une source de contamination et qu'en période de fortes précipitations, elle peut se déplacer jusqu'à 32 km de la source (Cooley *et al.* 2007). A la différence des sols, où la survie

²⁹ Lixiviation : infiltration lente de l'eau dans le sol permettant la dissolution de composés solides. Ici, ce phénomène s'accompagne d'une remise en suspension des bactéries présentes dans le sol.

est plus importante à basse température, dans l'eau, les bactéries survivent mieux lors des périodes chaudes (Fonseca *et al.* 2011).

Concernant les techniques d'irrigation, il existe différentes méthodes : en goutte à goutte, en sillons et en aspersion. Ces types d'irrigation ont été analysés quant à leur potentielle implication dans la contamination microbienne des produits végétaux. Il en est ressorti que l'aspersion est une plus grande source de contamination que le goutte à goutte ou les sillons (Fonseca *et al.* 2011).

3. Place de l'antibiorésistance dans les contaminations

La place centrale des eaux environnementales dans la dissémination des bactéries d'origine fécale dans les écosystèmes leur confère également un rôle majeur dans la propagation de l'antibiorésistance et l'alimentation du résistome environnemental³⁰. Il est de plus en plus souvent avancé dans la littérature que certaines bactéries pathogènes multirésistantes pourraient émerger du « melting-pot » environnemental grâce aux échanges génétiques entre populations autochtones et allochtones (von Wintersdorff *et al.* 2016; Manaia 2017; Larsson *et al.* 2018, Camiade *et al.*, en cours de soumission et présenté en annexe de ce travail). En effet, le microbiote intestinal humain ou animal, soumis à la pression de sélection des traitements antibiotiques, héberge de nombreuses bactéries antibiorésistantes (Looft *et al.* 2012). La contamination fécale de l'environnement ne doit donc pas seulement être crainte pour l'émission des pathogènes entériques, mais aussi pour sa forte contribution à la circulation de l'antibiorésistance (bactéries ou gènes).

Dans ce cadre, de nombreuses études ont porté sur la recherche de *E. coli*, résistante et multi-résistante dans l'environnement, et plus particulièrement, dans les eaux de surface et souterraines. En 2009, Laroche *et al.* ont révélé la présence permanente de *E. coli* dans la Seine dont 43% étaient résistantes à au moins un antibiotique. Des échantillonnages dans des eaux souterraines karstiques en période sèche ont révélé des isolats de *E. coli* en faible densité et qui ne présentaient pas de résistances. Cependant, lors d'évènements pluvieux, la moitié ou plus de la population de *E. coli* retrouvée possédait des résistances aux antibiotiques

³⁰ Résistome environnemental : Ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques et des microorganismes porteurs présents dans l'environnement

dont 50% des multi-résistances (résistance à au moins 3 antibiotiques). Cette contamination par des *E. coli* résistantes provenait de l'engouffrement d'eaux de surface contaminées dans les hydrosystèmes karstiques (Laroche *et al.* 2009; Flores Ribeiro *et al.* 2012). Nous reviendrons plus loin sur ces travaux réalisés au laboratoire. Un suivi des *E. coli* antibiorésistantes durant 1 an sur la rivière Zenne, en amont et aval d'une zone urbaine, a montré une augmentation de la densité de *E. coli* de l'amont vers l'aval de la rivière. Cette augmentation de densité était accompagnée d'une augmentation des bactéries antibiorésistantes (Proia *et al.* 2018). Ceci montre l'impact que peut avoir une zone urbaine, notamment avec les rejets de STEP, sur la qualité microbiologique de l'eau et la dissémination de l'antibiorésistance. En effet, les STEP sont considérées comme étant des « réacteurs génétiques bactériens » dans lesquels les échanges génétiques sont actifs et réguliers (Baquero *et al.* 2008).

II. La survie des pathogènes sur les végétaux

Plusieurs facteurs environnementaux vont contribuer, ou non, à la survie des bactéries entériques pathogènes et à leur transport jusqu'aux végétaux. Si ces bactéries persistent dans l'environnement, comment se comportent-elles sur les végétaux et quels mécanismes de défense les plantes possèdent-elles face aux envahisseurs ?

La survie des bactéries va dépendre, bien entendu, des types de plantes infectées, des zones contaminées, de la souche bactérienne et des conditions environnementales. Cependant, il existe des voies d'entrée possibles des pathogènes entériques dans les plantes, leur permettant de se protéger des conditions extérieures. On peut ainsi retrouver les ouvertures naturelles (stomates, lenticelles, sites d'émergence des racines), des blessures provoquées par des facteurs biotiques et abiotiques, ou encore les transports hydriques des racines aux feuilles (Deering *et al.* 2012; Hirneisen *et al.* 2012).

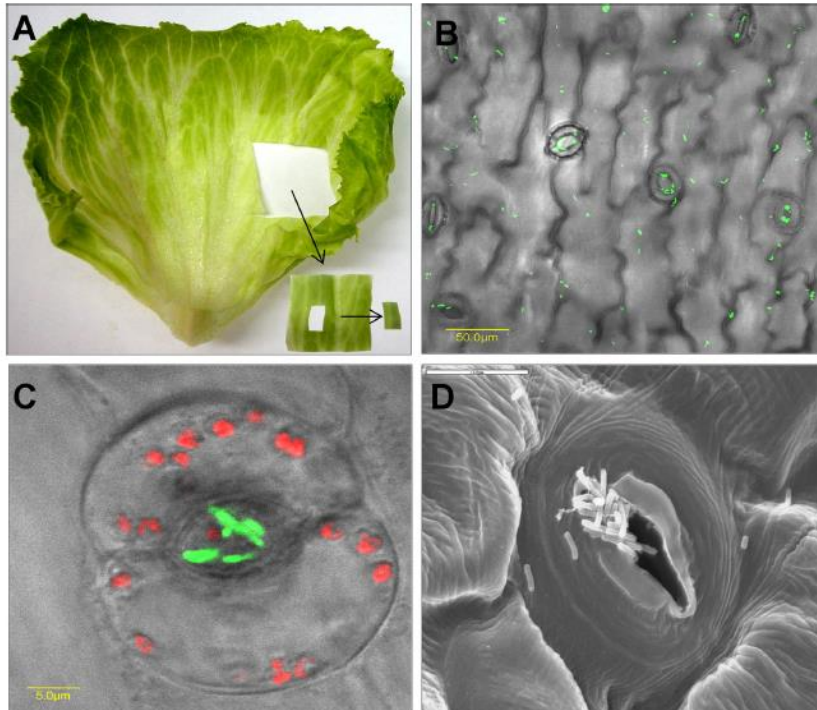


Figure 34: Présence de Salmonella enterica à la surface d'une feuille de laitue (Kroupitski et al., 2009a)

1. Attachement et internalisation des bactéries entériques pathogènes aux végétaux

La surface des feuilles n'est pas un environnement accueillant pour les bactéries. L'environnement foliaire est exposé à une forte dose d'UV, ainsi qu'à des fluctuations de température et d'humidité qui peuvent altérer la viabilité bactérienne (Heaton and Jones 2008). Cette surface constitue la première barrière de la plante contre les bactéries grâce à la présence de cuticule et d'une paroi cellulaire. Cependant, l'attachement bactérien existe bel et bien. Premièrement, l'architecture de la feuille n'est pas uniforme, ce qui offre des conditions environnementales différentes potentiellement favorables aux microorganismes. Il existe ainsi des renflements et des creux formés par des veines, poils ou trichomes et stomates, qui vont former des microsites pour la survie bactérienne, avec une disponibilité accrue en eau et en nutriments, ainsi qu'une protection contre la température et les rayons UV (Brandl and Amundson 2008; Kroupitski *et al.* 2009b; Barak *et al.* 2011). Par exemple, *S. enterica* a été retrouvée sur la surface de feuilles de coriandre au niveau des veines (Brandl and Mandrell 2002) ou des stomates (Figure 34) (Kroupitski *et al.* 2009a). Deuxièmement, la surface foliaire peut être fragilisée par des fissures ou l'action d'insectes, ce qui favorise l'accrochage bactérien, tout comme l'action de bactéries phytopathogènes, qui peuvent augmenter la pénétration des bactéries entériques pathogènes dans les plantes, en raison de la perturbation de la cuticule et de la libération de nutriments (Heaton and Jones 2008; Lim *et al.* 2014). L'attachement de *E.coli* O157:H7 et de *Salmonella* est plus largement observé chez les *Brassicaceae* que chez la laitue, ce qui peut suggérer que certaines plantes sont plus sujettes que d'autres à la contamination (Warriner and Namvar 2010).

Les bactéries en contact des plantes peuvent être internalisées, aussi bien au niveau des racines que des feuilles, par des mécanismes plus ou moins actifs, comme détaillé ci-dessous.

Les stomates sont des pores naturels, abondants dans l'épiderme des plantes, assurant les échanges gazeux avec le milieu extérieur. Ils peuvent servir de points d'entrée aux bactéries pour coloniser l'intérieur des végétaux (espace intercellulaire, xylème et phloème). *E.coli* O157:H7 et *Salmonella enterica* peuvent coloniser l'apoplasme des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* après incubation en surface (Roy *et al.* 2013). Il a aussi été montré par

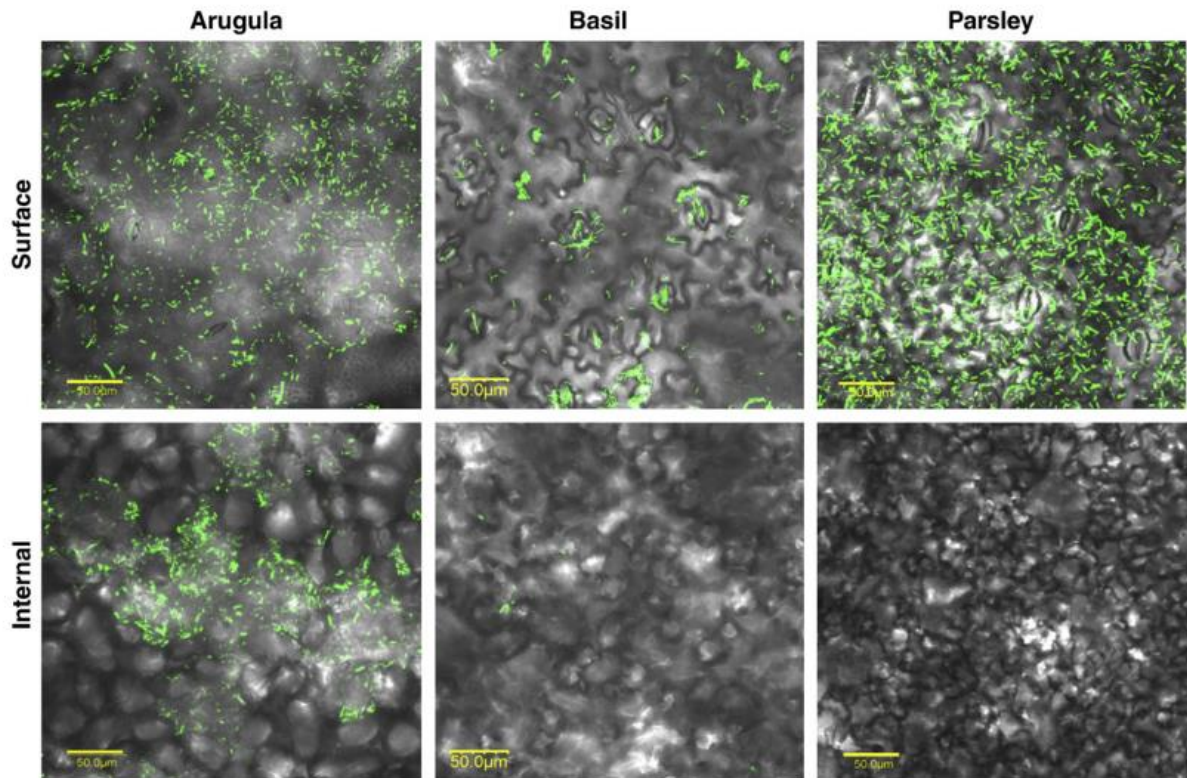


Figure 35: Internalisation de Salmonella dans différentes plantes (Roquette, Basilic, Persil) (Golberg et al. 2011)

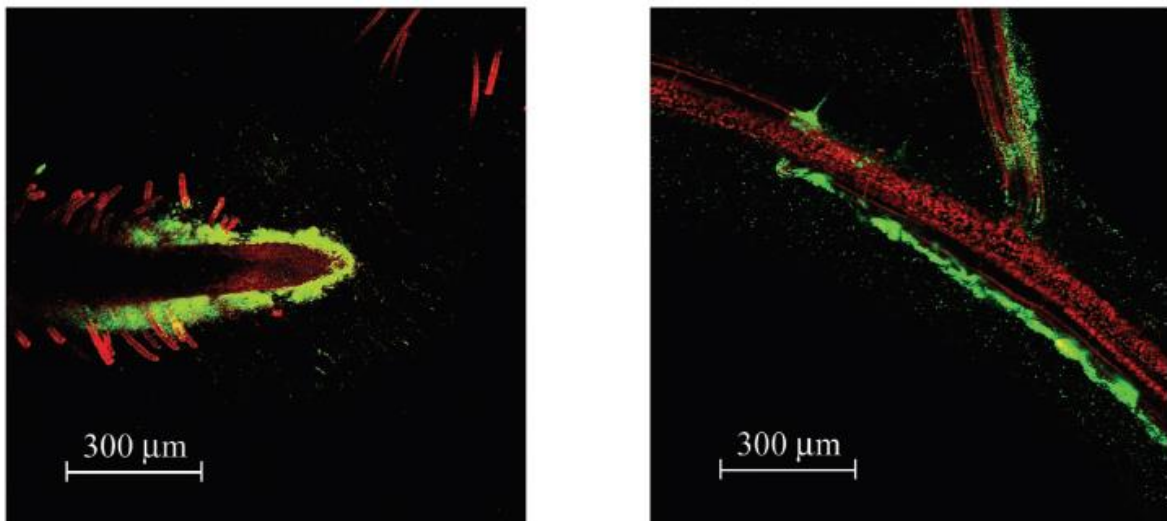


Figure 36: Colonisation des racines par des E.coli (Cooley et al. 2003)

microscopie que *S. Typhimurium* pénètre dans la laitue iceberg *via* les stomates et que ces bactéries sont situées dans l'espace sous-stomatique (Figure 35) (Golberg *et al.* 2011).

L'internalisation peut être une interaction spécifique. Pour vérifier cela, un mélange de cinq sérotypes de *Salmonella* a été inoculé sur des plants de tomate placés en hydroponie. Les sérotypes Montevideo et Michigan étaient plus répandus dans les tissus, tandis que Enteridis, Hartford et Poona n'ont été détectés dans aucun des échantillons (Guo *et al.* 2001). De plus, de nombreux sérotypes de *Salmonella* se lient aux plantes de manière significativement supérieure à *E.coli*. L'incapacité de *E.coli* à réduire son métabolisme pour s'adapter à de faibles niveaux de nutriments contribue à la diminution de sa compétitivité et de sa survie par rapport à *Salmonella* (Beuchat 2002; Franz and Bruggen 2008).

La rhizosphère est un écosystème complexe et dynamique qui héberge une grande diversité de micro-organismes dont l'assemblage est guidée par les exsudats racinaires (Philippot *et al.* 2013; Steinauer *et al.* 2016; Kumar and Verma 2018). Klerks *et al* ont montré que les exsudats émis par les racines de laitue (*Lactuca sativa*) attirent *S. enterica* (Klerks *et al.* 2007a). Les bactéries peuvent ensuite entrer dans les tissus par des sites situés au niveau de l'émergence des racines latérales et de crevasses (Dong *et al.* 2003; Cooley *et al.* 2003; Klerks *et al.* 2007b; Tyler and Triplett 2008), et dans certains cas, entrer dans les cellules de l'épiderme racinaire (Klerks *et al.* 2007b) (Figure 36).

Une étude détaillée de la localisation de *E.coli* O157:H7 dans les tissus racinaires vivants montre qu'elle peut coloniser la paroi cellulaire, l'apoplasme et le cytoplasme (Wright *et al.* 2013; 2017).

Enfin, des études tendent à montrer que les graines pourraient être un contaminant primaire des végétaux. Il est ainsi possible que des bactéries entériques soient transmises des graines contaminées aux plantes matures tout au long du cycle de vie de la plante. La contamination peut alors être transférée à la nouvelle semence et ainsi se perpétuer au sein de la culture (Liu *et al.* 2018; Jo and Park 2019).

2. Bactéries entériques et défenses des plantes

Les plantes ne sont pas sans défense face aux bactéries et possèdent un système immunitaire inné complexe. Une première ligne de défense, dite passive, inclut des barrières

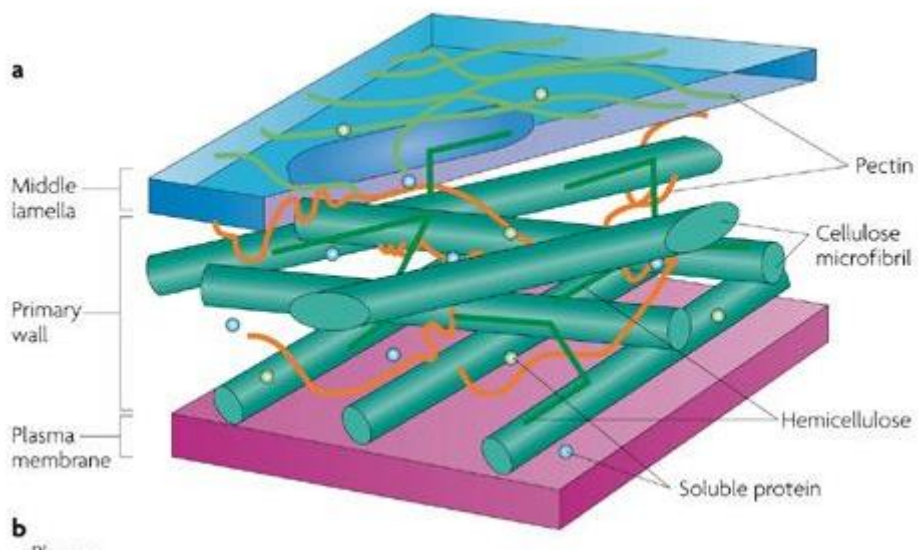


Figure 37 : Constitution de la paroi végétale (d'après Sticklen, 2008)

physiques constitutives telles que la cuticule, les trichomes, la paroi cellulaire ou les cellules frontières de la racine (Levin 1973; Vorwerk *et al.* 2004; Driouich *et al.* 2013; Serrano *et al.* 2014; Driouich *et al.* 2019), tandis que la deuxième ligne se met en place lorsque l'agresseur ou envahisseur est détecté et reconnu.

a. La paroi végétale, première barrière de défense

La paroi végétale est l'une des premières barrières physiques contre l'invasion bactérienne. Cette structure dynamique évoluant avec l'âge des tissus se compose d'une paroi primaire située entre la lamelle moyenne (permettant de faire la jonction entre les cellules) et la membrane plasmique (Figure 37).

La paroi primaire va jouer un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire, la communication intercellulaire et le transport de l'eau. C'est une structure souple et dynamique dont l'organisation et la composition chimique permettent aussi d'assurer la protection des plantes (Sticklen 2008; Nguema-Ona *et al.* 2013; Plancot *et al.* 2013). Cette paroi primaire comprend des microfibrilles de cellulose, des protéines dites structurales (glycoprotéines et protéoglycane) et des polysaccharides complexes qui vont former trois réseaux complexes interconnectés. Des études ont montré que la paroi primaire serait composée d'environ 15-40% de cellulose, 20-30% d'hémicellulose, 30-50% de pectines et 10-15% de protéines (Cosgrove and Jarvis 2012; Nguema-Ona *et al.* 2014).

La cellulose est une macromolécule stable, insoluble et élastique. Contrairement à la cellulose, qui est un polysaccharide homogène, l'hémicellulose est un polysaccharide hétérogène ramifié. Ainsi l'hémicellulose peut être divisé en plusieurs classes : (1) les xyloglucanes, (2) les xylanes et (3) les mannanes (Scheller and Ulvskov 2010). Leur présence et leur proportion varient en fonction des espèces végétales. Les pectines sont aussi des polysaccharides complexes, hétérogènes et très hydratés qui se regroupent dans 4 familles : (1) les homogalacturonanes (HGs), (2) les homogalacturonanes substitués xylogalacturonanes (XGAs), (3) le rhamnogalacturonane de type I (RG-I) et (4) le rhamnogalacturonane de type II (RG-II) (Mohnen 2008). Les lignines, des polymères complexes et hétérogènes, sont synthétisées dans les parois cellulaires notamment en réponse à un stress biotique ou abiotique. Elles apportent une rigidité et une perméabilité à l'eau, ainsi qu'une grande résistance à la décomposition.

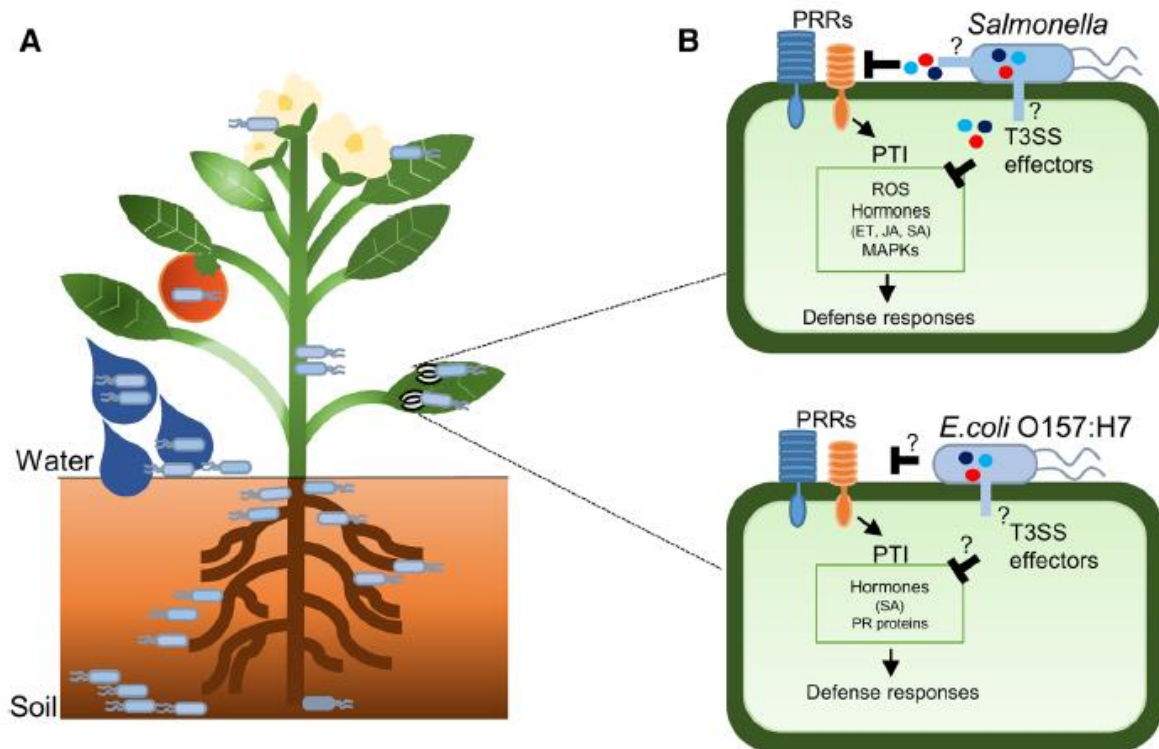


Figure 38 : Interactions entre bactéries entériques pathogènes humaines et plantes (Jo and Park, 2019).

A) *Salmonella* et *E. coli* O157: H7 sont introduit, au niveau des plantes, par le sol ou de l'eau contaminée. Les tissus racinaires des plantes, y compris les poils racinaires ou la zone d'émergence des racines latérales, sont les sites d'entrée de ces bactéries. La fixation bactérienne à la surface des feuilles des plantes s'accompagne également l'entrée de bactéries par les stomates ouverts. Ensuite, les bactéries colonisent les racines, le site de transition racine-tige, les tiges, les feuilles, les fruits et les fleurs.

B) Lors de la reconnaissance de la flagelline de *Salmonella*, une réponse de défense des plantes, telle que l'accumulation de ROS, la signalisation hormonale et l'activation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases), est déclenchée. Les effecteurs T3SS de *Salmonella* inhibent cette réponse immunitaire des plantes pour augmenter la prolifération bactérienne dans les cellules végétales. Cependant, la sécrétion des effecteurs T3SS dans l'apoplasme ou le cytoplasme de la plante n'est pas bien caractérisée. *E. coli* O157: H7 induit également une réponse de défense régulée par une hormone lors de la reconnaissance de flagelles, de curli ou de LPS chez les plantes, mais la fonction du T3SS dans les cellules végétales n'est pas bien connue.

PRR, récepteurs de reconnaissance de formes; PTI, immunité déclenchée par PAMP

b. La réponse immunitaire des plantes, deuxième ligne de défense

Les bactéries sont reconnues par la plante grâce, d'une part, à des molécules conservées, présentes chez toutes les bactéries, les MAMPs³¹ et d'autre part, à des molécules plus spécifiques, portées par les phytopathogènes, les PAMPs³². Ces molécules peuvent être des composants de l'enveloppe bactérienne ou de structures de surface tels que la flagelline, les lipopolysaccharides (LPS) et la chitine (Zeng *et al.* 2010), ou des facteurs intracellulaires tels que les facteurs d'élongation EF-Tu intervenant dans la traduction (Kunze *et al.* 2004). Ces MAMPs / PAMPs sont reconnus par un ensemble de récepteurs situés à la surface des cellules végétales, appelés PRR³³ qui transmettent des signaux intracellulaires déclenchant la synthèse des molécules de défense et l'élicitation de la plante (Deering *et al.* 2012).

L'étude des interactions entre les pathogènes humains et les végétaux n'est que très récente. Les PAMPs les plus étudiés sont la flagelline et les LPS. La flagelline, sous-unité protéique qui constitue le flagelle, est impliquée dans la mobilité et l'attachement des bactéries, comme vu précédemment (Cooley *et al.* 2003). Elle est reconnue par la plante grâce à un PRR et induit une réponse immunitaire rapide : la PTI³⁴. Cette réponse conduit à l'activation de l'expression de gènes de défense, le renforcement de la paroi et le déclenchement de la réaction hypersensible. Les LPS sont implantés sur la face externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et présentent de fortes propriétés antigéniques. Alors que chez les animaux, les récepteurs aux LPS sont bien connus, chez les plantes, ils n'ont pas encore été découverts. Cependant, certaines preuves montrent que les LPS peuvent activer une PTI (Figure 38). Ainsi, lorsque l'on applique des LPS purifiés de *Salmonella* Minnesota et *E.coli* O55:H5 sur des feuilles, ils induisent une fermeture stomatique chez *Arabidopsis thaliana* (Melotto *et al.* 2006; Jo and Park 2019). Une réponse est également observée lorsque l'on dépose des LPS purifiés de *Salmonella* dans une suspension de cellule végétales (Shirron and Yaron 2011). Cependant, cela n'est pas vérifié sur les feuilles de tomate (Meng *et al.* 2013) ce qui suggère que la reconnaissance des LPS serait variable selon les espèces végétales.

³¹ MAMP : Microbes-Associated Molecular Pattern

³² PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

³³ PRR : Pattern Recognition Receptor

³⁴ PTI : PAMP Triggered Immunity



Figure 39 : Observation microscopique des cellules frontières (BCs) et du mucilage libérés par l'extrémité des racines de pois (Pisum sativum) (A), et d'Arabidopsis thaliana de type sauvage (B) (Driouich et al., 2019)

A) Image en microscopie optique montrant les BCs libérées par l'extrémité de la racine d'un pois, entourées d'une épaisse couche de mucilage (le mucilage est coloré à l'encre de Chine).

B) Image en microscopie optique montrant les BLCs libérées par la pointe de la racine de A. thaliana, également entourées de mucilage.

BCs: Border cells; BLCs: Border-like cells. Barre d'échelles : 50 µm

c. Le piège racinaire extracellulaire ou RET³⁵

Au niveau de la rhizosphère, le système racinaire émet un cocktail de molécules, cellules et débris végétaux qui intervient activement dans i) la constitution et le maintien du microbiote rhizosphérique indispensable à la croissance et à la santé de la plante, comme évoqué précédemment, et ii) la protection physique et chimique des racines. En effet, certains composés sécrétés, de haut poids moléculaires (polysaccharides, protéoglycanes, glycoprotéines, protéines, acides nucléiques, etc...), forment un mucilage plus ou moins dense autour du système racinaire et ce réseau offre une protection physique à la coiffe. D'autre part, des cellules, appelées cellules frontières, sont libérées dans la rhizosphère par la coiffe racinaire à la suite d'un processus de différenciation (Hawes *et al.* 2003; Vicré *et al.* 2005; Driouich *et al.* 2007). Ces cellules sont actives pour la plupart et sécrètent également de nombreuses molécules (Driouich *et al.* 2013). Elles peuvent être dispersées et isolées dans la rhizosphère, et l'on parle alors de Border Cells (BC), ou rester liées entre elles, en files de cellules fixées à la coiffe, et l'on parle alors de Border-Like Cells (BLC). Le mucilage et les cellules frontières constituent le "piège extracellulaire racinaire" ou RET, impliqué dans la défense de la racine (Driouich *et al.* 2013; Driouich *et al.* 2019) (Figure 39).

³⁵ RET : Root Extracellular Trap

Contexte et Objectifs

A la suite de la TIAC de 2011 impliquant des graines germées de fénugrec contaminées par une souche entérohémorragique d'*E. coli* O104:H4, puis de nombreux autres épisodes impliquant des légumes à feuille et notamment des laitues (Kozak *et al.* 2013; Marder *et al.* 2014; Callejón *et al.* 2015), l'EFSA³⁶ a publié des recommandations. Ces dernières visent à enrichir les systèmes de gestion de la sécurité sanitaire vis-à-vis du danger bactérien et viral au niveau de la production primaire des salades, ainsi qu'à définir des points de contrôle critiques aux différentes étapes des systèmes de production.

Pour répondre à ces objectifs, un appel à projets CASDAR « Développement agricole et rural d'innovation et de partenariat pour l'année 2015 » a été émis par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Suite à cet appel, le projet PATHOGREEN, ayant pour thème « la contamination primaire des salades par des microorganismes pathogènes : points critiques et leviers » a été sélectionné.

C'est dans ce programme que s'inscrivent mes travaux de thèse. Pour réaliser ce projet, nous avons travaillé avec cinq autres partenaires que sont l'Institut polytechnique UniLaSalle, le SILEBAN³⁷ (chef de file de PATHOGREEN), les Chambres d'Agriculture Régionale et Départementales, et le centre technique et d'expertise agroalimentaire Actalia. Le soutien et le cadre scientifique de la SFR³⁸ « Normandie Végétal » m'ont également été précieux.

Les objectifs de ces travaux de thèse se divisent en 3 grands chapitres:

Le premier objectif de ses travaux a été de caractériser des plasmides d'antibiorésistances isolés de *E. coli* circulantes dans des environnements aquatiques contaminés afin d'étudier, par la suite, leur implication potentielle dans l'adhésion des souches-hôtes sur des plants de laitues. Un article en préparation rassemble les résultats de ce premier chapitre.

Le second objectif fut d'étudier la persistance de différentes souches de *E. coli* sur de jeunes plants de laitues et d'identifier certains facteurs impliqués dans cette persistance.

Enfin, **le troisième objectif** a été d'évaluer la contamination par des bactéries entériques pathogènes ou antibiorésistantes de productions primaires de laitues, issues de

³⁶ EFSA : European Food Safety Authority : impliquée dans l'évaluation des risques dans le domaine agro-alimentaire

³⁷ SILEBAN : Société d'Investissement LEgumière et maraîchère de BASse Normandie : station d'expérimentation et de développement des cultures légumières

³⁸ SFR : Structure Fédérative de Recherche (Région Normandie)

quatre exploitations maraîchères normandes, choisies en fonction de leur itinéraire technique.

En annexe, est joint un article en cours de soumission à la revue STOTEN³⁹ et qui porte sur des travaux réalisés en marge de PATHOGREEN, essentiellement en fin de Master 2. Ces travaux sont cependant en lien direct avec notre problématique concernant le rôle de l'environnement dans la dissémination de l'antibiorésistance. La contribution au résistome environnemental d'isolats du genre *Pseudomonas* en contact avec des rejets fécaux y est étudiée et le titre de cet article est "Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from faecal wastes in the environment and contaminated surface water".

³⁹ STOTEN : Science of the Total Environment

Première partie

La caractérisation de plasmides d'antibiorésistance

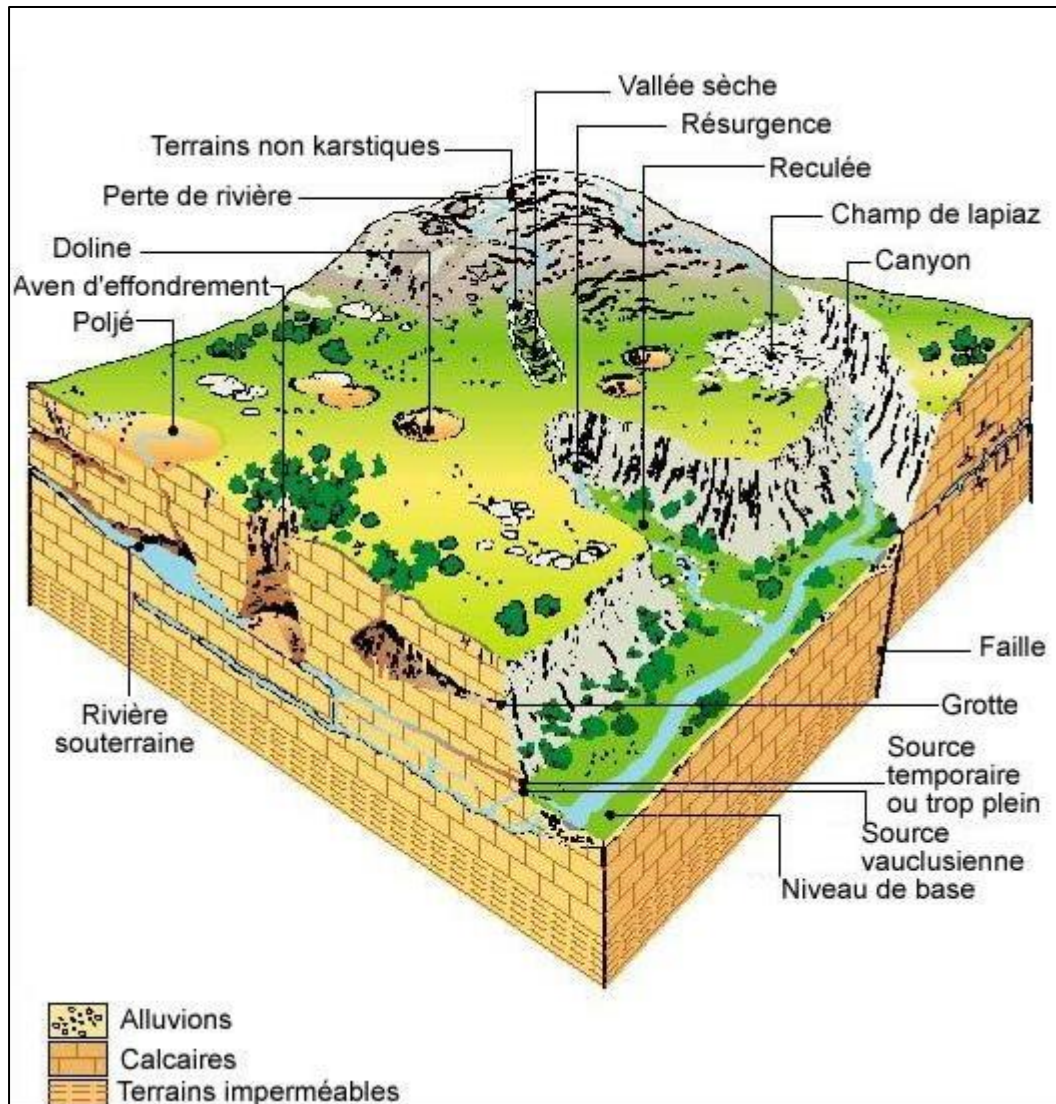


Figure 40 : Bloc diagramme représentant un paysage karstique. Droits réservés - © 1999 M. Bakalowicz, SDAGE Rhône - Méditerranée - Corse

A. Contexte scientifique et objectifs

Dans notre étude, les plasmides étudiés proviennent de souches environnementales de *E. coli* présentant des multirésistances aux antibiotiques (allant de 4 à 12 résistances). Ces *E. coli* circulaient dans des écosystèmes aquatiques contaminés par des rejets fécaux et ont été collectées lors de campagnes de prélèvement précédemment réalisées entre 2005 et 2012 dans la région Normandie. Ceci a permis la constitution d'un soucier de plusieurs milliers de souches de *E. coli* dont les profils d'antibiorésistances ont été déterminés avant conservation à -80°C.

La Normandie possède une structure géologique particulière comprenant un estuaire, celui de la Seine et de nombreux bassins versants avec des zones karstiques, pouvant augmenter le risque de contamination des eaux par des bactéries entériques (Laroche *et al.* 2009; 2010; Flores Ribeiro *et al.* 2012). Les karsts résultent d'écoulements d'eaux souterraines qui vont provoquer la dissolution progressive de roches carbonées (calcaires et dolomies) et de roches salines (gypse). On y retrouve des formes géographiques particulières telles que les dolines, les canyons ou les résurgences donnant directement accès aux eaux souterraines (Figure 40). En périodes pluvieuses, à la suite de ruissellements, des eaux de surface s'infiltrant dans les roches solubles pour rejoindre les eaux souterraines, pouvant apporter avec elles des contaminations microbiologiques issues de STEP, fosses septiques ou d'écoulements sur zones d'élevage.

Des prélèvements dans l'estuaire de la Seine ont été effectués entre 2005 et 2006. Cet estuaire, situé au Nord-Ouest des côtes françaises, est un hydrosystème dynamique et complexe qui possède des caractéristiques fluviales et maritimes. Il se caractérise par un large bassin versant de 79000 km² avec un niveau d'anthropisation élevé et de grandes agglomérations (notamment Rouen et Le Havre). Au niveau de ce bassin versant, plusieurs sites d'échantillonnage ont été étudiés et les souches utilisées pour notre étude proviennent de différents sites : 1) La Seine, au niveau de Rouen et du Croisset, qui sont localisés dans l'agglomération de Rouen et sous influence des rejets de la STEP Emeraude, ainsi que Caudebec, une zone plus rurale (Laroche *et al.* 2009). 2) Le karst du Bébec-Hannetôt : en 2008, des *E. coli* multirésistantes ont pu être isolées d'échantillons d'eaux karstiques prélevées au

niveau de Norville, ville située sur le karst du Bébec-Hannetôt, lors d'évènements pluvieux et de périodes plus sèches. Ce karst est un hydrosystème simple possédant un aquifère parcouru d'eaux souterraines provenant d'une rivière, le Bébec, qui s'engouffre dans le paysage karstique. 3) Le karst de Radicatel possède, quant à lui, un hydrosystème complexe avec un vaste réseau de drains souterrains.

Sur ce karst, en 2010, le passage de la tempête Xynthia a provoqué de nombreux phénomènes de ruissellement sur le plateau et un engouffrement important d'eaux de surface contaminées dans l'hydrosystème. Deux sources situées en bas de falaise, la Bruisseresse et le Moulin B, ont été échantillonnées au cours de cet événement pluvieux majeur (Flores Ribeiro *et al.* 2012). En plus de ces eaux circulantes, des prélèvements ont été réalisés sur le plateau de Radicatel au niveau de la STEP de Cerlangue, petite ville proche de la Seine située à l'est de la ville du Havre, et au niveau d'une station de lagunage des eaux usées de St-Gilles-de-la-Neuville (appelée Lagune). La STEP est composée d'un dégriffeur, permettant l'élimination des déchets solides présents dans les eaux usées, d'un bassin d'aération et d'un bassin de clarification couplé à un puits de recircularisation, permettant de collecter les boues après processus de décantation. Les eaux traitées sont rejetées dans une zone d'infiltration qui est un champ situé à proximité. La Lagune, elle, est composée de trois bassins qui permettent une épuration principalement par décantation et action des UV. L'eau traitée est ensuite rejetée directement dans une bétoire ou doline (puits naturel reliant la surface à l'eau souterraine d'un karst). Les échantillons désignés « Eau brute » représentent l'eau prélevée après le dégriffeur pour la STEP et avant le premier bassin pour la Lagune. Les échantillons appelés « Eau traitée » ont été prélevés après le deuxième bassin dans la STEP et après le premier dans la Lagune. Enfin les échantillons « Eau de rejet » correspondent à l'eau recueillie dans la zone d'infiltration et directement dans la bétoire.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de deux thèses précédentes : Lors de son doctorat en 2010, Emilie Laroche-Ajzenberg a montré que les eaux de l'estuaire de la Seine présentaient en permanence un pourcentage élevé de souches de *E. coli* résistantes à au moins un antibiotique (43% des souches isolées) (Laroche *et al.* 2009). Pour les zones karstiques, elle a montré une faible densité de *E. coli*, mais dont la moitié ou plus, après des

Première partie : caractérisation de plasmides d'antibiorésistance

Tableau 2 : Antibiotiques testés au cours de l'étude pour la détermination de la résistance aux antibiotiques de E.coli, classés par famille

Familles	Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µG)
B-Lactamines/ Pénicillines	Amoxicilline	AMX	25
	Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	20 + 10
	Ticarcilline	TIC	75
	Ticarcilline + Acide Clavulanique	TIM	75 + 10
Carbapénèmes	Iminpénème	IPM	30
Céphalosporines	Céfalotine (1 ^e génération)	CEF	30
	Ceftazidime (3 ^e génération)	CAZ	30
	Céfotaxime (3 ^e génération)	CTX	30
Aminosides	Gentamycine	GEN	10
	Kanamycine	KAN	30
	Streptomycine	STR	10
Phénicolés	Chloramphénicol	CHL	30
Cyclines	Tétracycline	TET	30
Sulfamides	Trimethoprim + Sulfaethoxazole	SXT	75 + 1,25
Quinolones	Acide Nalidixique	NAL	30
	Ciprofloxacine	CIP	5

épisodes de pluies, possédaient des résistances aux antibiotiques et dont la moitié présentaient une multirésistance (de 3 jusqu'à 9 résistances associées).

A la suite de ces conclusions, la thèse en 2014 de Angela Flores-Ribeiro a montré que, au niveau des sources du karst de Radicatel, la population de *E. coli* et la fraction d'antibiorésistances étaient principalement apportées lors d'évènement de pluies. Bien que les sources de Radicatel soient à 90% constituées d'eaux souterraines, la contamination fécale était effectivement liée à l'engouffrement d'eaux de surface contaminées dans l'hydrosystème (Flores Ribeiro *et al.* 2012). Grâce à ses investigations, elle a aussi démontré la présence de deux sous-populations d'*E. coli* antibiorésistantes différentes, avec deux origines distinctes, confirmant ainsi les travaux précédents d'Emilie Laroche sur le karst du Bébec-Hannetôt (Laroche *et al.*, 2010). Ainsi, la sous-population présentant au moins 3 résistances (R3/+), qualifiée de "multi-résistante", serait un indicateur de l'origine humaine de la contamination. La sous-population ayant seulement une à deux résistances (R1-2), pourrait, en revanche, suggérer une origine plutôt bovine de la contamination, due à des processus de ruissellement sur pâturages, mais uniquement en cas d'absence de la sous-population multi-résistante R3/+ (Flores Ribeiro *et al.* 2012). Une analyse du panel de souches prélevées (entre 20 et 50 isolats sont nécessaires par prélèvement) est ainsi réalisée : en présence de souches multi-résistantes, une origine humaine de la contamination est suspectée. En absence de souches multi-résistantes, deux cas se présentent : soit certains isolats appartiennent à la sous-population R1-2 et l'on peut supposer que la contamination fécale est d'origine bovine (animaux d'élevage), soit tous les isolats du panel sont sensibles aux 16 antibiotiques testés (Tableau 2) et la contamination fécale n'est pas avérée. Les souches d'*E. coli* collectées seraient alors des souches naturellement circulantes. Bien sûr, cette analyse dépend aussi de l'occupation du bassin versant étudié (nature des élevages, notamment).

Ainsi, les souches d'*E. coli* dont sont issus nos plasmides d'intérêt, fortement multi-résistantes, auraient une origine humaine (rejet de STEP ou débordement de fosses septiques).

Les plasmides d'intérêt pour ma thèse ont été isolés à partir de leur souche-hôte environnementale par extraction, puis insérés par transformation bactérienne dans la souche de laboratoire DH5 α MCR (Figure 41). Le premier objectif de cette thèse a donc été de

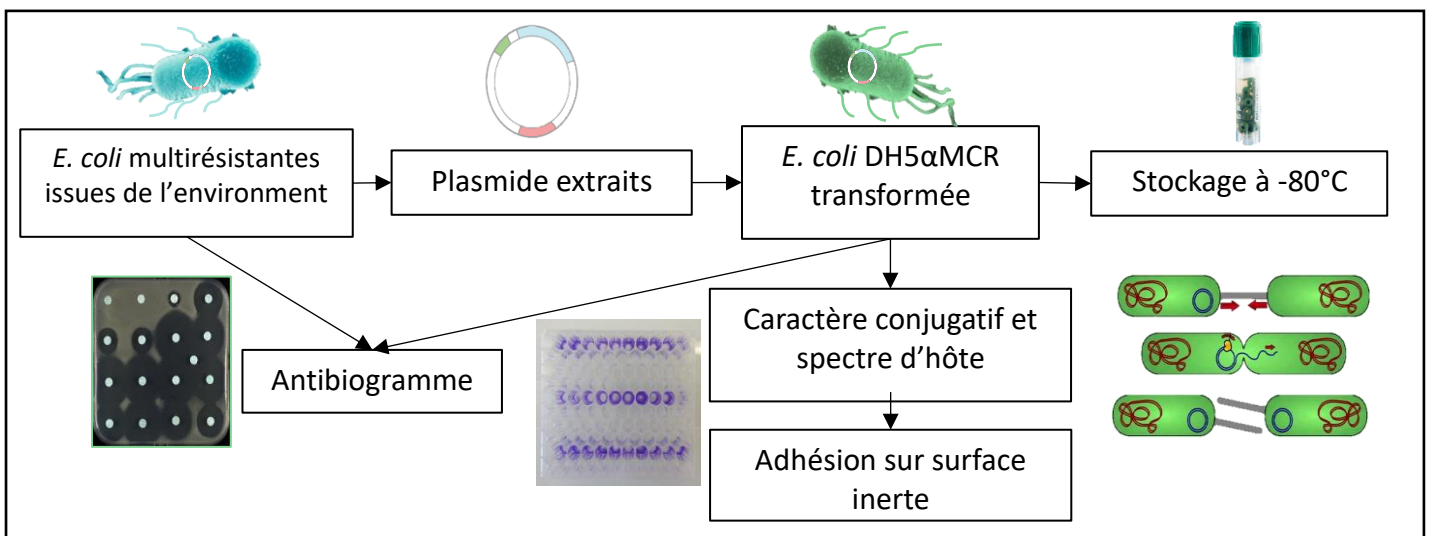


Figure 41: Organigramme montrant la stratégie d'étude des plasmides de résistance.

Les plasmides des *E. coli* de l'environnement ont été extraits et insérés par transformation dans la souche de laboratoire DH5αMCR à partir de laquelle le caractère conjugatif et le spectre d'hôte des plasmides ont pu être déterminés par conjugaison. Ensuite l'étude de l'adhésion des souches sur surface inerte a été réalisée. En parallèle, des antibiogrammes ont été effectués sur les souches DH5αMCR et les souches provenant de l'environnement pour déterminer les résistances portées par les plasmides.

caractériser ces plasmides afin d'étudier par la suite leur implication potentielle dans l'adhésion des souches-hôtes sur des plants de laitues. Lors de travaux précédents au laboratoire, huit premiers plasmides ont été isolés et caractérisés (Laroche-Ajzenberg *et al.* 2014). Au cours de cette thèse, nous avons, d'une part, complété cette première étude avec un séquençage des plasmides et l'étude de leur stabilité et des capacités d'adhésion des souche-hôtes. D'autre part, nous avons isolé 14 nouveaux plasmides de souches multi-résistantes de *E. coli* issues du souchier du laboratoire cité plus haut. Pour ces plasmides, après avoir déterminé leur taille et les résistances portées, nous avons étudié leur capacité d'autotransferts intra, voire inter-espèce par conjugaison bactérienne et leur stabilité au sein des différentes souches-hôtes. En parallèle, par PCR et séquençage, le groupe d'incompatibilité de chaque plasmide et les gènes de résistance ont été recherchés, tout comme la présence d'intégrons, autres supports génétiques de l'antibiorésistance (Figure 41). Au total, nous avons donc travaillé avec 22 plasmides de résistance.

La capacité d'adhésion des différentes souches portant les plasmides étudiés, a été évaluée sur une surface inerte afin de voir les éventuelles implications des différents plasmides. Pour ce faire, les souches environnementales et les souches DH5 α MCR transformées ont été testées sur microplaques 96 puits en polystyrène.

B. Principaux résultats et conclusion

Les résultats obtenus lors de l'étude des 22 plasmides de résistance présentés ci-dessus ont fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique, en cours de soumission et qui est inclus à ce manuscrit (voir ci-dessous). Dans ce paragraphe, je vais présenter les principaux résultats. La plupart des plasmides permettent d'expliquer, au moins en grande majorité, la résistance des souches environnementales. Ils confèrent le plus souvent une résistance aux β -lactamines et à quatre autres familles d'antibiotiques que sont les amonisides, phénicolés, cyclines et sulfamides (Tableau 2).

La grande majorité des plasmides étudiés sont conjugatifs et montrent un transfert intra-spécifique (de *E. coli* à *E. coli*). Ils sont de plus très stables dans la nouvelle souche. Trois plasmides présentent un spectre d'hôtes plus large. Ils sont en effet capables de se transférer par conjugaison dans une souche de *Pseudomonas* mais, par contre, ne semblent pas s'y maintenir en absence de pression de sélection.

Le spectre d'hôte et la transférabilité des plasmides est en concordance avec les groupes d'incompatibilité retrouvés. En effet, avec les plasmides présentant un IncI, des résistances aux aminosides, carbapénèmes et quinolones sont souvent associées, ainsi qu'un spectre d'hôte étroit, comme c'est le cas pour le plasmide pME17 (Rozwandowicz *et al.* 2018). Les IncQ (souvent mobilisables) sont, eux, généralement associés à la résistance aux β -lactamines, sulfonamides et aminosides, tandis que pour les IncF (correspondant généralement à des plasmides conjugatifs chez les *Enterobacteriaceae*), ce sont les résistances aux carbapénèmes, aminosides et quinolones qui sont portées. Lors du séquençage, nous avons trouvé des plasmides appartenant à plusieurs groupes d'incompatibilité. Il semblerait qu'il y ait des co-intégrations qui permettent aux plasmides de mieux se maintenir dans les populations bactériennes et de pouvoir se disséminer plus facilement (Rozwandowicz *et al.* 2018). Par exemple, les plasmides ne possédant qu'un IncQ sont mobilisables et non conjugatifs. Or, lorsqu'ils sont associés avec un IncF, ils peuvent être transférés par conjugaison, comme c'est le cas dans nos plasmides possédant un IncQ (Rozwandowicz *et al.* 2018).

En ce qui concerne la présence d'autres éléments génétiques impliqués dans l'antibiorésistance, tous les plasmides possèdent des transposons et/ou des séquences d'insertion imbriqués les uns dans les autres. Pour ce qui est des intégrons, 45% des plasmides étudiés (soit 10/22) portent un intégron de classe 1, un seul intégron de classe 2 a été identifié (chez le plasmide pME5) et aucun intégron de classe 3 n'a été retrouvé. Ceci illustre la complexité des éléments impliqués dans l'antibiorésistance, qui sont capables de mobilité et/ou de transfert afin de se ré-agencer, formant ainsi des structures mosaïques s'intégrant les unes aux autres. Ces structures mosaïques sont largement retrouvées dans les études portant sur les plasmides ou les gènes de résistance (Jones-Dias *et al.* 2016; Papagiannitsis *et al.* 2016; Botelho *et al.* 2017).

Enfin, pour ce qui est de l'impact de la présence d'un plasmide sur les capacités d'adhésion de la souche-hôte, nous avons pu remarquer une différence entre l'adhésion des souches de laboratoire DH5 α MCR portant un plasmide de résistance et la souche sans plasmide, sur plaque de polystyrène. Pour trois plasmides, cette adhésion était améliorée et pour six autres, étonnamment, elle était plutôt diminuée. Cette diminution pourrait être due au coût métabolique que le plasmide impose à la bactérie, la rendant moins active (Millan and MacLean 2017; Carroll and Wong 2018). De façon surprenante, les souches de *E. coli* issues de

l'environnement présentaient une adhésion plus faible que DH5 α MCR sans plasmide ou de même valeur (pour 3 souches), sauf une, EC α 2587, portant naturellement le plasmide pME26, qui au contraire montrait une forte adhésion. Il ne semble pas y avoir de cohérence de comportement entre les souches environnementales et les souches DH5 α MCR portant le même plasmide. Nous n'avons donc pas pu établir de corrélation entre la présence d'un plasmide et les capacités d'adhésion de sa souche-hôte issue de l'environnement. Cela montre que, même si les plasmides peuvent avoir un rôle dans l'adhésion, d'autres facteurs liés à la souche elle-même entrent en jeu et que l'éventuelle implication des différents plasmides dans l'adhésion ne pourra être étudiée que chez les souches DH5 α MCR transformées.

En conclusion, nous avons pu montrer que des plasmides de multirésistance, portés par des souches entériques ayant probablement une origine humaine, sont capables de se transférer par conjugaison, au moins à une même espèce pour la grande majorité, certains présentant même un large spectre d'hôte. Même si ces derniers semblent avoir des difficultés à se maintenir au fil des générations dans les souches de *Pseudomonas* chez lesquelles nous les avons transférés, ce n'est peut-être pas le cas dans d'autres souches, espèces ou genre bactérien. De plus, une pression de sélection, même faible, peut exister dans certains environnements et favoriser la stabilité de ces plasmides dans les populations bactériennes. Ils participent donc à la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement. Même si ces plasmides ne proviennent pas des mêmes sites de prélèvements, nous retrouvons généralement les mêmes gènes codant les résistances, démontrant qu'ils sont très répandus dans l'environnement. De plus, les nombreux éléments génétiques portés par les plasmides, comme mis en évidence ici, favorisent la circulation des gènes de résistance, même si les plasmides ne sont pas conjugatifs. En effet, la transformation, et surtout, la transduction par des phages, trop souvent négligés dans les échanges génétiques, sont également des voies actives d'échanges plasmidiques au sein des écosystèmes (Wintersdorff *et al.* 2016; Colavecchio *et al.* 2017).

La publication suivante, en cours de préparation, rassemble ces résultats.

Characterization of resistance plasmids in *E. coli* strains isolated from faecal releases to the environment or from contaminated water

Mathilde Camiade^{1,2,3}, Josselin Bodilis³, Sylvaine Buquet⁴, Wassila Riah-Anglet², Nawel Chaftar², Johan Gardères³, Karine Laval² and Barbara Pawlak¹

1 Laboratory Glyco-MEV EA4358, University of Rouen-Normandy, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

2 Equipe AGHYLE, Institut Polytechnique UniLaSalle, Rouen campus, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

3 Laboratory LMSM EA4312, University of Rouen-Normandy, Rouen campus, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

4 Laboratory ECODIV EA1293 / IRSTEA, University of Rouen-Normandy, Rouen campus, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

INTRODUCTION

Bacterial plasmids are transferable genetic elements able to replicate autonomously and move from one cell to another by horizontal transfer mechanisms, *i.e.* conjugation, transformation or transduction. Plasmid genes are generally clustered and two main regions can be observed.

The first region contains, at least, the functions for plasmid replication and copy number control as well as those for self-transmissibility if the plasmid is conjugative (Thomas 2000; Norman *et al.* 2009; Garcillán-Barcia *et al.* 2011). Systems regulating replication are based on repressor(s) that stop plasmid replication when the correct copies number is reached. Nevertheless, a vast diversity of these systems exists, that allows to classify plasmids according to their incompatibility group (Inc). Thus, plasmids belonging to the same Inc group use the same control mechanism (so, the same repressor) and cannot stably co-exist in the same bacterial cell and next generations (Novick 1987). Presently, in *Enterobacteriaceae*, twenty-eight Inc groups have been distinguished by PBRT (Carattoli *et al.* 2005). Plasmids can also be characterized according to their ability to transfer by conjugation. It is usually thought that this mechanism is the most efficient horizontal transfer in gene exchange. In any case, it is certainly the most studied. Conjugative plasmids are large, self-transferring, and carry the *tra* genes encoding conjugation functions, as well as a transfer origin, *oriT*. Mobilizable plasmids for their part, bear *mob* genes, and can be transferred to other bacteria only in presence of a conjugative plasmid. Finally, many plasmids are neither conjugative, nor

mobilizable, and can transfer only by transformation or transduction. Most of them are small and multi-copies (Francia *et al.* 2004).

The second main region in the plasmids encodes genes conferring favourable phenotype for the host bacteria, especially in some critical conditions. We can then distinguish virulence, metabolic and resistance plasmids. These latter harbour most generally several antibiotic and heavy metal resistance genes. According many studies, resistance plasmids, often conjugative, are widely involved in the widespread dissemination of antibiotic resistance, that threatens our health system (Martinez *et al.*, 2009).

Indeed, excessive and badly controlled use of antibiotics for 80 years has caused emergence of antibiotic multi-resistant bacteria in hospitals (Morehead and Scarbrough, 2018). Numerous studies were interested in highlighting dissemination and circulation routes of resistant bacteria and/or resistance genes, and involvement of the natural environments was clearly identified (Davies 2007; Aminov 2011; Gillings and Stokes 2012). Faecal rejects are one of the major ways of the environment contamination by antibiotic resistances. These flows are released from wastewater treatment plant (WWTP) effluents or improperly functioning septic tanks, or created by run-off on agricultural areas, particularly on pastures (Heuer *et al.* 2011). The use of manure or slurry to amend agricultural soils contributes to emission of enteric antibiotic resistant bacteria (Hess *et al.* 2004; Avery *et al.* 2005). Environmental contamination can vary (antibiotic resistance nature, human or livestock origin, or release efficiency) according to the source, but also according to the hydrologic conditions (Jiang *et al.*, 2002; Cools *et al.*, 2001). Indeed, water is a very efficient dissemination vector and spread of resistant bacteria is facilitated by rainfall events which cause or increase run-off phenomena. Groundwater contained in karstic aquifers is particularly vulnerable to run-off contamination, because the karst hydrosystems are heterogeneous landscapes created by groundwater flow and which have little or no filtration power. Surface water and groundwater are fundamental natural resources, using for drinking water production, recreational activities or irrigation of agricultural crops. However, they are highly impacted by faecal rejects and carry numerous resistant and multi-resistant bacteria (Cooley *et al.* 2007; Laroche *et al.* 2009; 2010; Flores Ribeiro *et al.* 2012).

In order to better understand the genetic routes of antibiotic resistance dissemination, we isolated and characterized 14 resistance plasmids harboured by multi-resistant *Escherichia*

Table 1: Environmental and laboratory strains - plasmids

Strains	Origin / study site	Number of resistances	Relevant resistance pattern*	characteristics/antibiotic	References
<i>Escherichia coli</i> environmental strains : [plasmid carried]					
EC 129	[no plasmid detected] Seine Estuary Caudebec (2005/11)	12	AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-KAN-CHL-TET-SXT-NAL-CIP-STR		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 210	[pME3] Seine Estuary Rouen (2006/01)	11	AMX-AMC-TIC-TIM-KAN-STR-CHL-TET-SXT-NAL-CIP		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC421	[pME4+pME6] Seine Estuary Le Croisset (2006/01)	9	AMX-TIC-KAN-STR-CHL-TET-SXT-NAL-CIP		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 528	[pME5] Seine Estuary Caudebec (2006/03)	8	AMX-TIC-GEN-KAN-STR-CHL-TET-SXT		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 1250	[pME9] Norville karst Wet period (2007/02)	6	AMX-TIC-STR-CHL-TET-SXT		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 2146	[pME11] Norville karst Rainfall event (2008/03)	8	AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-STR-CHL-SXT		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 2183	[pME10] Norville karst Rainfall event (2008/03)	5	AMX-TIC-CEF-STR-SXT		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 2521	[no plasmid detected] Radicatel karst Wet period (2008/05)	9	AMX-AMC-TIC-TIM-STR-CHL-TET-SXT-NAL		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 2660	[pME8] Radicatel karst Wet period (2008/05)	6	AMX-TIC-STR-TET-SXT-NAL		Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
EC 5008	Radicatel karst (Bruisseriesse spring) Rainfall event (2010/03)	6	AMX-AMC-KAN-TET-SXT-STR		This work
EC 5618	Radicatel karst (Moulin B spring) Rainfall event (2010/03)	8	AMX-AMC-TIC-TIM-CHL-TET-NAL-STR		This work

Première partie : caractérisation de plasmides d'antibiorésistance

EC 5718	Radicatel karst (Moulin B spring) Rainfall event (2010/03)	4	AMX-AMC-TIC-TIM	This work
EC 4952	Radicatel karst (Bruisseriesse spring) Rainfall event (2010/03)	4	AMX-TIC-CHL-TET	This work
EC α 1669	WWTP Cerlangue Treated water (2011/12)	9	AMX-TIC-TIM-AMC-CHL-TET-SXT-NAL-CIP	This work
EC α 1704	WWTP Cerlangue Reject water (2011/12)	6	AMX-AMC-TIC-TIM-TET-STR	This work
EC α 1791	WWTP Lagune Treated water (2011/12)	5	AMX-TIC-KAN-TET-SXT	This work
EC α 1760	WWTP Lagune Raw water (2011/12)	4	AMX-TIC-KAN-STR	This work
EC α 2409	WWTP Cerlangue Reject water (2012/05)	6	AMX-TIC-GEN-TET-SXT-STR	This work
EC α 2424	WWTP Cerlangue Reject water (2012/05)	5	AMX-TIC-KAN-SXT-STR	This work
EC α 2604	WWTP Lagune Reject water (2012/05)	5	AMX-TIC-TIM-KAN-STR	This work
EC α 2587	WWTP Lagune Treated water (2012/05)	5	AMX-TIC-TET-SXT-STR	This work
Laboratory strains :				
<i>E. coli</i> DH5 α MCR	-		<i>recA1, mcrA, mcrB, hsdR, endA1</i>	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> SC12 (W3101 Rifr)	-		<i>recA13, trpE, RIF</i>	Kopecko <i>et al</i> (1976)
<i>P. fluorescens</i> SBW25 Rifr	-		AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-CTX-AZT-CFS-RIF	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2014)
<i>P. putida</i> KT2440	-		AMX-TIC-TIM-CTX-CEF-AMC-CHL-SXT-NAL-FOS-RIF	Bagdasarian <i>et al</i> (1981)

*AMX : amoxicillin, AMC : amoxicillin + clavulanic acid, TIC : ticarcillin, TIM : ticarcillin + clavulanic acid, IMP : imipenem , CEF : cefalotin, CAZ : ceftazidim, CTX : cefotaxim, GEN : gentamycin, KAN : kanamycin, STR : streptomycin, CHL : chloramphenicol, TET : tetracycline, SXT : trimethoprim – sulfomethoxazole, NAL : nalidixic acid, CIP : ciprofloxacin, RIF : rifampicin, FOS : fosfomycin, AZT : aztreonam. CFS : cefsulodin

coli strains collected in environmental waters contaminated by human faecal rejects. We sought different features: plasmid-borne resistances, size, incompatibility group, presence of class 1 and/or 2 integrons and ability to autotransfer. We have added eight resistance plasmids coming from a previous work (Laroche-Ajzenberg *et al.* 2014) to our panel and we carried on the study with 22 plasmids. By sequencing them, we determined their resistance genes and sought mobile genetic elements presence. Moreover, the potential role of these plasmids in bacterial adhesion on polystyrene microplate was studied. Finally, stability of some plasmids in their host strain was evaluated over the generations.

MATERIALS AND METHODS

Choice of environmental strains

From a strain bank of over 3000 environmental strains, we selected 21 multi-resistant *E. coli* strains (Table 1). These strains carry between 4 and 12 resistances to antibiotic and have been isolated from surface or groundwater along different sampling campaigns on several sites in Normandy (France): the Seine estuary (Caudebec, Rouen and Le Croisset), effluents from two Wastewater Treatment Plants (a classic WWTP and a lagoon-based WWTP) and groundwater collected in karstic springs of two hydrosystems located in Norville and Radicatel. These sites have already been studied for the circulation of antibiotic-resistant *E.coli* (Laroche *et al.* 2009; Laroche *et al.* 2010; Flores Ribeiro *et al.* 2012).

DNA extraction and *E.coli* DH5 α MCR transformation

Plasmid DNA was extracted using Genopure Plasmid Midi Kit (Roche Diagnostic, Meylan, France) from 40 to 80 ml of bacterial culture (as recommended by the supplier). The competent cells were obtained and transformation was carried out as described by Laroche-Ajzenberg *et al.* (2014).

Plasmid mating

Mating experiments were performed as described by Laroche-Ajzenberg *et al.* (2015). The donor strains were DH5 α MCR transformants and the recipient strains were *E.coli* SC12 and *Pseudomonas putida* KT2440 (Table 1). Antibiotics used to select transconjugants were chosen according to the resistances of the recipient strain (Rifampicin 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ or Chloramphenicol 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and to the resistance profile of the studied plasmid (Kanamycin 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Streptomycin 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Tetracycline 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Conjugation frequencies were calculated as the number of transconjugants mL⁻¹ per number of recipients mL⁻¹. The antibiotic resistance profiles of the transconjugants (five for each experiment) were controlled by the agar diffusion method. Parent strains were tested separately, as a control, on the selective media in each experiment, and frequencies of spontaneous mutations (F_{mut}) could be calculated. On average, for the donor strains (DH5 α MCR transformants), F_{mut} was $< 1,4 \cdot 10^{-7}$ on Chl₁₀ media and $< 1,06 \cdot 10^{-7}$ on the media containing Rif₅₀. For the recipient strains, on average, F_{mut} was $< 3,52 \cdot 10^{-6}$ (KT2440) and $< 3,20 \cdot 10^{-8}$ (SC12).

Antibiotic Resistance

Antibiotic resistance patterns of DH5 α MCR transformants and transconjugants were verified by the agar diffusion method (Bonnet *et al.*, 2013), using 16 antibiotic discs (I2A, Montpellier, France), corresponding to the antibiotics most commonly used in human and veterinary medicine against infections caused by Gram-negative bacilli: amoxicillin (AMX, 25 μ g), amoxicillin + clavulanic acid (AMC, 20 μ g + 10 μ g), ticarcillin (TIC, 75 μ g), ticarcillin + clavulanic acid (TIM, 75 μ g + 10 μ g), imipenem (IMP, 30 μ g), cefalotin (CEF, 30 μ g), ceftazidim (CAZ, 30 μ g), cefotaxim (CTX, 30 μ g), gentamycin (GEN, 10 μ g), kanamycin (KAN, 30 μ g), streptomycin (STR, 10 μ g), chloramphenicol (CHL, 30 μ g), tetracycline (TET, 30 μ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 75 μ g + 25 μ g), nalidixic acid (NAL, 30 μ g) and ciprofloxacin (CIP, 5 μ g). After incubation for 24 hours at 37 ° C for *E. coli* or 30 ° C for *P. putida*, bacteria were classified as sensitive, intermediate or resistant according to French national guidelines (Bonnet *et al.*, 2013). The *E. coli* strain CIP 7624 (ATCC 25922) was used as a control. The results were converted into a binary code: resistant and non-resistant, the latter corresponding to sensitive and intermediate phenotypes.

Stability of plasmids

This study was achieved with DH5 α MCR transformants and *P. putida* transconjugants. Successive isolations of one colony were performed in the absence of selection pressure on LB agar. In parallel, for each isolation carried out, 50 colonies were subcultured on medium supplemented with antibiotics to test the presence of the plasmid. Generation number required for a single colony formation was estimated by enumeration of bacteria forming the colony.

Determination of incompatibility groups

DNA of DH5 α MCR transformants were obtained by osmotic shock in ultrapure water and heat shock (10 min at 95°C). Incompatibility groups were detected using PCR-based Replicon Typing method reported by Carattoli *et al* (2005). We tested the 16 following groups: IncB/O, IncFIC, IncA/C, IncP, IncT, IncK/B, IncW, IncFIA, IncFIB, IncY, IncI1, IncX, IncHI1, IncN, IncHI2 and IncL/M by multiplex PCR. Each group detected was confirmed by simplex PCR. PCR were performed on 100-150 ng of DNA, in a final volume of 50 μ l with 200 μ M of each dNTP, 1,5 mM of MgCl₂, 200 μ M of each primer and 0,5 U. μ l⁻¹ of the GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, France). The PCR program was: a denaturation step of 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 62°C and 1,5 min at 72°C. Final elongation was performed for 5 min at 72°C.

Research of class 1 and 2 integrons

The *int11* and *int12* genes were sought by PCR on 100-150 ng of DNA in a final volume of 50 μ l with 200 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 2 mM of MgCl₂ and 0,5 U. μ l⁻¹ of GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, France). For *int11* genes, a denaturation cycle of 10 min at 94°C was followed by a 1 min cycle at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C. A final elongation of 7 min at 72°C was then performed. For *int12* genes, the denaturation cycle was 5 min at 94°C followed by 30 sec cycle at 94°C, 30 sec at 64°C and 1 min at 72°C and the final elongation was achieved for 7 min at 72°C.

Plasmid sequencing and analysis

Plasmids of the DH5 α MCR transformants were extracted using Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche Diagnostic, Meylan, France) from 300mL of culture according to the manufacturer's recommendations. PacBio sequencing was performed by GATC Society (Konstanz, Germany). The incompatibility groups were determined or confirmed using the PlasmidFinder database (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) curated by H. Hasman and A. Carattoli (Carattoli *et al.*, 2014), a plasmid mapmaking were performed using BASYS Bacterial Annotation System (<https://www.basys.ca/server4/basys/cgi/submit.pl>) (Van Domselaar *et al.*, 2005), presence of integron was confirmed using PlasmidIntegron database on Galaxy Pasteur portail (<https://galaxy.pasteur.fr/>) and confirmation of resistance genes identity was performed using ARDB database (<https://ardb.cbcb.umd.edu/>) and CARD database (<https://card.mcmaster.ca/home>) (Jia *et al.*, 2017).

Table 2: Characteristics of isolated plasmids

Environmental strains*		Number of detected plasmids	Plasmid name (in DH5 α MCR strain)	Resistance pattern carried by plasmids [†] (in DH5 α MCR strain)	Size (kb)	Inc group	Integrase carried by plasmids	gene by
EC 5008	AMX-AMC-KAN-TET-STR-SXT	1	pME13 (6R)	AMC-AMX-KAN-TET-STR-SXT	154	Q + FIB + FII	<i>intl1</i>	
	AMX-AMC-TIC-TIM-CHL-TET-NAL-STR	1						
EC 5618	STR		pME14 (6R)	AMX-AMC-TIC-TIM-CHL-TET	69	R + FIA	<i>intl1</i>	
EC 5718	AMX-AMC-TIC-TIM	1	pME15 (4R)	AMC-AMX-TIC-TIM	57	FII	ND	
EC 4952	AMX-TIC-CHL-TET	1	pME16 (4R)	AMX-TIC-CHL-TET	147	FIB + FII	ND	
	AMX-AMC-TIC-TIM-CHL-TET-SXT-NAL-CIP	1						
EC α 1669	NAL-CIP		pME17 (2R)	TET-SXT	113	I2	<i>intl1</i>	
EC α 1704	AMX-AMC-TIC-TIM-TET-STR	1	pME18 (4R)	AMX-AMC-TIC-TIM	8,4	ND	ND	
EC α 1791	AMX-TIC-KAN-TET-SXT	1	pME19 (6R)	AMX-TIC-KAN-TET-STR-SXT	148	Q + FIB + FII	<i>intl1</i>	
EC α 1760	AMX-TIC-KAN-STR	1	pME20 (4R)	AMX-TIC-KAN-STR	95	B/O/K/Z	ND	
EC α 2409	AMX-TIC-GEN-TET-SXT-STR	3	pME21 (5R)	AMX-TIC-TET-STR-SXT	155	Q + FIB + FII	<i>intl1</i>	
			pME22 (1R)	STR	ND	ND	ND	
			pME24 (2R)	GEN-STR	107	B/O/K/Z	ND	
EC α 2424	AMX-TIC-KAN-SXT-STR	1	pME23 (6R)	AMX-TIC-KAN-TET-SXT-STR	141	Q + FIB + FII	<i>intl1</i>	
EC α 2604	AMX-TIC-TIM-KAN-STR	1	pME25 (4R)	AMX-TIC-KAN-STR	151	Q + FIB + FII	<i>intl1</i>	
EC α 2587	AMX-TIC-TET-SXT-STR	1	pME26 (5R)	AMX-TIC-TET-STR-SXT	165	FIB + FII	<i>intl1</i>	

*Resistance carried by plasmids are shown in bold type.

[†]Resistance not expressed in the environmental strain are in italic.

ND: Not Detected

Adhesion to an inert surface

Cultures of the DH5 α MCR transformants and environmental strains at DO₅₈₀ = 0,2 were incubated for 2 h at 37°C in the wells of a 96-well polystyrene microplate (Evergreen Scientist, Buffalo, NY). Content of each well was recovered and quantified by spectrophotometry at 580nm. Each well was then gently rinsed twice with sterile ultrapure water and filled with fresh medium. Plates were reincubated at 37°C for 24 h for biofilm formation. Then, content of the wells was discarded, wells were rinsed slowly three times with sterile ultrapure water and filled with 1% Crystal Violet. Plate was left at room temperature for 30 min before removing Crystal Violet, rinsing the wells 2-3 times with ultrapure water and filling them with 70% ethanol. After 2 min of waiting, ethanol was recovered and its staining was quantified by spectrophotometer at 580 nm. The first fraction obtained, after 2 hours at 37°C, corresponded to the non-adhered bacteria and the second fraction measured, after 24 hours at 37°C, to the biofilm formed in the wells, the ethanol allowing to dissolve the Crystal-Violet trapped in the adhered bacteria. In order to compare formation of biofilms and thus, adhesion of the strains, results obtained were reported in the form of DO580 Biofilm / DO580 Planktonic.

RESULTS

Isolation of 14 plasmids and characterization

Plasmid extractions performed from 12 environmental *E. coli* multi-resistant strains (Table 1) allowed the transformation of the laboratory DH5 α MCR strain presenting only a chromosomal resistance to nalidixic acid (NAL). In all the environmental strains, we detected at least one plasmid, most of them harbouring between four and six resistances, except EC α 2409 strain which carries at least three plasmids (Table 2). These three plasmids were distinguished because i) they have been selected on different selective media (see Materials and Methods) and ii) they don't confer the same resistance phenotype to the DH5 α MCR transformants. Overall, we were able to isolated 14 plasmids.

Size of these plasmids was obtained after sequencing. They are large plasmids, ranging from 57 kb (pME15) to 165 kb (pME26), except plasmid pME18 which presents a really small size (8,4 kb) (Table 2). Size of the pME22 plasmid could not be determined because of a sequencing default. Interestingly, plasmid resistances number is not necessarily related with plasmid size. Thus, pME17 plasmid with a size of 113kb, presents only two antibiotic resistances, whereas

pME14 plasmid, with a size of 69kb, harbours six different resistances. The most striking is pME18, the smallest plasmid, which confers four resistances to its host cell, with only 8,4kb. But the resistances to amoxicillin and to ticarcillin are often linked (Paterson, 2006) and a single gene can encode these two resistances.

By multiplex PCR and/or plasmid sequencing and use of the PlasmidFinder database, we were able to identify incompatibility groups of 12 plasmids among 14 (Table 2). The majority of the plasmids belongs to several incompatibility groups (two or three). The most represented group is the IncF group (FIA, FIB, FII) often associated with an IncQ design (pME13, pME19, pME21, pME23 and pME25). IncR (pME14), IncI2 (pME17) and IncB/O/Z/K (pME20 and pME24) were also detected.

If we compare resistances borne by the environmental host strains to those carried by their respective plasmid(s), we noticed that plasmid resistances explain the whole resistance pattern of eight host strains among 12, including EC α 2409 (6R) which harbours three plasmids (Table 2). EC 5618 (8R) and EC α 1704 (6R) present each two resistances, respectively resistance to nalidixic acid and streptomycin, and to tetracycline and streptomycin, that are not encoded by the plasmid we isolated, but their resistance pattern is nevertheless mainly plasmid-borne. The strain EC α 1669 is rather intriguing because it harbours the highest number of resistances (9R) and yet the plasmid pME17 we were able to detect, confers only two resistances to the laboratory strain DH5 α MCR (to tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazol). The others seven resistances of EC α 1669 strain could therefore be chromosomal, but also carried by one (or several) plasmids we were not able to extract. Indeed, plasmid extraction can have been poorly efficient because of a very large size of the plasmids or integrated-forms in the chromosome. Finally, as shown in Table 2, two plasmids carry resistances that are not expressed in their environmental host strain: pME19 plasmid which confers resistance to streptomycin only to the laboratory strain, or pME23 plasmid which confers to DH5 α MCR a supplementary resistance to tetracycline.

Among plasmid resistances, the most represented are to amoxicillin and/or ticarcillin, two penicillins (Table 2). Indeed, 11 plasmids among the 14 isolated bear these resistances, sometimes accompanied by resistance to clavulanic acid. Then, come resistances to streptomycin (encoded by 9 plasmids), to tetracycline (8 plasmids), to trimethoprim-sulfamethoxazol (6 plasmids) and to kanamycin (5 plasmids). The less represented resistances

Table 3: Ability to autotransfer

Plasmids	Conjugative frequency* (Transconjugants/Recipients) [Selective medium]†		Conjugative plasmid
	DH5 α MCR(pME) x <i>E. coli</i> SC12	DH5 α MCR(pME) x <i>P. putida</i> KT2440	
pME13 (6R)	1.8 10⁻⁵ [LB Kan ₅₀ + Rif ₅₀]	< 8.0 10 ⁻⁷ [LB Kan ₁₅ + Chl ₁₀]	Yes (only intraspecies)
pME14 (6R)	< 3.3 10 ⁻⁹ [LB Tet ₁₀ + Rif ₅₀]	< 3.0 10 ⁻⁵ [LB Tet ₁₅ + Rif ₅₀]	No
pME15 (4R)	-	-	-
pME16 (4R)	< 2.9 10 ⁻⁸ [LB Tet ₁₀ + Rif ₅₀]	< 2.2 10 ⁻⁵ [LB Tet ₁₅ + Rif ₅₀]	No
pME17 (2R)	3.8 10⁻² [LB Tet ₁₀ + Rif ₅₀]	< 9.6 10 ⁻⁷ [LB Tet ₁₅ + Chl ₁₀]	Yes (only intraspecies)
pME18 (4R)	-	-	-
pME19 (6R)	6.6 10⁻⁶ [LB Kan ₅₀ + Rif ₅₀]	< 9.6 10 ⁻⁸ [LB Kan ₁₅ + Chl ₁₀]	Yes (only intraspecies)
pME20 (4R)	1.3 10⁻² [LB Kan ₅₀ + Rif ₅₀]	< 3.3 10 ⁻⁷ [LB Kan ₁₅ + Chl ₁₀]	Yes (only intraspecies)
pME21 (5R)	3.9 10⁻⁵ [LB Tet ₁₀ + Rif ₅₀]	< 7.7 10 ⁻⁷ [LB Tet ₁₅ + Chl ₁₀]	Yes (only intraspecies)
pME22 (1R)	2.1 10⁻² [LB Str ₂₀ + Rif ₅₀]	7.7 10⁻² [LB Str ₂₅ + Chl ₁₀]	Yes (intra and interspecies)
pME24 (2R)	1.4 10⁻² [LB Str ₂₀ + Rif ₅₀]	2.2 10⁻¹ [LB Str ₂₅ + Chl ₁₀]	Yes (intra and interspecies)
pME23 (6R)	1.0 10⁻⁴ [LB Kan ₅₀ + Rif ₅₀]	< 5.2 10 ⁻⁸ [LB Kan ₁₅ + Chl ₁₀]	Yes (only intraspecies)
pME25 (4R)	1.3 10⁻⁴ [LB Kan ₅₀ + Rif ₅₀]	< 2.7 10 ⁻⁷ [LB Kan ₁₅ + Chl ₁₀]	Yes (only intraspecies)
pME26 (5R)	< 3.3 10 ⁻⁹ [LB Tet ₁₀ + Rif ₅₀]‡	< 5.9 10 ⁻⁷ [LB Tet ₁₅ + Chl ₁₀]	No
Positive control			
SC11 (RP4)	7.0 10⁻¹ [LB Kan ₅₀ + Rif ₅₀]	8.3 10⁻³ [LB Kan ₁₅ + Chl ₁₀]	

*Positive mating transfer are shown in bold type.

†Kan₅₀ or 15: kanamycin 50 or 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Tet₁₀ or 15: tetracyclin 10 or 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Str₂₀ or 25: streptomycin 20 or 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Rif₅₀: rifampicine 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Chl₁₀: chloramphénicol 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

‡No transfer could be highlighted. Transfer frequency, if exists, is below the experimental threshold: for each experiment, when no colony had grown on the selective medium, this detection threshold was calculated as if there was one colony on the selective medium.

- Not performed.

are to chloramphenicol (two plasmids) and to gentamycin (only one plasmid). Thus, overall, five antibiotic families are targeted by these resistance plasmids.

To investigate presence of class 1 and/or class 2 integrons on the 14 plasmids isolated in this study, we amplified by PCR *int11* and *int12* genes encoding integrases of each class. No *int12* gene was detected on the plasmids. However, 8 plasmids among the 14 plasmids tested carry at least one class 1 integron (Table 2). The 5 plasmids belonging simultaneously to the IncQ, IncFIB and IncFII groups bear the *int11* gene and resistance to streptomycin (STR). Four of them harbour also resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT). These resistances are often associated with class 1 integron. Indeed, *aadA* and *dfr* genes, frequently contained in the variable region, confer resistances to streptomycin and trimethoprim, respectively, and the *sul1* gene, present on the 3'-conserved sequence of class 1 integrons, confers resistance to sulfamethoxazole. The *int11* gene was detected on another plasmid from the IncF group (pME26, IncFIB+IncFII) which indeed carries resistances to streptomycin and to trimethoprim-sulfamethoxazole. On the contrary, pME14, from both IncR and IncFIA groups, bearing the *int11* gene, does not confer resistances to none of these antibiotics. Finally, the plasmid pME17 belongs to the IncI2 group and harbours at least one class 1 integron and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance. Thus, the majority of the 14 plasmids is associated with class 1 integrons which contribute to their multi-resistance pattern.

Ability to autotransfer and host range

The autotransfer capacity of 12 plasmids was evaluated by performing mating experiments i) between two *E. coli* strains (DH5 α MCR transformants as donor strain and SC12 as recipient strain) and ii) between two strains of different genus (DH5 α MCR transformants as donor strain and *P. putida* KT2440 as recipient strain). Results are shown in Table 3.

The majority of the plasmids tested are conjugative, since we were able to highlight conjugative transfer for nine plasmids among 12 (75%).

For seven of them, transfer was only intraspecies and two groups appear when mating frequencies are considered: the five plasmids harbouring the multi-replicon Q + FIB + FII present a weak transfer efficiency (from $6.6 \cdot 10^{-6}$ to $1.3 \cdot 10^{-4}$). By contrast, two plasmids belonging to a “non-F” Inc group (pME17, IncI2 and pME20, IncB/O/K/Z) transfer by conjugation with a good frequency (higher than 10^{-2}).

Table 4: Resistance genes and mobile genetic elements

Plasmid name (in DH5 α MCR strain)	Genes resistance carried by plasmid	Resistance phenotype	Presence of transposase genes	Presence of insertion sequences
pME3 (6R)	<i>str - aphE, sulII, blaTEM, cat, tetA, aphA</i>	AMX TIC KAN STR CHL TET	Yes	Yes
pME4 (1R)	<i>aphA1</i>	KAN	Yes	Yes
pME5** (8R)	<i>blaTEM, aadA-sat1, dhfrXV, cmlA, sulII</i>	AMX AMC TIC TIM GEN STR CHL TET	Yes	Yes
pME6 (6R)	<i>tetA, str-aphE, sulII, blaTEM</i>	AMX AMC TIC TIM STR TET	Yes	ND
pME8 (7R)	<i>tetA, aphA, blaTEM</i>	AMX AMC TIC TIM CEF KAN TET	Yes	ND
pME9* (7R)	<i>cmlA, sulI, str-aphE, blaTEM</i>	AMX AMC TIC TIM STR CHL SXT	Yes	Yes
pME10 (6R)	<i>dhfrVII, blaTEM, sulII, str-aphE</i>	AMX AMC TIC TIM STR SXT	ND	Yes
pME11 (6R)	<i>blaTEM</i>	AMX AMC TIC TIM CEF KAN	ND	ND
pME13* (6R)	<i>aphA1, tetA, dhfrV, blaTEM, sulII, str-aphE</i>	AMC-AMX-KAN-TET-STR-SXT	Yes	Yes
pME14* (6R)	<i>sulII, aadA, cmlA, carb3, dhfrXV, tetA</i>	AMX-AMC-TIC-TIM-CHL-TET	Yes	Yes
pME15 (4R)	<i>blaTEM, str-aphE</i>	AMC-AMX-TIC-TIM	Yes	ND
pME16 (4R)	<i>tetA, blaTEM, cat</i>	AMX-TIC-CHL-TET	Yes	Yes
pME17* (2R)	<i>tetA, dhfrVII, aadA, sulII</i>	TET-SXT	Yes	ND
pME18 (4R)	ND	AMX-AMC-TIC-TIM	Yes	ND
pME19* (6R)	<i>aphA1, str-aphE, sulII, blaTEM</i>	AMX-TIC-KAN-TET-STR-SXT	Yes	Yes
pME20 (4R)	<i>str-aphE, blaTEM, sulII, aphA1</i>	AMX-TIC-KAN-STR	Yes	ND
pME21* (5R)	<i>tetA, blaTEM, dhfrV, sulII, str-aphE</i>	AMX-TIC-TET-STR-SXT	Yes	Yes
pME22 (1R)	ND	STR	ND	ND
pME24 (2R)	<i>aacC4, str-aphE</i>	GEN-STR	Yes	Yes
pME23* (6R)	<i>aphA1, str-aphE, sulII, blaTEM, tetA</i>	AMX-TIC-KAN-TET-SXT-STR	Yes	Yes
pME25* (4R)	<i>aphA1, str-aphE, sulII</i>	AMX-TIC-KAN-STR	Yes	Yes
pME26* (5R)	<i>blaTEM, str-aphE, sulII</i>	AMX-TIC-TET-STR-SXT	Yes	Yes

ND: Not Detected *bear class 1 integron ** bear class 1 and class 2 integrons

Correlation between resistance genes and targeted antibiotics:

Resistance genes	Resistance conferred to
<i>str-aphE</i> and <i>aadA1</i>	Streptomycin (STR)
<i>sat</i>	Spectinomycin
<i>bla_{TEM}</i> and <i>carb3</i>	β -lactams
<i>cat</i> and <i>cmlA</i>	Chloramphenicol (CHL)
<i>sul</i>	Sulfonamides (SXT)
<i>dhfr</i>	Trimethoprim (SXT)
<i>tetA</i>	Tetracycline (TET)
<i>aphA</i>	Kanamycin (KAN)
<i>aacC4</i>	gentamicin (GEN)

Two plasmids, pME22 and pME24, are not only able to transfer in the *E. coli* strain SC12, but also in the *P. putida* strain KT2440, highlighting an interspecies transfer and a broad host range for these plasmids. pME24 belongs to the IncB/O/K/Z group, but the Inc group of pME22 is indeterminate. Their transfer frequencies towards the two different recipient strains are high (around 10^{-2} towards SC12 and even around 10^{-1} towards KT2440).

Finally, we were not able to obtain transconjugants with three plasmids: pME14 (IncR + IncFIA), pME16 (IncFIB + IncFII) and pME26(FIB + FII). This negative result does not necessarily mean that these plasmids, which have important size (69 kb, 147 kb and 165 kb, respectively), are not conjugative. Indeed, large resistance plasmids are very often conjugative. But, first, we noticed that conjugative plasmids of our study which belong to the IncF group are not very efficient to transfer (see above the multi-replicons Q + FIB + FII). So, an even weaker frequency can be under our detection threshold. Second, conjugative mechanism can be regulated or the plasmids integrated in the chromosome.

We have not tested the plasmid pME18 because of its too small size (8,4 kb) to be conjugative.

Antibiotic resistance genes carried by 22 resistance plasmids

Eight plasmids isolated in previous work (Laroche-Ajzenberg *et al.*, 2014) in the same way that the 14 plasmids described above, were added to the present study. Thus, by sequencing the 22 plasmids of interest and using the BASYS and ARDB databases, the plasmid-borne resistance genes have been identified (Table 4). We were not able, however, to obtain the sequence of two plasmids, pME18 and pME22. For the 20 plasmids remaining, resistance genes are mostly clustered on the same area of the plasmids, as expected on resistance plasmids. Overall, 12 different resistance genes have been highlighted (Table 4). The most widespread is *blaTEM* (borne by 15 plasmids of 20), conferring resistance to β -lactams, then, *sulI* (14), *str-aphE* (13), *tetA* (9), *aphA* (8), *dhfr* (6), *aadA* (3), *cmIA* (3) and *cat* (2). The last three genes, *aacC4*, *carb3* and *sat*, were detected only once. Resistances to β -lactams, to streptomycin and to chloramphenicol can be each encoded by two different genes among those we detected, but they are never borne simultaneously by the concerned plasmids (Table 4). 15 of these genotypic profiles totally explain phenotypic profiles of the host strain. However, for 5 plasmids (pME5, pME11, pME19, pME25 and pME26), genes are lacking to explain some resistances conferred by the plasmid to the strain.

Table 4 also shows results of our searching of mobile genetic elements on the sequences. Thus, we can see that 18 plasmids, among the 20 sequenced plasmids, present transposase genes, and 14 carry insertion sequences. One plasmid, pME11, bears none of them. Thus, surprisingly, all resistance plasmids do not necessarily harbour one and/or other of these elements.

Adhesion capacity on inert surface

Conjugative plasmids encode conjugative pili and type IV secretion system (T4SS) that could potentially promote adhesion. In order to test this hypothesis with the 22 plasmids of this study, conjugative or not, adhesion experiments were performed in a 96-well polystyrene plate. This study was performed on DH5 α MCR transformants and environmental strains (Table 1, Fig. 1).

Regarding DH5 α MCR transformants, only one strain, DH5 α MCR(pME11), presents an adhesion ability significantly superior compared to DH5 α MCR (Fig. 1A). It must be noticed however, that no ability to autotransfer had been detected for the plasmid pME11 during its characterization in previous work (Laroche-Ajzenberg *et al.* 2014).

When transformants are compared with each other, independently of DH5 α MCR, three groups could be distinguished (a, b and c, Fig 1A). The first is composed of DH5 α MCR(pME11), which confers a stronger adhesion to its host strain (ratio to 5,5) than the other plasmids. The second group includes DH5 α MCR(pME5) and DH5 α MCR(pME6), which show a higher adhesion ability than the average of the other transformed strains (ratio of 3 against 1,5 on average), but still lower than that of DH5 α MCR(pME11). Finally, the last group includes strains DH5 α MCR harbouring plasmids pME17, pME19, pME21, pME23, pME25 and pME26, which show a lower adhesion than the average (ratio of 0,5 against 1,5 on average). Thus, nine plasmids among the 22 tested seem generate modifications of adhesion ability in DH5 α MCR, despite a quite strong experimental variability.

Regarding the environmental strains (Fig. 1B), surprisingly, the adhesion is generally lower than that of DH5 α MCR transformants. Here, two groups could be distinguished. The first one (b, Fig. 1B), only composed of EC α 2587 bearing plasmid pME26, shows an adhesion ability higher than the other environmental strains and than DH5 α MCR (ratio equal to 4). However, we can't conclude that this behaviour is due to the plasmid pM26, notably because this plasmid does not increase adhesion capacity in DH5 α MCR (Fig. 1A). The environmental strain

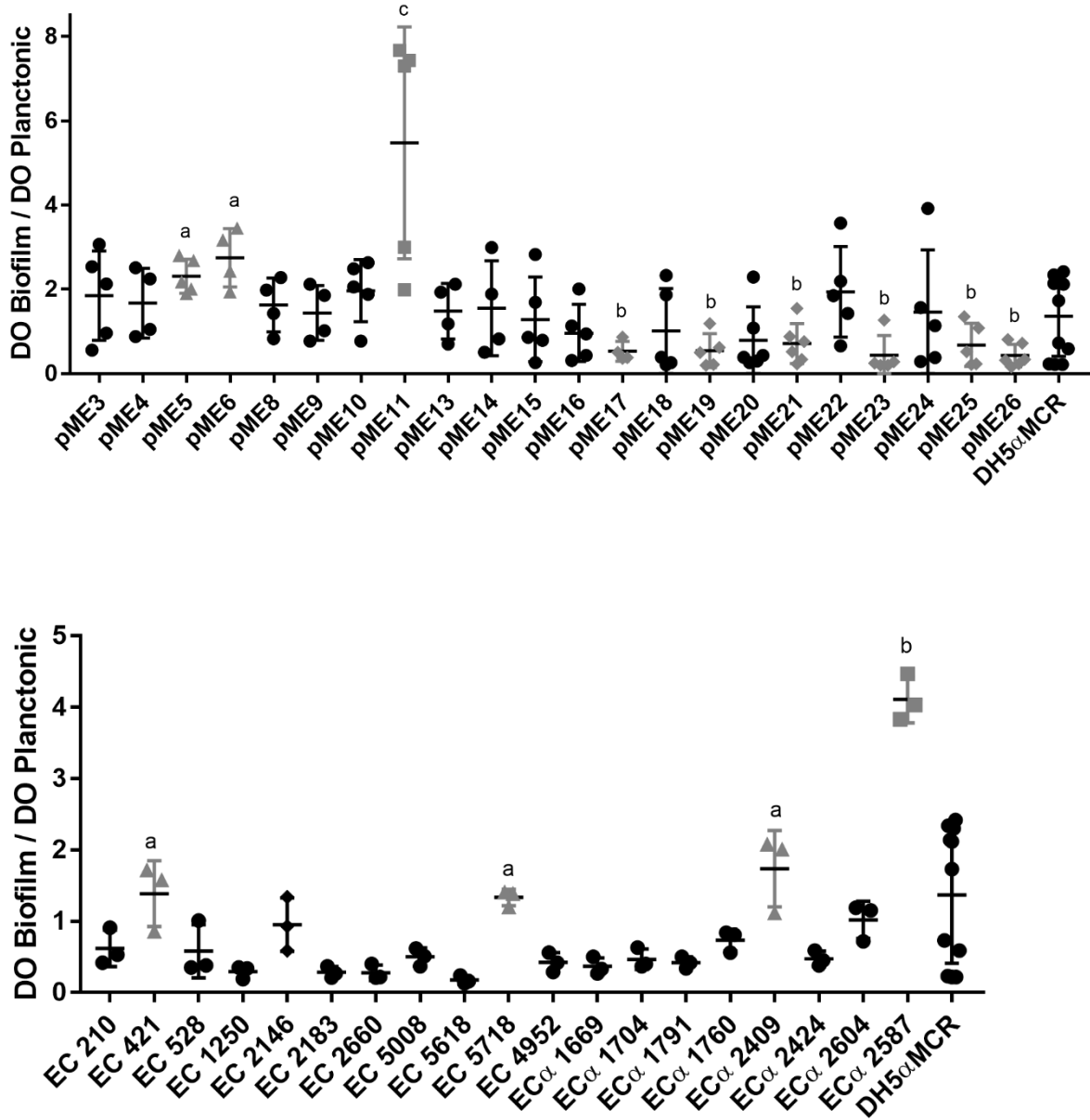


Fig 1: Adhesion on inert surface. A: DH5αMCR transformants carrying plasmids. Groups a, b and c are statistically different; B: Environmental strains. Groups a and b are statistically different. Statistical analyzes were performed by anova one-day with GraphPad Prism.

EC α 2587 could possess other features allowing a strong adhesion to the support used. The second distinguished group (a, Fig. 1B) includes strains EC421, EC5718 and EC α 2409, respectively carrying plasmids pME4+pME6, pME15 and pME21+pME22+pME24. This group has equal or slightly greater adhesion than DH5 α MCR (ratio of 1,5).

Plasmid stability over the generations

To ended this study, we were interested in determining the ability of the plasmids to maintain themselves in their host strain over the generations. Among the 22 DH5 α MCR transformants of this study, 15 were used to test the plasmid stability in DH5 α MCR. This strain requires 27 generations to form a colony (see Materials and methods). After 11 subcultures, so 297 generations on LB medium without antibiotic, 100% of the 50 clones tested were still resistant to antibiotics chosen according to the tested plasmid, and, therefore, still possessed the plasmid (data not shown). The same results were obtained for all the DH5 α MCR transformants evaluated. Thus, resistance plasmids studied, isolated from *E. coli* environmental strains, are stable in the laboratory strain DH5 α MCR, in the absence of any selection pressure, for at least several hundreds of generations.

Stability tests were also performed on three transconjugants of *P. putida* KT2440 carrying conjugative plasmids pME8, pME22 and pME24 (Table 3 and previous work). The strain KT2440 harbouring the conjugative plasmid RP4, a broad host range plasmid, IncP, was used as a control. The strain KT2440 required 25 generations to form a colony. For plasmids pME22, pME24 and RP4, after 275 generations on LB medium without antibiotic (11 subcultures), 100% of clones tested still possessed the plasmid. By contrast, the transconjugant strain KT2440(pME8) loses totally pME8 after 50 generations (2 subcultures). The same experiment was performed with another *P. fluorescens* strain, SBW25, carrying pME8 (Laroche-Ajzenberg *et al.* 2014) and, after 104 generations (4 subcultures, since this strain required 26 generations to form a colony), no more clone harboured the plasmid. Surprisingly, pME8, a broad host range conjugative plasmid, IncP, is highly instable in the two *Pseudomonas* strains tested, but is maintained in the *E.coli* species DH5 α MCR.

DISCUSSION

Plasmids studied in this work were isolated from multi-resistant *E. coli* strains collected from various surface waters and groundwater contaminated by enteric bacteria (Laroche *et al.* 2009; 2010; Flores Ribeiro *et al.* 2012). Indeed, environmental waters are vulnerable to faecal contamination, because, notably, of STEP effluent or run-off on pastures (Flores Ribeiro *et al.* 2012; 2014; Müller *et al.* 2018). Given the water use (drinking water production, irrigation, recreation), antibiotic resistances could thus go back to humans after ingestion of contaminated products or water and promote resistance acquisition by the intestinal microbiota or genetic exchanges (Gumpert *et al.* 2017; Lerner *et al.* 2017).

For the present study, we chose environmental *E. coli* strains harbouring a high number of antibiotic resistances, ranging from 4 to 12. Such a multi-resistance allowed us to assume that these strains are originating from human (Flores Ribeiro *et al.* 2012). Indeed, resistant faecal strains coming from livestock (as bovines farming) often present an antibiotic resistance level much weaker (one or two resistances). Of course, this depends on the watershed use (Laroche *et al.* 2010; Flores Ribeiro *et al.* 2012). Indeed, pig farming, for instance, produces faecal rejects containing multi-resistant enteric strains because of an important orally use of antibiotics (Aubry-Damon *et al.* 2004; Pu *et al.* 2018). It is however a special case.

The large majority of selected strains bears at least one plasmid. In two cases, we were even able to isolate several plasmids from a single strain: two for the strain EC210 (pME4 and pME6) and three for the strain EC α 2406 (pME21-22-24). Each plasmid presents a different resistance pattern, except pME15 and pME18 which possess only resistances to the penicillins amoxicillin and ticarcillin, associated with clavulanic acid (AMC-AMC-TIC-TIM). These resistances are besides largely predominant among the 22 plasmids studied, since only four plasmids do not carry them. Resistances to β -lactams are effectively widespread in enteric bacteria (Bajaj *et al.* 2016; Graham *et al.* 2016). It can be noticed that three of the four plasmids that do not bear these resistances were isolated from strains harbouring several plasmids whose at least one bears β -lactams resistances. Thus, the strains probably avoid accumulating same resistances. It could be a strategy for the bacteria to save their fitness (Hernando-Amado *et al.* 2017).

Resistances carried by plasmids largely explained the resistances of the environmental strains, except for the strain EC α 1669 harbouring pME17. These strain carries perhaps other plasmids

we could not isolated. Several plasmid-borne resistances were not expressed in the environmental host strain, but were expressed in DH5 α MCR. Such silent resistances have been already described (Enne *et al.* 2006). Overall, ten antibiotic resistances were found, involving five families of antibiotics most commonly used against gram-negative bacilli: β -lactams, aminoglycosids, phenicols, tetracyclines and sulfonamides. Regarding the resistance genes, 12 has been identified.

Among the 22 plasmids of the study, we were able to highlight that 15 plasmids are conjugative. In addition, we showed that they are stable over the generations in *E. coli*, which further promotes their dissemination and the potential transfer of resistance between environmental and intestinal microbiota in case of ingestion of contaminated food. Three plasmids, pME8, pME22 and pME24, even present a broad host range and can transfer by conjugation from *E. coli* to *P. putida*. Although the plasmid pME8 (IncP, 60 kb) do not persist in *Pseudomonas* in absence of selection pressure, the plasmids pME22 (Inc and size undetermined) and pME24 (IncB/O/K/Z, 107 kb) are able to maintain themselves in this genus. Thus, such plasmids can contribute very efficiently to the spread of antimicrobial resistance in the environment. The IncP group generally gathers plasmids with a size between 70 and 275 kb, low copy number and wide host range (present in *E. coli* and *Pseudomonas*) (Yano *et al.* 2013). They often bear resistances to β -lactams, sulfonamides, aminoglycosides and tetracyclines. All of this is in agreement with our results, except the surprising instability of pME8 in *P. putida* and *P. fluorescens*. The large IncB/O/Z/K group encompasses plasmids of 80 to 150 kb. The IncB/O group, less widespread than IncK, would provide various resistances such as β -lactams, sulfonamides, tetracyclines and aminoglycosides, as is the case for the plasmid pME24 (Rozwandowicz *et al.* 2018).

Plasmids are crucial in the spread of antibiotic resistances, but they are not the only genetic elements involved (Martinez *et al.*, 2009). Among them, are found integrons and transposons (Frost *et al.* 2005; Mazel 2006). 10 plasmids of 22 possess the *intI1* gene encoding the integrase of class 1 integrons. This class of integron is the most widespread and is often present in clinical resistant strains. They are also encountered in environmental strains, but less frequently. A single plasmid, pME5, additionally possesses the *intI2* gene, encoding class 2 integrase. We have not detected transposons and insertion sequences on all plasmids. In the plasmids pME6-8-15-17-18 and pME20, no IS could be detected which suggests that

transposons present would be non-composite. All this shows the complexity of the resistance structures that are a dynamic genetic mosaic that can reshape itself.

For bacteria, adhesion is often the first step to colonize efficiently an environment. If the presence of a resistance plasmid in a bacterium promote this initial interaction, it would mean that multi-resistant bacteria, which frequently carry plasmids, have an ecological advantage and could better persist in some ecosystems. Moreover, conjugative plasmids, such as those of the study, have the particularity of using a conjugation pilus to allow formation of the conjugation pore. It has been shown that type IV pili may play a role in the surface adhesion of bacteria (Barbercheck *et al.* 2018). We tested the potential involvement of the 22 plasmids of this study in bacterial adhesion on inert surface by using the 22 DH5 α MCR transformants. Despite large biological variability, we were able to distinguish three different behaviours. First, there were strains whose adhesion ability did not differ or very slightly from DH5 α MCR. In this group, we find conjugative plasmids with a wide host range. Then, there were plasmids pME5 and pME6, whose adhesion capacity of their host strains was slightly increased compared to DH5 α MCR. These two plasmids are conjugative with a restricted host range. Finally, pME11, a very small plasmid of 4.5kb, confers to its host strain significantly increased adhesion ability. Thus, involvement of conjugative plasmids on adhesion ability of their host strain remains unclear. Others factors certainly arise. For instance, plasmid size could indirectly interfere. Thus, small plasmid, necessarily non conjugative, would potentially cost less energy to the bacteria than a large conjugative plasmid. Bacteria would be then in a better metabolic state for adhering to a surface (Millan *et al.* 2015; San and MacLean 2017).

In conclusion, we would like to emphasise that sophisticated plasmids carrying multi-resistances to antibiotic are frequently isolated from the faecal bacteria massively released in the environment and this observation attests of their wide presence in the contaminated ecosystems. This study contributes to the description of the key role of these plasmids in the spread of antibiotic resistances and illustrates the efficiency with which bacteria build genetic supports, all different, but following the same architectural rules, in order to respond successfully to the selection pressure that we impose to them.

REFERENCES

- Aminov, R.I., 2011. Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Front. Microbiol.* 2.
- Aubry-Damon, H., Grenet, K., Sall-Ndiaye, P., Che, D., Cordeiro, E., Bougnoux, M.-E., Rigaud, E., Le Strat, Y., Lemanissier, V., Armand-Lefèvre, L., Delzescaux, D., Desenclos, J.-C., Liénard, M., Andremont, A., 2004. Antimicrobial Resistance in Commensal Flora of Pig Farmers. *Emerg Infect Dis* 10, 873–879.
- Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L., 2005. Survival of *E. coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *Journal of Applied Microbiology* 98, 814–822.
- Bajaj, P., Singh, N.S., Viridi, J.S., 2016. *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Front. Microbiol.* 7.
- Barbercheck, C. R. E., Bullitt, E., & Andersson, M. (2018). Bacterial adhesion pili. In *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (pp. 1-18). Springer, Singapore. Bonnet, R., Caron, F.,
- Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., n.d. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* 63, 219–228.
- Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. 2014. April 28th. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K., & Verhaegen, J. (2001). Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology*, 17(1), 53-62.
- Cooley, M., Carychao, D., Crawford-Miksza, L., Jay, M.T., Myers, C., Rose, C., Keys, C., Farrar, J., Mandrell, R.E., 2007. Incidence and Tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a Major Produce Production Region in California. *PLOS ONE* 2, e1159.
- Davies, J., 2007. Microbes have the last word: A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO reports* 8, 616–621.
- Enne, V.I., Delsol, A.A., Roe, J.M., Bennett, P.M., 2006. Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 3003–3010.
- Flores Ribeiro, A., Laroche, E., Hanin, G., Fournier, M., Quillet, L., Dupont, J.-P., 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.

- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F., 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28, 79–100.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3, 722–732.
- Garcillán-Barcia, M.P., Alvarado, A., de la Cruz, F., 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev* 35, 936–956.
- Gillings, M.R., Stokes, H.W., 2012. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends in Ecology & Evolution* 27, 346–352.
- Graham, D.W., Knapp, C.W., Christensen, B.T., McCluskey, S., Dolfing, J., 2016. Appearance of β -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20th Century. *Scientific Reports* 6, 21550.
- Gumpert, H., Kubicek-Sutherland, J.Z., Porse, A., Karami, N., Munck, C., Linkevicius, M., Adlerberth, I., Wold, A.E., Andersson, D.I., Sommer, M.O.A., 2017. Transfer and Persistence of a Multi-Drug Resistance Plasmid in situ of the Infant Gut Microbiota in the Absence of Antibiotic Treatment. *Front. Microbiol.* 8.
- Hernando-Amado, S., Sanz-García, F., Blanco, P., Martínez, J.L., 2017. Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance. *Essays In Biochemistry* 61, 37–48.
- Hess, T.F., Grdzlishvili, I., Sheng, H., Hovde, C.J., 2004. Heat Inactivation of *E. coli* During Manure Composting. *Compost Science & Utilization* 12, 314–322.
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K., 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology, Ecology and industrial microbiology / Special section: Archaea* 14, 236–243.
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., ... & Doshi, S. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, gkw1004.
- Jiang, X., Morgan, J., & Doyle, M. P. (2002). Fate of *Escherichia coli* O157: H7 in manure-amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2605-2609.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 68, 118–130.
- Laroche, E., Petit, F., Fournier, M., Pawlak, B., 2010. Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology* 392, 12–21.
- Laroche-Ajzenberg, E., Ribeiro, A.F., Bodilis, J., Riah, W., Buquet, S., Chaftar, N., Pawlak, B., 2014. Conjugative multiple-antibiotic resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated

- from environmental waters contaminated by human faecal wastes. *Journal of Applied Microbiology* 118, 399–411.
- Lerner, A., Matthias, T., Aminov, R., 2017. Potential Effects of Horizontal Gene Exchange in the Human Gut. *Front. Immunol.* 8.
- Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., Olanczuk-Neyman, K., 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal waste water treatment plant. *Water Research* 44, 5089–5097.
- Martinez, J.L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J.F., Martinez-Solano, L., Sanchez, M.B., 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33, 44–65.
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* 4, 608–620.
- Millan, A.S., Santos-Lopez, A., Ortega-Huedo, R., Bernabe-Balas, C., Kennedy, S.P., Gonzalez-Zorn, B., 2015. Small-Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Is Enhanced by Increases in Plasmid Copy Number and Bacterial Fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3335–3341.
- Morehead, M.S., Scarbrough, C., 2018. Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 45, 467–484.
- Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R.M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C., Bierbaum, G., 2018. Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiol Ecol* 94.
- Norman Anders, Hansen Lars H., Sørensen Søren J., 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 2275–2289.
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 51, 381–395.
- Paterson, D.L., 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine* 119, S20–S28.
- Pu, C., Liu, H., Ding, G., Sun, Y., Yu, X., Chen, J., Ren, J., Gong, X., 2018. Impact of direct application of biogas slurry and residue in fields: In situ analysis of antibiotic resistance genes from pig manure to fields. *Journal of Hazardous Materials* 344, 441–449.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D.J., Hordijk, J., 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 73, 1121–1137.

- San, A.M., MacLean, R.C., 2017. Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiol Spectr* 5.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.C., 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* 3, 119-132.
- Thomas, C.M., 2000. Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiology* 37, 485–491.
- Van Domselaar GH, Stothard P, Shrivastava S, Cruz JA, Guo A, Dong X, Lu P, Szafron D, Greiner R, Wishart DS. BASys: a web server for automated bacterial genome annotation. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W455-9.
- Von Wintersdorff C.J.H., Penders J., van Niekerk J.M., Mills N.D., Majumder S., van Alphen L.B., Savelkoul P.H.M. and Wolffs P.F.G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology* 7: 1-10.
- Yano, H., Rogers, L.M., Knox, M.G., Heuer, H., Smalla, K., Brown, C.J., Top, E.M., 2013. Host range diversification within the IncP-1 plasmid group. *Microbiology* 159, 2303–2315.
-

Le but de cette étude était d'une part de contribuer à la description et à la compréhension du phénomène génétique de dissémination de l'antibiorésistance *via* les milieux aquatiques naturels, mais également d'avoir des arguments pour le choix de souches qui permettront de débiter notre travail sur la persistance de bactéries entériques antibiorésistantes sur des produits maraîchers.

Deuxième partie

Etude de la persistance de
souches de *E. coli*
antibiorésistantes sur de jeunes
plants de laitues

Deuxième partie : persistance de *E. coli* sur des plants de laitues

Tableau 3 : Tableau récapitulant les caractéristiques principales des plasmides étudiés précédemment

Souches Environnementales	Site d'étude	Nombre de plasmides	Nom du plasmide	Nombre de résistances	Taille (kb)	Groupe Inc	Caractère conjugatif	Adhésion surface inerte	
								Environnementale	Souche de laboratoire
EC 210	Rouen	1	pME3	6	114	Q + FIA + FIB	Intra-espèce	-	+/-
EC 421	Le Croisset	2	pME4	1	135	FIB + FII	Intra-espèce	+/-	+/-
			pME6	6	120	Q + B/O	Intra-espèce		+
EC 528	Caudebec	1	pME5	8	194	FIA + H1B + H1A	Intra-espèce	-	+
EC 1250	Norville	1	pME9	7	137	FIB + FIC	Intra-espèce	-	+/-
EC 2146	Norville	1	pME11	6	4,5	ND	Non observé	-	++
EC 2183	Norville	1	pME10	6	132	FIA + FIB	Non observé	-	+/-
							Intra et inter-espèce		
EC2660	Radicatel	1	pME8	7	60	P	espèce	-	+/-
EC 5008	Bruisseresse	1	pME13	6	154	Q + FIB + FII	Intra-espèce	-	+/-
EC 5618	Moulin B	1	pME14	6	69	R + FIA	Non observé	-	+/-
EC 5718	Moulin B	1	pME15	4	57	ND	Intra-espèce	+/-	+/-
EC 4952	Bruisseresse	1	pME16	4	147	FIB + FII	Non observé	-	+/-
ECα 1669	Cerlangue Eau traitée	1	pME17	2	90	I1	Intra-espèce	-	-
ECα 1704	Cerlangue Eau de Rejet	1	pME18	4	8,4	ND	Non observé	-	+/-
ECα 1791	Lagune Eau traitée	1	pME19	6	148	Q + FIB + FII	Intra-espèce	-	-
ECα 1760	Lagune Eau brute	1	pME20	4	95	B/O/Z/K	Intra-espèce	-	+/-
ECα 2409	Cerlangue Eau de Rejet	3	pME21	5	155	Q + FIB + FII	Intra-espèce		-
							Intra et inter-espèce	+/-	+/-
							Intra et inter-espèce		
			pME24	2	107	B/O	espèce		+/-
ECα 2424	Cerlangue Eau de rejet	1	pME23	7	141	Q + FIB + FII	Intra-espèce	-	-
ECα 2604	Lagune Eau de Rejet	1	pME25	4	111	Q + FIB + FII	Intra-espèce	-	-
ECα 2587	Lagune Eau traitée	1	pME26	5	98	FIB + FII	Intra-espèce	++	-

A. Contexte et Objectifs

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes donc intéressés à la persistance de différentes souches de *E.coli* porteuses ou non de plasmides d'antibiorésistance, sur différentes variétés de laitue. Nous avons notamment cherché à savoir si le port d'un plasmide d'antibiorésistance pouvait avoir un impact sur l'adhésion de souches de *E. coli* à la surface d'une feuille de laitue.

Pour réaliser ce travail, 11 souches ont été sélectionnées parmi celles précédemment étudiées (Tableau 3) et des contaminations de jeunes plants de laitues ont été effectuées en conditions contrôlées au sein de la serre expérimentale Normand Serre (Figure 42). Normand Serre, inaugurée le 21 septembre 2015, est une station expérimentale de Recherche et Développement dédiée à la production et à la valorisation du végétal. C'est une serre qui possède des cellules de culture de niveau S1 et S2, le niveau S2 permettant d'effectuer des contaminations de plantes avec des phytopathogènes et, comme dans notre cas, avec des bactéries humaines non pathogènes ou pathogènes de catégorie 2 (comme *Salmonella*). Nous avons ainsi pu nous placer dans des conditions de culture de la laitue optimales et contrôlées (voir la partie « Matériels et méthodes »). L'intérêt était d'avoir toujours les mêmes paramètres pour obtenir des réplicats biologiques comparables. Cependant, le fait d'être en conditions contrôlées, par définition, est restrictif par rapport aux conditions réelles de culture.

Le choix de la laitue comme modèle d'étude s'est imposé à nous comme étant naturel. C'est en effet l'un des végétaux crus les plus consommés et la France est le 3^e producteur européen, après l'Espagne et l'Italie, avec 10601 ha cultivés en 2015. La Normandie fait partie des régions productrices de salades dites d'été (notamment les laitues Pommées). Mieux connaître la persistance des bactéries entériques à la surface des laitues est donc un enjeu sanitaire et économique majeur.

Deuxième partie : persistance de *E. coli* sur des plants de laitues



Figure 42: Image des cultures en conditions contrôlées à Normand Serre.

A: Normand Serre vue de l'extérieur

B: jeunes plants de laitue romaine prêts à être contaminés

C: cellule de culture avec un voile permettant de protéger des UV et de garder une hygrométrie constante

D : plants de laitue romaine contaminés.

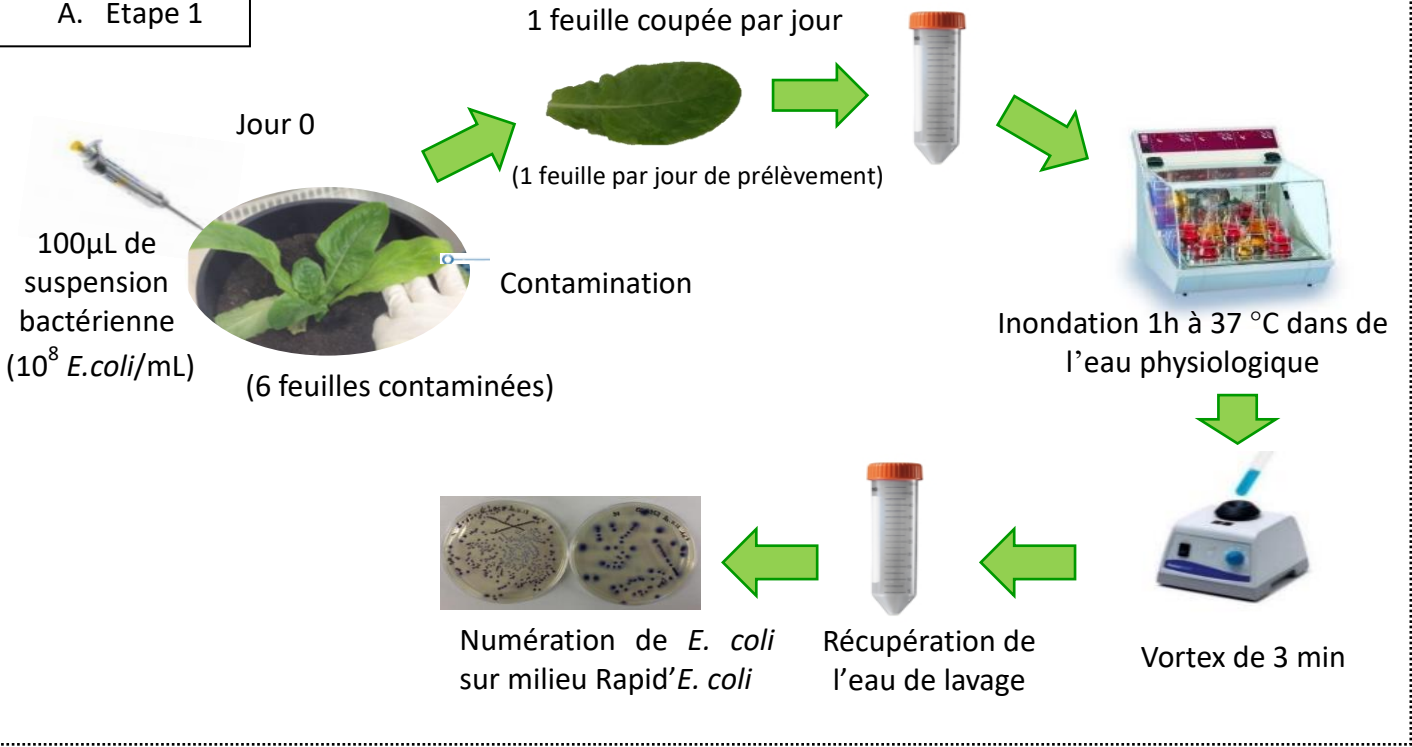
B. Paramètres de l'étude

I. Le choix des souches bactériennes

Les souches utilisées pour contaminer les plants ont été principalement choisies selon les caractéristiques des plasmides de résistance étudiés lors de la première partie de ce travail (Tableau 3). Nous voulions avoir un panel représentatif des plasmides à notre disposition, notamment des conjugatifs à large et étroit spectre d'hôte, et des plasmides non conjugatifs. Pour ces derniers, parmi nos 22 plasmides, nous avons le choix entre pME10, pME11, pME16 et pME18. Le pME11 s'est tout de suite imposé, car il augmentait nettement l'adhésion de la souche DH5 α MCR sur surface inerte. Il s'agit d'un petit plasmide (4,5 kb), donc totalement atypique de ce point de vue par rapport aux autres plasmides, potentiellement multi-copies, et possédant 6 résistances aux antibiotiques. Nous avons, en plus, choisi pME16, d'une taille plus conséquente (147 kb), donc certainement à faible nombre de copies, voire mono-copie, et possédant 4 résistances. Ensuite, au niveau des plasmides conjugatifs à large spectre d'hôte, nous avons trois possibilités, pME8, pME22 et pME24. Le plasmide pME8 est le seul à appartenir au groupe d'incompatibilité IncP et possède 7 résistances avec une taille intermédiaire (60kb). Il nous restait à choisir entre pME22 et pME24 qui sont proches, malgré peut être une adhésion sur surface inerte un peu plus haute pour pME22. Nous avons choisi de prendre le plasmide possédant le moins de résistances, soit pME22, qui n'en porte qu'une, ce qui est inhabituel parmi les 22 plasmides étudiés. Lors de ce choix, les résultats de séquençage n'étaient pas arrivés et nous ne savions donc pas qu'il y aurait une difficulté avec le plasmide pME22. Malgré un nouvel essai de séquençage, nous n'avons hélas pas pu obtenir la séquence de ce plasmide. Les manipulations sur plants étant bien avancées, nous avons malgré tout décidé de continuer avec pME22. Enfin, nous voulions un plasmide conjugatif à spectre d'hôte étroit. Nous avons choisi le pME23, car il s'agit du plasmide qui porte le plus grand nombre de résistances (au nombre de 7). De plus, sur surface inerte, la souche DH5 α MCR(pME23) présente une adhésion diminuée. Cinq plasmides ont donc été choisis, correspondant à 10 souches, puisque, en plus des souches de DH5 α MCR transformées avec chacun d'entre eux, nous avons décidé d'étudier les souches environnementales portant naturellement ces plasmides.

Deuxième partie : persistance de *E. coli* sur des plants de laitues

A. Etape 1



B. Etape 2

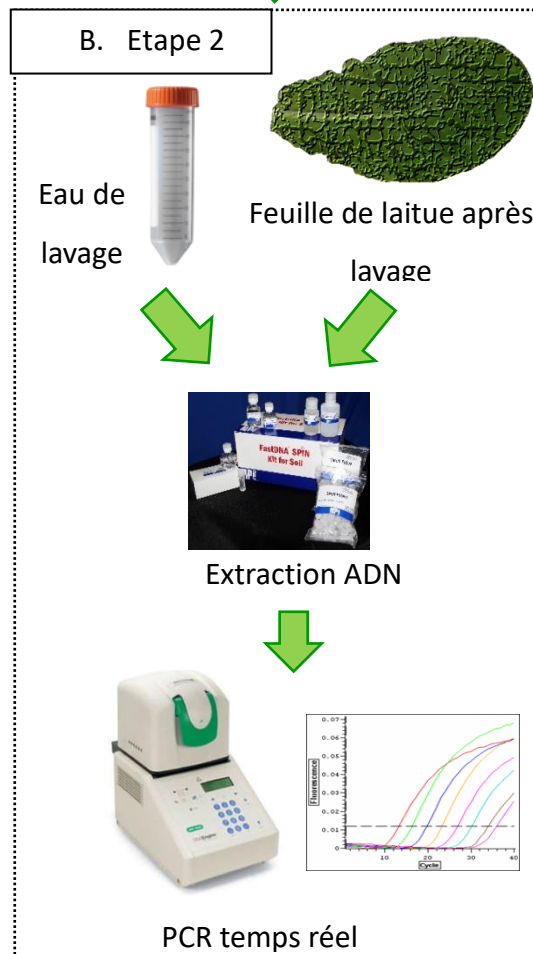


Figure 43: Stratégie d'étude de la survie et de l'adhésion des souches de *E. coli* sur les feuilles de laitues.

L'étape 1 correspond aux étapes de lavage de la feuille permettant de récupérer les bactéries vivantes et viables faiblement liées à la feuille (numération sur milieu Rapid'E. coli).

L'étape 2 permet d'obtenir le nombre de copies du gène *iduA* présent sur les feuilles et dans l'eau de lavage, et ainsi d'accéder au nombre total de bactéries (vivantes, mortes et lysées) présentes.

Avec notre panel de plasmides, nous avons tous les cas de transferts représentés, ainsi que les différentes adhésions sur plaque (« - », « +/- » et « ++ »), le nombre de résistances portées (de 1 à 7) et la taille (grand mono-copie, intermédiaire, et petit multi-copies). Cela nous fait un total de 11 souches à tester : les DH5 α MCR transformées portant les plasmides pME8, pME11, pME16, pME22 et pME23, les souches issues de l'environnement associées, respectivement EC2660, EC2146, EC4952, EC α 2409 et EC α 2424 et, bien sûr, la DH5 α MCR non transformée.

II. Les variétés de laitues

Les expérimentations ont été réalisées sur des laitues de deux variétés différentes : Pommée et Romaine. En effet, la région normande produit principalement des laitues Pommées et la principale variété de laitue produite dans le monde est la Romaine. De plus, la laitue Romaine, qui n'est pas encore cultivée en France, devrait arriver prochainement dans nos productions maraîchères, car elle présente une robustesse de culture particulièrement intéressante.

III. Mise au point du protocole de contamination volontaire des plants de laitue et de récupération des bactéries

La stratégie d'étude de la survie et de l'adhésion des bactéries est présentée en Figure 43. Pour réaliser les contaminations volontaires des feuilles de laitues, nous avons choisi d'utiliser des inocula de 10^7 UFC. Cette taille d'inoculum est certes importante, même comparée aux niveaux de contamination élevés mesurés dans des eaux très contaminées, par des rejets de STEP par exemple, comme les rivières ou les fleuves (10^3 à 10^4 *E. coli* / 100mL) (Laroche *et al.* 2009). Cependant, notre capacité d'observation et de mesure serait très limitée pour des inocula plus réduits. Une fois la contamination réalisée, nous avons réalisé les premiers prélèvements après 24h (récolte de la première feuille de chaque plant contaminé), pour voir s'il y avait une installation rapide des bactéries, puis tous les deux jours environ. Nous avons ainsi pu quantifier la survie et l'installation des bactéries au cours du temps sur 11-12 jours. A chaque prélèvement de feuilles, pour récupérer les bactéries, nous avons choisi de réaliser d'abord un lavage doux par un bain de 1h à 37°C dans de l'eau physiologique afin de

décrocher les bactéries faiblement fixées à la surface de la feuille. Puis nous passons à un lavage plus fort, avec un vortex à vitesse maximale (3 min), pour essayer de récupérer les bactéries un peu plus adhérentes. Après ces étapes, les bactéries non récupérées pouvaient être considérées comme fortement adhérentes aux feuilles. A chaque étape de cette stratégie expérimentale, il a fallu faire des mises au point.

La première mise au point réalisée a été au niveau des plants de laitues. Les premiers plants utilisés ont été cultivés à partir de graines de laitue Pommée et Romaine achetées dans le commerce (voir le « Matériels et méthodes »). Les graines étaient placées dans un terreau spécifique pour semi, puis, au stade 2 feuilles, les jeunes pousses étaient replantées dans des pots individuels comprenant deux kilos d'un mélange de terre à planter et de terre végétale, permettant d'apporter tous les nutriments pour les plants tout en ayant une terre assez légère et aérée. Pour obtenir un plant avec 6 feuilles, il fallait compter un mois. Ce stade 6 feuilles nous permettait d'avoir des plants (1) avec suffisamment de feuilles pour 15 jours de prélèvements et (2) assez petits pour mettre plusieurs pots côte à côte sans que les feuilles ne se touchent. Cependant, les jeunes plants étaient très fragiles et la cellule S2 pas assez grande pour réaliser à la fois les cultures des plants et les contaminations. Nous avons donc choisi de travailler sur des plants fournis par le SILEBAN, station expérimentale légumière partenaire du projet PATHOGREEN. Pour supporter le transport et permettre leur adaptation dans la serre, les jeunes pousses nous ont été envoyées au stade 4 feuilles. Il fallait donc attendre 15 jours après la réception des plants pour pouvoir les contaminer.

Le second point important a été de déterminer les conditions de lavages qui nous permettraient de récupérer le plus efficacement possible les bactéries faiblement accrochées à la surface végétale. Plusieurs essais ont été réalisés, regroupés dans la Figure 44. Dans notre premier protocole, nous avons commencé par une inondation de 1h à 37°C sous agitation dans de l'eau physiologique suivie de deux fois 1 min de vortex. Puis, l'eau physiologique a été remplacée par du tampon phosphate pour trois fois une minute de vortex. Le tampon phosphate permet de fragiliser les liaisons potentiellement établies entre les bactéries et la feuille et ainsi favorise le décrochage. A chaque étape, les tampons de lavage étaient récupérés pour dénombrer les bactéries décrochées sur Rapid'*E.coli*. Les résultats des

Deuxième partie : persistance de *E. coli* sur des plants de laitues

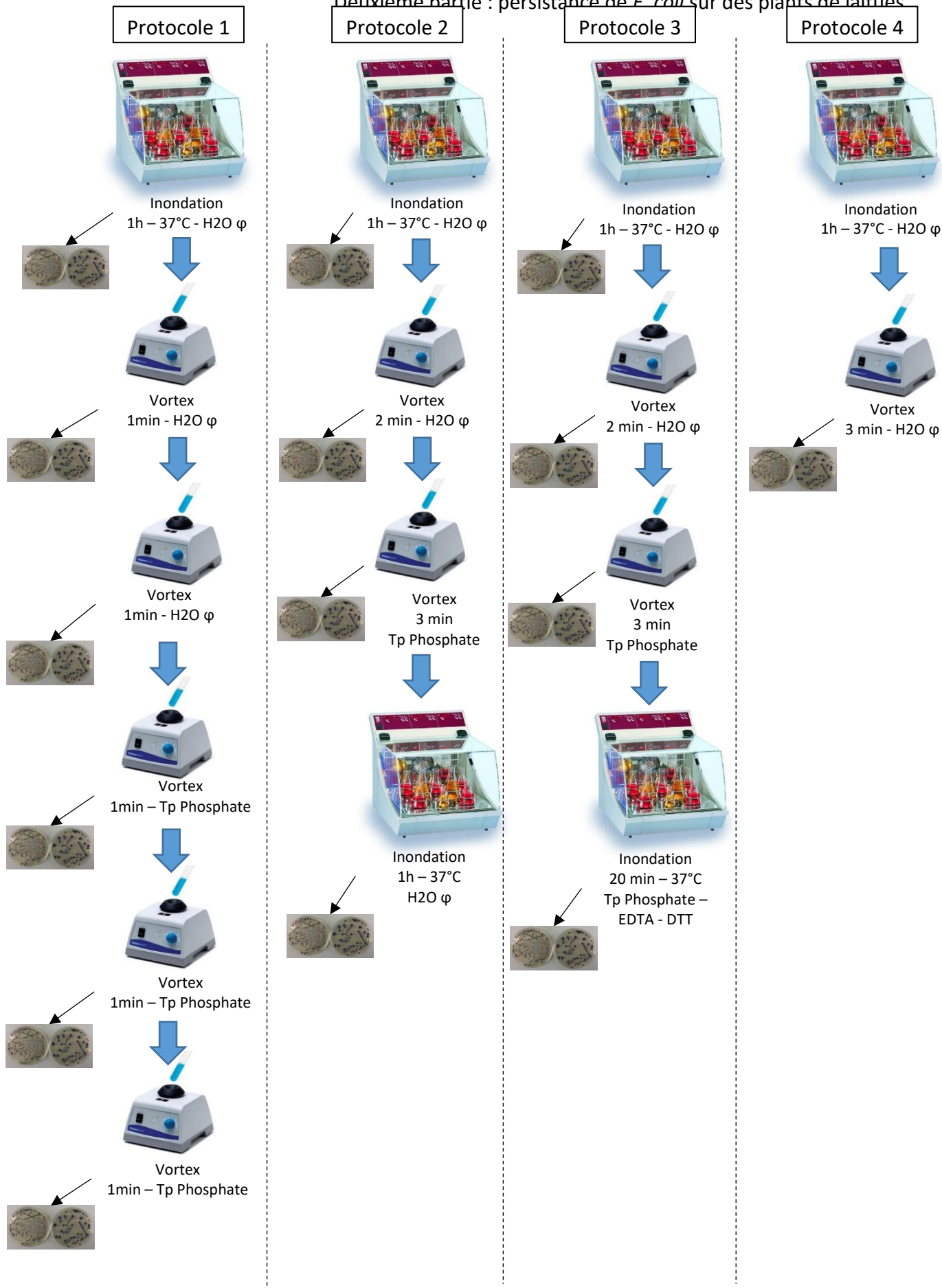


Figure 44 : Evolution des protocoles de lavage pour le décrochage des bactéries *E. coli* faiblement liées à la feuille de laitue.

dénombrements nous ont montré que l'on arrivait à décrocher des bactéries dans toutes les fractions, mais avec une densité qui diminuait fortement dans les dernières étapes.

Ce protocole étant long à effectuer et demandant beaucoup de matériel, nous avons décidé de regrouper certaines étapes pour réaliser le protocole numéro 2 (Figure 44). Ainsi, l'étape d'inondation de 1h dans l'eau physiologique sous agitation est toujours gardée, mais le fractionnement des vortex de 1 min a été regroupé en un seul vortex de 2 min et 3 min (même temps au final, mais en une seule fois) et une étape a été ajoutée. En effet, après le vortex, nous avons choisi de rajouter 1h d'inondation à 37°C dans du tampon phosphate. Nous préférons faire une inondation pour ne pas trop abimer les feuilles qui venaient de subir 5 min de vortex. Comme précédemment, à chaque étape, des dénombrements étaient effectués. Après analyse des résultats, nous avons constaté que la deuxième inondation ne permettait pas de décrocher plus de bactéries. Un troisième protocole de décrochage a été tenté (Figure 44), avec utilisation d'un tampon plus stringent contenant du tampon phosphate, de l'EDTA⁴⁰ et du DTT⁴¹. Le mélange tampon phosphate et EDTA est connu pour favoriser le détachement et la re-suspension des cellules et le DTT permet de rompre des ponts disulfures. Après avoir vérifié l'innocuité de ce nouveau tampon vis-à-vis de nos souches, nous avons remplacé la dernière étape du protocole 2, à savoir l'inondation dans du tampon phosphate, par une inondation de 20 min à 37°C sous agitation dans le tampon phosphate + EDTA + DTT. Cette dernière tentative n'a cependant pas permis d'améliorer la récupération des bactéries à partir de la feuille. De plus, l'EDTA et DTT, bien qu'inoffensifs pour les bactéries, ont eu un effet négatif sur les feuilles de laitue qui devenaient très fragiles et transparentes. L'ensemble de nos résultats ont montré que la plupart des bactéries décrochées l'étaient lors des deux premières étapes dans l'eau physiologique. Nous avons donc décidé de ne conserver que les étapes d'inondation et de vortex dans l'eau physiologique en ajoutant 1 min supplémentaire de vortex, formant ainsi le protocole 4 (Figure 44). Ceci a permis de conserver la feuille de laitue dans un état suffisamment correct pour pouvoir la récupérer, la conserver à -20°C et l'utiliser ensuite afin de quantifier par qPCR la densité bactérienne restée sur la laitue (Figure 43).

⁴⁰ EDTA : Éthylène Diamine TétraAcétique

⁴¹ DTT : Dithiothréitol

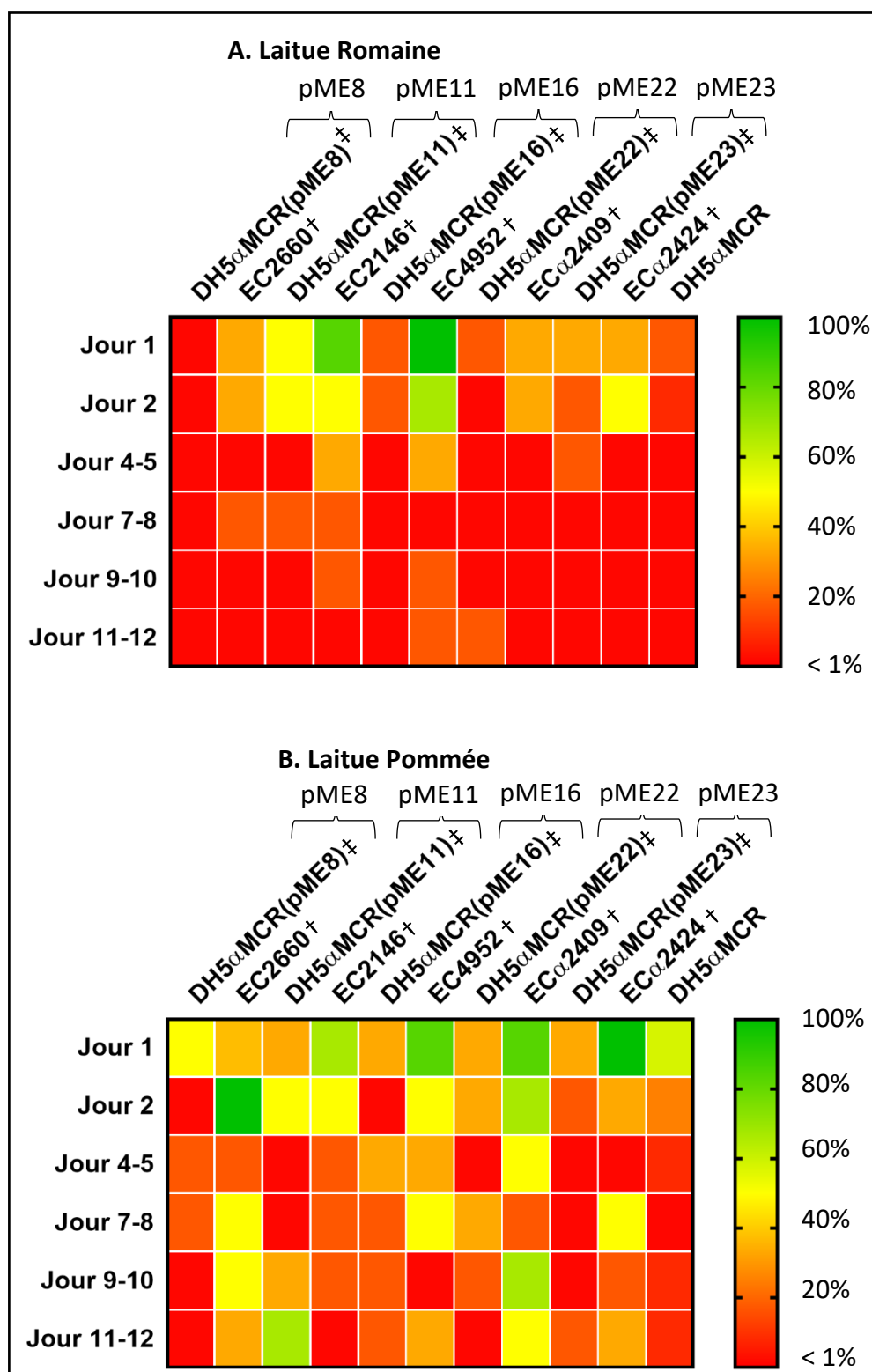


Figure 45 : Heat-Maps indiquant le pourcentage de recouvrement des souches de *E. coli* cultivables dans l'eau de lavage en fonction du temps.

Le pourcentage de recouvrement est obtenu en calculant le rapport Nombre de *E. coli* cultivables totales récupérées (en UFC) / Nombre de *E. coli* initialement déposé ($\approx 10^7$ UFC). En A est présenté le recouvrement pour la laitue Romaine et en B pour la laitue Pommée. Plus la couleur est verte et plus on se rapproche du 100% de récupération des bactéries.

< 1% correspond à notre limite de détection (soit $< 2.10^3$ UFC)

\ddagger : souches de laboratoire DH5 α MCR transformées avec les plasmides de résistance aux antibiotiques

\dagger : souches environnementales contenant naturellement le plasmide de résistance

C. Résultats

I. Recouvrement des bactéries *E. coli* cultivables au cours du temps

Les 11 souches choisies ont été chacune utilisée pour contaminer volontairement 6 feuilles de jeunes plants (pour assurer 6 temps de prélèvement) des deux variétés de laitues. Cette contamination volontaire et son suivi sur 11-12 jours ont été réalisés entre 2 et 3 fois (pour un total de 6 réplicats biologiques) pour chaque couple souche/variété. A chacun des 6 temps de prélèvement (répartis du jour 1 à 11-12), une feuille est prélevée sur chaque plant et lavée selon le protocole 4 présenté ci-dessus (Figure 44). Une numération des *E. coli* cultivables récupérées dans l'eau de lavage est ensuite réalisée sur le milieu gélosé Rapid'*E.coli* (Figure 44). Les résultats sont exprimés en pourcentages de recouvrement permettant l'élaboration de Heat-Maps (Figure 45). Ces dernières sont des représentations graphiques de données statistiques faisant correspondre une grandeur de valeurs à un nuancier de couleurs. Cela nous a permis de donner un aspect plus visuel à nos données biologiques qui présentaient une certaine variabilité. En effet, de façon générale, les études d'adhésion sont assez délicates à mettre au point et à mener, car de nombreux paramètres interviennent et la maîtrise des conditions d'expérimentation n'est jamais totale. Ainsi, la reproductibilité des résultats en valeurs absolues a été parfois fragile, mais des tendances solides peuvent être observées au fil des répétitions.

Quatre paramètres peuvent être discutés pour leur influence sur l'adhésion des bactéries sur les feuilles de laitues :

- **Effet « variété de laitue »** : L'un des premiers éléments remarquables est la différence de recouvrement entre les deux variétés de laitues. En effet, nous pouvons voir que le pourcentage de recouvrement est globalement plus élevé chez la laitue Pommée (davantage de vert, indiquant un fort pourcentage de recouvrement) par rapport à la laitue Romaine (beaucoup plus rouge, indiquant un faible pourcentage de recouvrement), notamment lors des derniers jours d'expérimentation. Ainsi, pour la laitue Romaine au dernier jour, nous nous trouvons en dessous du seuil de détection de la technique de numération pour une grande partie des souches, alors que pour la laitue Pommée, seules trois souches se retrouvent en dessous de ce seuil, au même temps d'expérimentation. Deux hypothèses peuvent être envisagées : soit (1) les capacités d'adhésion des bactéries sont supérieures sur les feuilles de

la laitue Romaine (on en récupère moins à partir de la Romaine avec un simple lavage), soit (2) les bactéries survivent mieux sur la variété Pommée que sur la variété Romaine (et c'est pourquoi plus seraient dénombrées sur le milieu Rapid'*E.coli* à partir de la Pommée).

- **Effet « temps de contact »** : Le deuxième élément à remarquer est une différence de récupération des souches cultivables selon le temps de contact. Effectivement, plus long est ce temps de contact avec les feuilles de laitue et moins les bactéries cultivables sont récupérées. Comme précédemment, la première explication pourrait être que le temps renforce les interactions entre la feuille et les bactéries. Ainsi, ces dernières s'installeraient, resteraient fortement adhérentes aux feuilles et ne pourraient donc pas être facilement décrochées. La deuxième explication pourrait être que l'état métabolique des bactéries se dégrade au fil du temps, et qu'elles soient sous forme viable non cultivable (VNC), ou tout simplement mortes, lysées ou non.

- **Effet « origine des souches »** : Le troisième point notable est une différence de recouvrement entre les souches de laboratoire DH5 α MCR transformées et les souches issues de l'environnement. Ainsi, le pourcentage de recouvrement des bactéries cultivables est globalement plus important pour les souches environnementales. Là encore, deux hypothèses peuvent être posées pour expliquer ce résultat : soit (1) les souches de laboratoire présentent une adhésion sur feuille supérieure à celle des souches environnementales (on en récupère donc moins avec un simple lavage), soit (2) les souches de laboratoire survivent moins bien (entrent en VNC ou meurent) que les souches environnementales sur les feuilles de laitues (et c'est pourquoi moins seraient dénombrées sur le milieu Rapid'*E.coli*). Cet « effet de souche » est vrai pour les deux variétés de laitue.

- **Effet « plasmides »** : Enfin, le dernier point à noter est l'absence d'un effet visible des plasmides sur l'accrochage des souches. En effet, nous ne pouvons pas voir si les plasmides ont un effet ou non, car nous avons du mal à récupérer DH5 α MCR. Soit la souche s'accroche trop pour laisser voir un effet net des plasmides, soit elle meurt ou entre en VNC, ne nous permettant pas de quantifier son décrochage.

Ainsi, cette stratégie d'étude nous a permis de mettre en évidence des différences de comportement des souches en fonction de la variété de laitue, du temps de contact et de leur

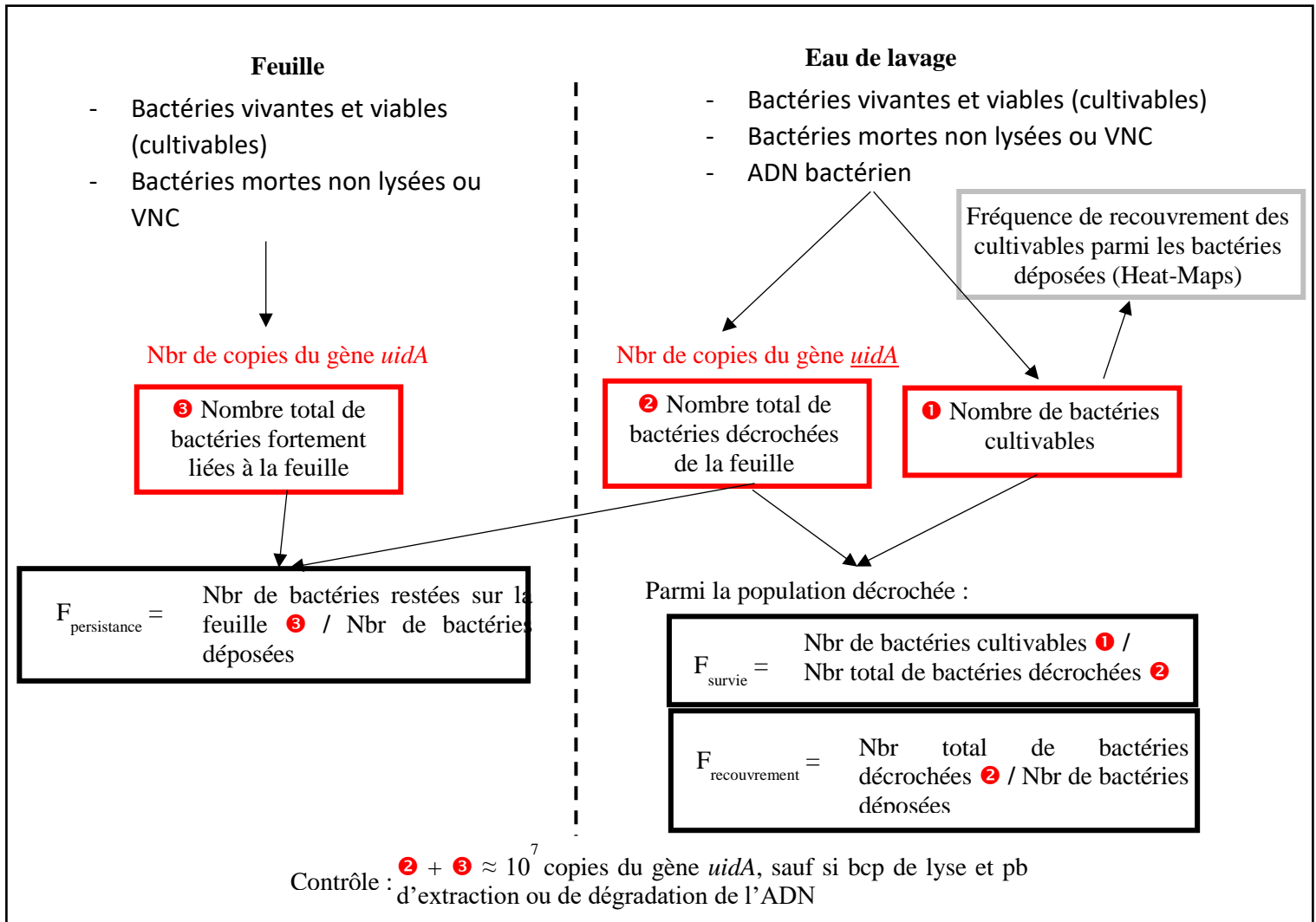


Figure 46 : Stratégie d'étude de la survie et de l'adhésion après les différentes étapes de lavage

origine. Cependant, lorsque les bactéries cultivables ne sont pas ou peu détectables dans l'eau de lavage, il est impossible de différencier une forte adhésion sur la feuille d'une faible survie (ou d'un fort état de stress). Pour lever cette difficulté, nous avons quantifié les souches de *E. coli* dans les deux compartiments (feuille et eau de lavage) par PCR quantitative à J1 et J11, en ciblant le gène *uidA*, codant la β -D-glucuronidase de *E. coli*. Ce dénombrement moléculaire ne permettra pas de discriminer entre bactéries mortes ou en état VNC, mais permettra tout de même de savoir si le phénomène biologique observé est une adhésion ou un défaut d'adaptation de la bactérie, voire une défense de la plante.

II. Quantification moléculaire des souches dans l'eau de lavage : recouvrement et survie des bactéries

Comme évoqué plus haut, il existe une différence de recouvrement entre les premiers et derniers jours de l'expérimentation. Ainsi les PCR quantitatives ont été réalisées sur les différents réplicats aux temps J1 et J11 (temps les plus extrêmes de l'expérimentation). Le gène *uidA* étant mono-copie sur le chromosome de *E. coli*, nous pourrions assimiler le nombre de copies de ce gène au nombre de *E. coli* présentes, qu'elles soient vivantes, en VNC ou mortes (lysées ou non).

La fréquence de recouvrement dans l'eau de lavage est ici obtenue grâce au nombre de copies du gène *uidA* détectées dans l'eau de lavage rapporté au nombre de bactéries déposées (soit environ 10^7 UFC) (Figure 46). Cette fréquence peut être ensuite comparée à la fréquence de survie obtenue, elle, par le rapport entre le nombre de bactéries cultivables présentes dans l'eau de lavage et le nombre total de bactéries décrochées (*i.e.* le nombre de copies du gène *uidA*) (Figure 46).

Ainsi, si toutes les bactéries initialement déposées sur la feuille (en moyenne 10 millions de bactéries, soit 10^7) sont décrochées par l'étape de lavage, la fréquence de recouvrement dans l'eau de lavage sera égale à 1. Etant donné les différentes méthodes de quantification utilisées (moléculaire et culturale), nous considérons avoir une incertitude de 1 unité log sur les deux fréquences (recouvrement et survie). Cela signifie, par exemple, que les fréquences comprises entre 1 et 0,1 sont semblables. Notre limite de détection, elle, se trouve en moyenne entre 10^{-3} et 10^{-4} pour les deux fréquences.

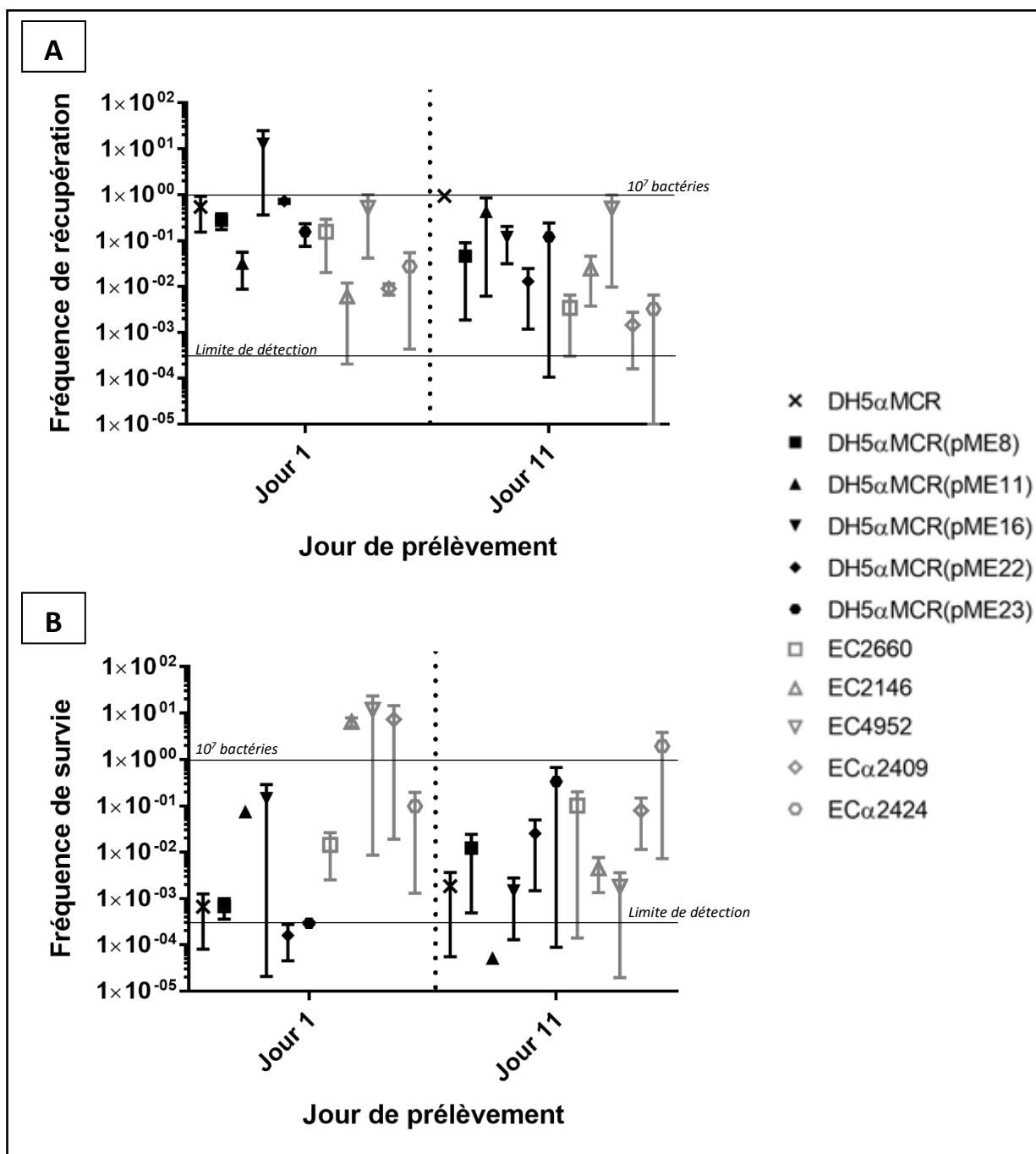


Figure 47 : Fréquence de recouvrement et de survie des souches transformées et environnementales au J1 et J11 de prélèvement pour la Laitue Romaine dans l'eau de lavage.

En noir se trouvent les souches DH5αMCR transformées avec le plasmide de résistance et en gris les souches environnementales correspondantes. En A est présentée la fréquence de recouvrement des bactéries dans l'eau de lavage obtenue par le rapport entre le nombre total de copies du gène uidA (codant la β-D-glucuronidase) dans l'eau de lavage et le nombre total de bactéries déposées (en UFC). En B est présentée la fréquence de survie des bactéries décrochées dans l'eau de lavage obtenue par le rapport du nombre total de bactéries cultivables (en UFC) sur le nombre de copies du gène uidA présentes dans l'eau de lavage.

1. Laitue Romaine : décrochage et survie des bactéries

Lorsque nous regardons la fréquence de recouvrement (Figure 47A) pour les souches de laboratoires transformées à J1, nous pouvons voir qu'elle est très proche de 1, sauf pour la souche portant le plasmide pME11, dont la fréquence est sous la barre des 0,1. Nous observons donc un décrochage conséquent des bactéries (de l'ordre de 10^7 copies *uidA*) et cela signifie que leur capacité d'adhésion aux feuilles de laitues est faible au bout de 24h. Cependant, si l'on considère leur fréquence de survie (Figure 47B), on constate qu'elle est très proche de notre limite de détection, sauf pour DH5 α MCR(pME11), et cela indique que la grande majorité des bactéries récupérées dans l'eau de lavage sont mortes ou en mauvais état métabolique. A l'inverse, la souche DH5 α MCR(pME11), qui est moins facilement décrochée, présente une fréquence de survie proche de 10^{-1} . Elle semble donc être en meilleur état métabolique et posséder une meilleure capacité d'adhésion sur feuille à 24h par rapport aux autres souches de laboratoire. Ceci est en concordance avec les résultats d'adhésion sur surface inerte où DH5 α MCR(pME11) apparaissait plus solidement adhérees que les autres souches.

Si, maintenant, on s'intéresse aux souches environnementales à J1, on voit que, par rapport aux souches DH5 α MCR transformées, la fréquence de recouvrement (Figure 47A) est plus faible (inférieure à 10^{-1}), sauf pour deux d'entre elles, EC2660 et EC4952, qui ont une fréquence proche de 1. La fréquence de survie (Figure 47B) nous montre que les souches sont majoritairement en vie, sauf EC2660 qui semble avoir plus de difficultés. Ainsi, dès J1, les souches environnementales sont plus difficiles à décrocher que les souches de laboratoire et semblent donc interagir plus fortement avec la surface des feuilles tout en restant en bon état métabolique.

Au J11, nous pouvons remarquer que, pour les souches transformées, la fréquence de recouvrement (Figure 47A) diminue un peu, mais la fréquence de survie (Figure 47B) reste globalement faible, même pour DH5 α MCR(pME11). Ainsi, une grande majorité des souches récupérées dans l'eau de lavage sont mortes ou en VNC, ce qui concorde avec le fait que dès J1, les souches de laboratoire sont dans un mauvais état métabolique.

Concernant les souches environnementales, la fréquence de recouvrement (Figure 47A) chute pour EC2660, déjà largement sous 10^{-1} à J1, mais reste élevée pour EC4952. Les fréquences de survie de EC2146 et Ec4952 (Figure 47B) chutent et sont très proches de notre limite de

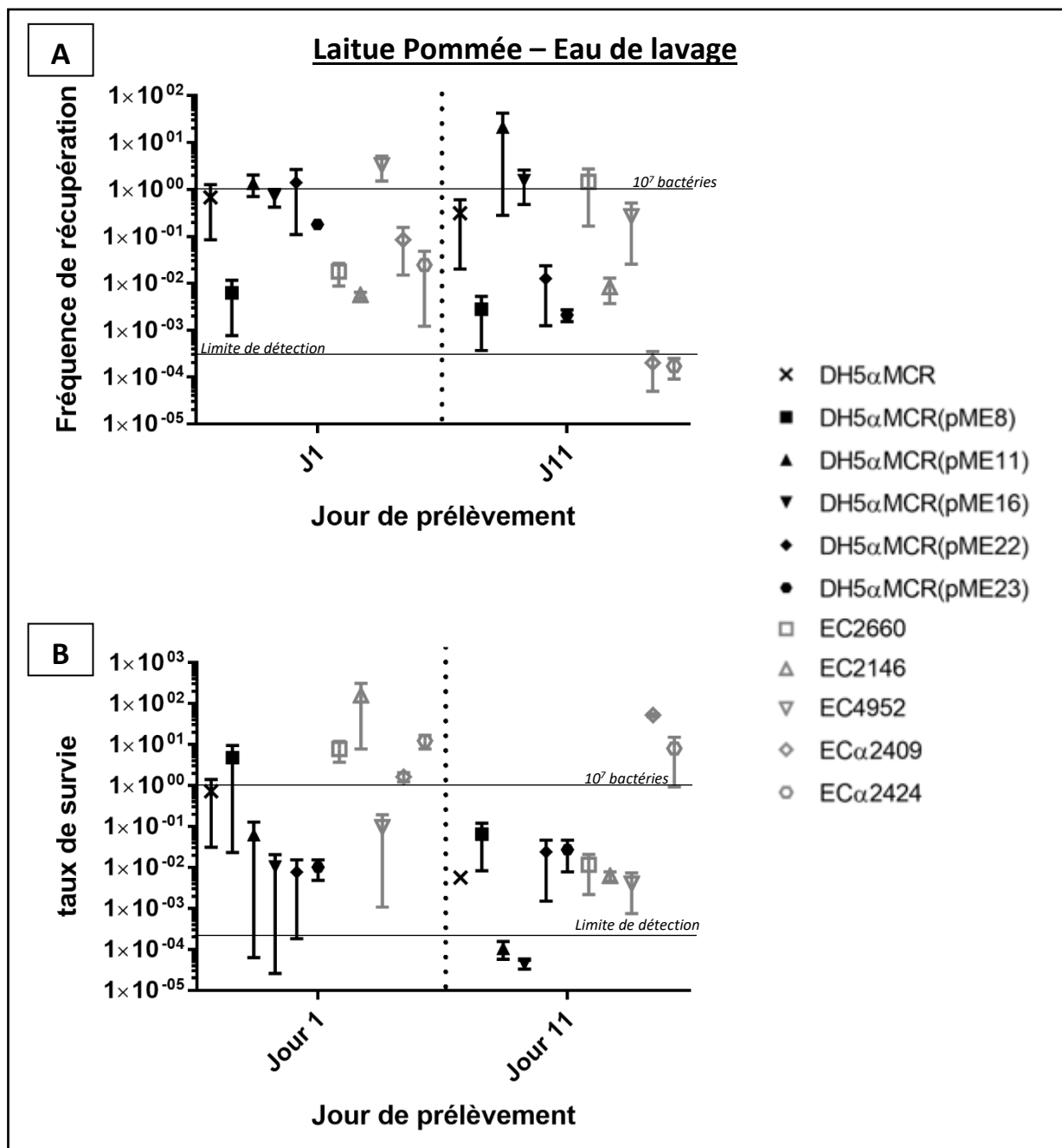


Figure 48 : Fréquence de recouvrement et de survie des souches transformées et environnementales au J1 et J11 de prélèvement pour la Laitue Pommée dans l'eau de lavage.

En noir se trouvent les souches DH5αMCR transformées avec le plasmide de résistance et en gris les souches environnementales correspondantes. En A est présentée la fréquence de recouvrement des bactéries dans l'eau de lavage obtenue par le rapport entre le nombre total de copies du gène uidA (codant la β-D-glucuronidase) dans l'eau de lavage et le nombre total de bactéries déposées (en UFC). En B est présentée la fréquence de survie des bactéries décrochées dans l'eau de lavage obtenue par le rapport du nombre total de bactéries cultivables (en UFC) sur le nombre de copies du gène uidA présentes dans l'eau de lavage

détection ce qui montre qu'elles sont mortes ou en VNC au bout de 11 jours de contact avec la feuille de laitue. Par contre, pour les trois autres souches (EC2660, EC α 2409 et EC α 2424), la fréquence de survie est proche ou égale à 1, elles sont donc toujours vivantes. Cela signifierait que ces trois souches environnementales sont probablement fortement liées à la feuille et toujours en bon état métabolique à 11 jours de contact.

Ainsi, sur la variété Romaine, la conclusion est que les souches environnementales survivent mieux que les souches de laboratoire transformées, et qu'elles semblent se maintenir davantage sur les feuilles. La souche environnementale EC2660, hébergeant naturellement le plasmide pME8, semble même renforcer son interaction avec la surface végétale au cours du temps. Chez les souches transformées, le fait marquant est la perte de cultivabilité extrêmement rapide des bactéries, par entrée en VNC ou mort. La souche DH5 α MCR(pME11), qui avait une forte adhésion sur surface inerte, semble posséder aussi une certaine capacité d'adhésion à la feuille 24h après contamination, bien meilleure que celle de DH5 α MCR sans plasmide. Ceci pourrait suggérer un rôle de pME11 dans l'adhésion sur feuille de laitue Romaine de la souche DH5 α MCR transformée par ce plasmide. Cependant, les conditions environnementales à la surface de la feuille sont trop stressantes pour maintenir la souche en bon état métabolique jusqu'au J11 et nous permettent de confirmer cette hypothèse.

2. Laitue Pommée : décrochage et survie des bactéries

A J1, la fréquence de recouvrement (Figure 48A) pour les souches transformées est proche de 1, sauf pour DH5 α MCR(pME8) qui s'approche de la limite de détection. Ainsi, le plasmide pME8 semble améliorer l'adhésion de la souche porteuse sur la feuille de laitue Pommée, alors que ce n'était pas le cas sur Romaine. Concernant les fréquences de survie (Figure 48B), elles sont assez basses, sauf DH5 α MCR et DH5 α MCR(pME8) qui sont en bon état métabolique. Il est à remarquer que les fréquences de survie sont plutôt meilleures sur cette variété que sur la Romaine, ce qui va dans le sens des résultats observés sur les Heat-Maps.

Pour les souches environnementales (Figure 48A), seule EC4952 semble être récupérée efficacement, toutes les autres sont restées sur la feuille. Le comportement de cette souche, c'est-à-dire sa difficulté à adhérer à la surface de la feuille, est donc comparable sur les deux

variétés à J1. Sa survie semble cependant un peu fragilisée, puisque sa fréquence est légèrement inférieure à 10^{-1} (Figure 48B). Les autres souches, majoritairement sur la feuille, sont en vie.

Pour J11, les souches transformées DH5 α MCR(pME11) et DH5 α MCR(pME16) sont majoritairement récupérées dans l'eau de lavage (Figure 48A), tandis que DH5 α MCR(pME8), DH5 α MCR(pME22) et DH5 α MCR(pME23) n'y sont que très peu retrouvées. La fréquence de survie (Figure 48B) de DH5 α MCR(pME11) et DH5 α MCR(pME16) montre qu'elles sont mortes ou en VNC. Les trois autres souches, peu décrochées, ont une fréquence de survie plus haute, mais tout de même en dessous de 10^{-1} , indiquant qu'elles sont en mauvais état métabolique. Ainsi, de la même façon que précédemment concernant le rôle de pME11 sur l'adhésion de DH5 α MCR(pME11) sur Romaine, pME8 semblerait favoriser l'accrochage de DH5 α MCR(pME8) sur Pommée, mais la fragilisation de la survie au cours du temps nous oblige à rester prudents.

Pour les environnementales, les fréquences de recouvrement (Figure 48A) pour EC α 2409 et EC α 2424 sont très faibles, et celle de EC2146 est relativement basse, notamment en comparaison de EC4952 et EC2660. Cependant, la fréquence de survie de EC2146 nous indique qu'elle semble en mauvais état métabolique. Au contraire, pour EC α 2409 et EC α 2424 les fréquences de survie élevées démontrent que les souches sont toujours en vie.

La meilleure survie des souches environnementales par rapport aux souches de laboratoire transformées se confirme, mais la différence est malgré tout moins nette sur cette variété Pommée. En effet, les souches DH5 α MCR parviennent plus facilement, semble-t-il, à y maintenir un bon métabolisme, notamment à J1. Ainsi que remarqué précédemment, il semblerait donc que l'environnement foliaire de la variété Romaine stresse ou tue davantage les bactéries, ce qui expliquerait la différence de recouvrement des cultivables observées sur les Heat-Maps.

La quantification du gène *uidA* directement sur les feuilles a montré que la majorité des bactéries de l'inoculum, quel que soit leur état métabolique, restaient sur la feuille. Nous avons calculé une fréquence de persistance (nombre de copies du gène *uidA* sur les feuilles de laitues rapporté au nombre de bactéries déposées). Cette fréquence est très proche de 1

pour toutes les souches et cela pour les deux variétés de laitue. Nous venons pourtant de voir, qu'en fonction de la souche bactérienne, il existe de nettes différences dans l'efficacité de décrochage des bactéries par un lavage. Ceci peut s'expliquer par l'importante population déposée (10^7 UFC) sur les feuilles. Ainsi, si sur 1.10^7 UFC, nous récupérons 90% des bactéries à la suite du lavage, soit 9.10^6 UFC, il restera encore 1.10^6 UFC à la surface des feuilles. Ceci montre que si la contamination est importante, même si les interactions bactéries-feuille sont fragiles, une forte densité reste sur la laitue malgré des lavages énergiques.

D. Conclusion intermédiaire

L'ensemble de ces résultats a ainsi permis de mettre en évidence l'influence de 3 facteurs sur l'adhésion de *E. coli* sur les feuilles de laitue :

- le temps de contact
- la variété de laitue
- l'origine de la souche

Concernant le temps de contact, il était possible d'envisager qu'il favoriserait l'installation des bactéries et la formation de biofilms, mais nous constatons que la longueur du séjour sur la feuille s'accompagne principalement d'une chute de la survie (par mort bactérienne ou entrée en état VNC), excepté pour deux souches isolées de l'Environnement : EC α 2409 et EC α 2424. Ces souches présentent en effet une survie importante et une adhésion relativement forte sur les feuilles de laitue, chez les deux variétés. Cette adhésion semble même se renforcer au cours du temps.

L'effet bactéricide (ou de stress intense) dépend de la variété de laitue. En effet, la survie des souches est globalement meilleure sur la Pommée, tout particulièrement pour les souches de laboratoire. Ceci montre que la variété Romaine ne présente pas les mêmes conditions d'accueil que la variété Pommée. Les sécrétions foliaires sont probablement différentes et/ou la réaction de défense de la plante varie en qualité ou en intensité en fonction de la variété (Hunter *et al.* 2010; Erickson *et al.* 2018; Erickson *et al.* 2019).

L'impact de l'origine de la souche, *i.e.* laboratoire (souche DH5 α MCR) vs environnementale, est très marqué. En effet, les DH5 α MCR présentent une survie particulièrement faible sur Romaine et ce, dès le premier jour, excepté DH5 α MCR(pME11) qui se maintient mieux à J1. Sur la Pommée, comme dit précédemment, le stress est un peu moins sévère. Ce mauvais état

métabolique des souches de laboratoire transformées nous a hélas empêchés d'observer clairement l'implication éventuelle de motifs plasmidiques dans l'adhésion des souches aux feuilles, notamment à J11. Néanmoins, on peut remarquer deux souches transformées, DH5 α MCR(pME11) sur la Romaine et DH5 α MCR(pME8) sur la Pommée qui, à J1, seraient en vie et plutôt fortement liées à la feuille, contrairement aux autres souches de laboratoire. Malheureusement, le défaut de survie à J11 ne nous permet pas de conclure fermement sur l'action positive de ces plasmides vis à vis de l'adhésion, qui, de surcroît, serait variété-dépendant.

La meilleure survie des souches environnementales, et tout particulièrement de EC α 2409 et EC α 2424, peut suggérer que le premier passage dans l'environnement de ces bactéries entériques et leur résistance à ce stress a représenté une pré-adaptation pour ces bactéries qui seraient dès lors mieux armées pour s'adapter à des supports environnementaux inhabituels pour elles. Cette hypothèse a de grandes implications sanitaires. Il serait très intéressant de poursuivre et d'approfondir l'étude du comportement de ces deux souches EC α 2409 et EC α 2424 en contact avec des surfaces végétales. Pour rappel, elles portent, pour la première, 3 plasmides de résistance (pME21, pME22 et pME24) et pour la seconde, un plasmide de résistance, pME23. Ainsi, des bactéries entériques antibiorésistantes peuvent établir des interactions fortes avec la surface foliaire et y survivre pendant au moins 11 jours.

Troisième partie

Etat des lieux de la contamination des laitues en champs par des bactéries

A. Contexte et objectifs

Nous avons vu que dans certaines conditions les bactéries entériques pouvaient persister sur les laitues. Ceci expliquerait les TIAC associées à la consommation de légumes à feuilles contaminés par *Salmonella* ou des *E. coli* entérohémorragiques (Edelstein *et al.* 2014; Newitt *et al.* 2016). Ce phénomène, d'enjeu sanitaire public, cache un autre danger émergent, celui de la dissémination des résistances aux antibiotiques. En effet, les bactéries entériques sont très souvent porteuses de résistances aux antibiotiques, généralement portées par les plasmides. Si des bactéries antibiorésistantes persistent sur les laitues et se retrouvent dans notre assiette, cela contribuerait à l'augmentation des phénomènes de résistance chez l'Homme, provoquant de sévères complications médicales, notamment chez les individus immunodéprimés (Zhu *et al.* 2017; Araújo *et al.* 2017; O'Flaherty *et al.* 2019).

La contamination des laitues peut se faire par différentes voies comme l'épandage de matières organiques dans les champs pour servir d'engrais, ou encore au travers de phénomènes de ruissellement sur des pâturages adjacents aux cultures (Nyberg *et al.* 2019). La manipulation humaine ou encore les procédés post-récolte de distribution, conditionnement et/ou de transformation peuvent aussi générer des contaminations (Holvoet *et al.* 2015; Weller *et al.* 2017). Cependant, il semble que la source majoritaire de contamination soit l'eau d'irrigation (Holvoet *et al.* 2013; Généreux *et al.* 2015; O'Flaherty and Cummins 2017; Araújo *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2018b; O'Flaherty *et al.* 2019b). Comme décrit précédemment, l'eau de surface peut être contaminée par des phénomènes de lessivage des sols contaminés lors de fortes précipitations ou par des rejets de STEP ou fosses septiques. Les contaminations fécales de surface peuvent aussi contaminer les eaux souterraines par infiltration dans les sols, notamment des sols calcaires comme cela est le cas dans les zones karstiques (Laroche *et al.* 2010; Flores Ribeiro *et al.* 2012; Laroche-Ajzenberg *et al.* 2014; Sinreich *et al.* 2014).

Notre objectif dans ce volet est d'évaluer la contamination bactériologique de la production issue de quatre exploitations maraîchères normandes, choisies en fonction de leur itinéraire technique. Les bactéries pathogènes *Salmonella* et STEC ont été recherchées, ainsi que le témoin de contamination fécale *E. coli*, chez qui le profil d'antibiorésistance a été déterminé.

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Tableau 4 : Description des sites de prélèvement selon des points critiques de contamination microbiologiques établie lors de comités du programme PATHOGREEN.

Points critiques	Site A	Site B	Site C	Site D
Irrigation	Non	Forage	Eau de forage stockée dans une zone tampon non couverte	Irrigation par bassin de réserve non couvert ou par eau du réseau
Arrosage des colis après récolte	Non	Non	Oui	Oui avec eau du réseau
STEP	À 4 km	À 4 km	À 500m	À 5 km
Amendements	Matières organiques à base de fiente de porc et volaille	Matières organiques en bouchon possible	Matières organiques en granulés à base de fiente	Fumier
Animaux sauvages	Pigeons, mouettes	Pigeons, Lapins	Pigeons, Lapins	Pigeons, Lapins
Récolte	Manuelle + caisses en plastique	Manuelle + caisses en plastique	Manuelle + caisses en plastique	Manuelle + caisses en bois
Stockage	Livraison directe par camion frigorifique	Livraison directe par camion frigorifique	Stockage intermédiaire à 4°C	Stockage intermédiaire à 8°C
Note de Risque	36 / 158	66 / 158	77 / 158	86 / 158



Figure 49 : Bassin de stockage de l'eau d'irrigation sur le site d'exploitation D

B. Paramètres de l'étude

I. Sites de prélèvement

Les quatre sites de prélèvement de laitues en champs ont été choisis à la suite d'enquêtes menées par les Chambres d'Agricultures Départementales et Régionale, partenaires du projet PATHOGREEN, selon des critères de risque définis lors des Comités Techniques et de Pilotage du projet. Pour chaque critère de risque microbiologique, un niveau de danger et un score étaient attribués donnant au final une note des exploitations sur 158, nombre maximal obtenu si tous les critères de risque étaient présents. Un panel d'exploitations présentant divers degrés de risque a pu être constitué, sur la base du volontariat des exploitants. Ainsi, quatre exploitations, produisant des laitues Pommées ont participé à l'étude, dont deux appartiennent au circuit des produits de 4^e gamme (Sites A et B) et deux sont des exploitations de 1^e gamme (Sites C et D). Les produits de 1^e gamme sont définis comme des produits agricoles vendus en l'état (frais), éventuellement lavés et conservés à température ambiante ou réfrigérés. Les produits de 4^e gamme sont, eux, des produits agricoles transformés prêts à l'emploi, comme les salades en sachet. Les sites A, B et C se situent en Basse-Normandie, tandis que le site D est en Haute-Normandie. Les caractéristiques des différents sites, regroupées dans le tableau 4 seront analysées plus loin.

II. Echantillonnages

Les campagnes de prélèvement des laitues en champs ont été réalisées sur 6 mois, entre mai 2017 et octobre 2017, pendant la période de culture des laitues en Normandie. Les échantillonnages ont été réalisés à raison de deux campagnes de prélèvement par mois, soit un total de douze campagnes. Pour chaque campagne, sur chacun des 4 sites, 10 laitues Pommées ont été récupérées après récolte par les exploitants. Ces dix laitues vont permettre de constituer 5 échantillons, à raison de deux laitues par échantillon. Ces 5 échantillons constitueront à leur tour un lot qu'il s'agira de qualifier d'un point de vue sanitaire. Ainsi, tout au long des campagnes de prélèvement, un total de 48 lots sera constitué comprenant 240 échantillons, soit 480 laitues.

Seule la qualité de l'eau d'irrigation du site D a pu être suivie par dénombrement de *E. coli* (Figure 49). Les eaux utilisées pour les sites B et C, localisés en Basse-Normandie, se sont

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Tableau 5 : Extrait de l'annexe 1 de l'arrêté 2073/2005 présentant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. * : Chapitre 1 : critères de sécurité des denrées alimentaires ; † : Chapitre 2 : Critères d'hygiène des procédés.

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage		Limites		Méthodes d'analyses de référence	Stade d'application du critère	Actions en cas de résultats insatisfaisant
		n	c	m	M			
Fruits et légumes prédécoupés (prêts à être consommés)*	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25g		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation	
Fruits et légumes prédécoupés (prêts à être consommés)†	<i>E. coli</i>	5	2	100 UFC/g	1000 UFC/g	ISO 16649-1 ou 2	Procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production et de la sélection des matières premières

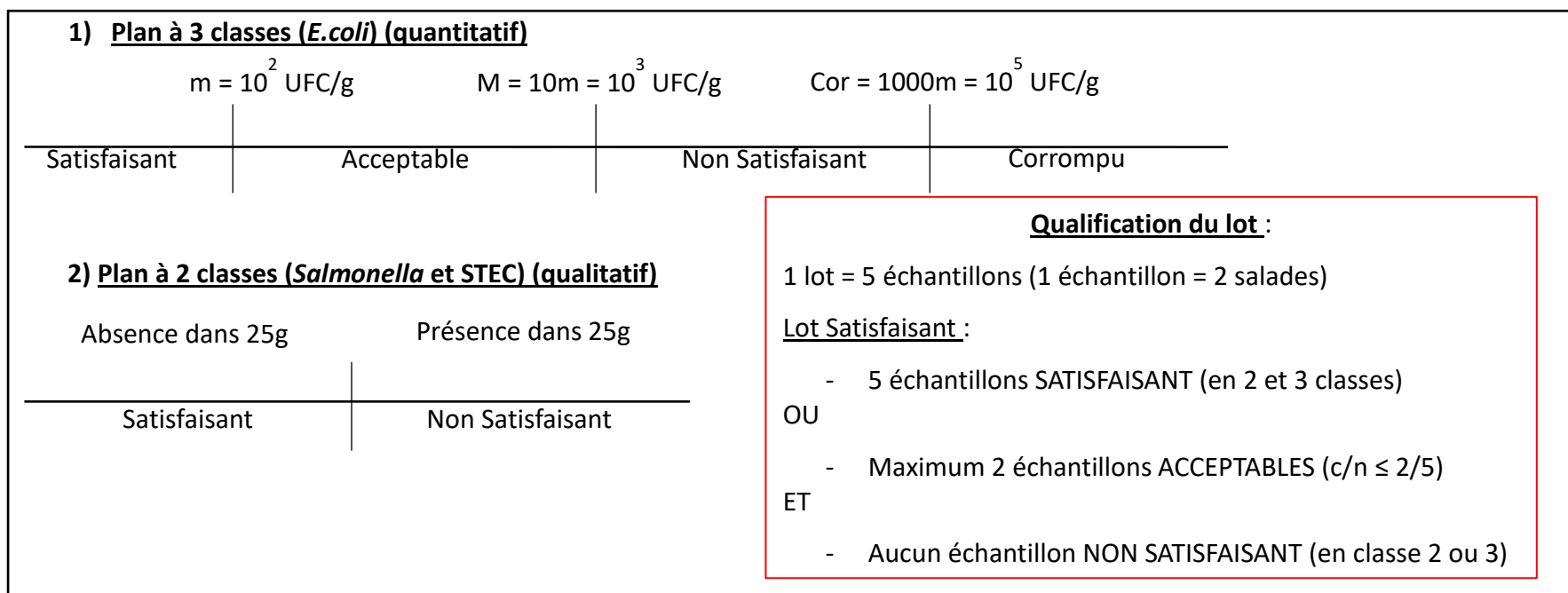


Figure 50 Schéma présentant les plans d'échantillonnage à 2 classes et 3 classes applicables à chaque échantillon, ainsi que la qualification du lot selon les résultats obtenus. m : seuil pour avoir une qualité d'échantillon satisfaisante, M : Limite de densité pour avoir un échantillon acceptable, Cor : limite au-delà de laquelle l'échantillon passe en corrompu. c/n : nombre d'échantillons acceptables (c) / nombre d'échantillons composant le lot (n)

révélées plus difficiles à échantillonner régulièrement (problème de logistique) et le site A, proche de la mer, n'est pas irrigué.

III. Critères microbiologiques appliqués

L'arrêté européen N°2073/2005 du 15 Novembre 2005 (Journal Officiel de l'Union européenne 2005), modifié par l'arrêté N°1441/2007 (Journal Officiel de l'Union européenne 2007), définit les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Tableau 5). Les procédures de recherche des micro-organismes appliquées en Microbiologie des aliments, plans à 2 ou 3 classes (définis plus loin), ont initialement été définies par l'ICMSF⁴². Dans ces plans, on définit :

- « **n** » : nombre d'échantillons formant le lot
- « **m** » : seuil chiffré au-delà duquel l'échantillon n'est plus satisfaisant
- « **M** » : seuil Maximum ou limite d'acceptabilité au-delà duquel l'échantillon n'est plus acceptable. Uniquement présent dans les plans à 3 classes, $M=10m$ pour un dénombrement en solide.
- « **c** » : nombre maximal d'échantillons de qualité acceptable pour un plan à trois classes (nombre maximal de valeurs comprises en m et M) Si le nombre d'échantillons de qualité acceptable est supérieur à c , le lot d'où provient l'échantillon est Non satisfaisant.

Selon les denrées alimentaires analysées et les micro-organismes recherchés, ces chiffres ne seront pas les mêmes. L'annexe 1 de l'arrêté européen N°2073/2005 présente, sous forme de tableau, les critères microbiologiques à respecter, *a minima*, pour chaque catégorie d'aliments (Tableau 5).

Le plan d'échantillonnage à deux classes permet de qualifier chaque échantillon comme satisfaisant ou non satisfaisant, selon la présence ou l'absence d'un micro-organisme pathogène invasif dans une prise d'essai définie (Figure 50).

Dans un plan à trois classes, les échantillons sont qualifiés de satisfaisants ($N \leq m$), acceptables ($m < N \leq M$), non satisfaisants ($M < N \leq Cor$), voire corrompus ($N > Cor$), N étant

⁴² ICMSF : International Commission on Microbiological Specifications for Foods

la densité (UFC/g) de la flore recherchée dans l'aliment (Figure 50). Le plan à 3 classes est appliqué pour rechercher des flores non pathogènes ou pathogènes non invasives.

Salmonella et les souches EHEC⁴³ étant des bactéries pathogènes invasives, il est recommandé, selon l'arrêté européen N°2073/2005, de les rechercher selon un plan à deux classes, ici dans 25g d'échantillon (Figure 50). Pour rappel, notre lot est constitué de « n » = 5 échantillons.

Les souches EHEC, capables de provoquer les syndromes clinique GEA⁴⁴, voire SHU⁴⁵, ne peuvent pas être recherchées par des méthodes de routine moléculaires ou culturales, car ces méthodes ne testent pas le caractère effectivement pathogène de la souche chez l'homme. Ainsi, les normes imposent la recherche plus large des souches STEC⁴⁶, qui portent les gènes *stx* codant les Shiga-like toxines. Il faut cependant préciser que si toutes les souches EHEC sont bien des STEC, les souches STEC ne sont pas toutes EHEC, ce qui signifie que certaines souches portant les gènes *stx* ne sont, en fait, pas entérohémorragiques chez l'homme. Le critère microbiologique de l'arrêté N°2073/2005 visant les STEC peut donc conduire à une surestimation du danger, mais ceci est assez souvent le cas dans les contrôles agro-alimentaires en raison de l'application du principe de précaution (il existe par exemple un gradient de dangerosité chez les sérotypes de *Salmonella enterica* sbsp *enterica*).

Dans le cadre du plan à deux classes, et après une étape essentielle d'enrichissement (voir « Matériels et méthodes »), les bactéries STEC ont donc été recherchées par PCR, ciblant les gènes *stx* et *eae*⁴⁷. *Salmonella* a été recherchée par PCR (gène *iagA*) et sur milieu de culture sélectif.

E. coli non pathogène étant un témoin d'hygiène, sa recherche suit un plan à trois classes. Ainsi, la comparaison de la densité en *E. coli* déterminée dans l'échantillon (UFC/g) avec le seuil « m » permet de qualifier la qualité de l'échantillon (Figure 49). Dans notre cas, il n'existe pas de critères microbiologiques officiels pour la production primaire de salades (à la sortie du champ), mais des seuils sont donnés pour les produits de 4^e gamme (Tableau 5). Nous avons donc choisi de qualifier les échantillons pour *E. coli* en fonction du critère donné pour

⁴³ EHEC : EnteroHaemorrhagic *E. coli*

⁴⁴ GEA : Gastro Entérite Aigüe

⁴⁵ SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

⁴⁶ STEC : Shiga-like Toxin producing *E. coli*

⁴⁷ Gène *eae* : *E. coli* attaching and effacing

cette catégorie d'aliment ($m = 100 \text{ UFC/g}$), tout en étant conscient que l'exigence pour la 4^e gamme est supérieure à celle demandée pour la 1^e gamme.

Dans le cadre du plan à trois classes, *E. coli* a été directement dénombrée par méthode culturale, sur milieu sélectif, et sa densité dans l'échantillon déterminée (UFC/g de laitue).

C. Résultats

I. Résultats des enquêtes de vulnérabilité

Le Tableau 4 nous permet de constater que les exploitations A et B, qui sont utilisées pour la production de produits de 4^e gamme, sont celles possédant le score de risque le moins élevé (36 et 68 / 158 respectivement). Ceci n'est pas surprenant du fait des cahiers des charges très stricts imposés par les filières agro-alimentaires (Certification Global Gap et LEAF⁴⁸ imposées aux deux sites). La livraison directe en camion frigorifique permet de réduire le temps post-récolte et la basse température empêche ou ralentit un développement bactérien potentiel. La différence de score entre les deux sites vient de l'absence d'irrigation du site A. En effet, ce site se trouve au bord de la mer, sur des Polders, qui sont des marais littoraux endigués et asséchés. La présence de réseaux de canaux ainsi que de limons souples et profonds au niveau des cultures maraîchères maintiennent un taux d'humidité suffisamment haut pour ne pas avoir besoin d'irriguer les cultures.

Le site C, produisant des produits dits de 1^e gamme est plus à risque par rapport aux deux premiers. L'irrigation est réalisée à partir d'eau de forage stockée dans une zone tampon non couverte (type mare) ce qui peut augmenter les risques de contaminations microbiologiques. L'arrosage des colis après récolte peut avoir deux effets contraire : (1) enlever la terre encore accrochée aux végétaux et diminuer la charge bactérienne faiblement liée à la matrice, mais (2) contaminer les colis inférieurs, si tous les colis sont empilés les uns sur les autres au moment du rinçage.

Enfin le site D, de 1^e gamme aussi, regroupe le plus de points critiques de contamination selon les critères établis (Tableau 4). En effet, l'eau d'irrigation provient d'un bassin de stockage à ciel ouvert (Figure 49) alimenté par l'eau de pluie et les eaux de ruissellement canalisées par des fossés et autres rigoles depuis les champs avoisinants, et qui

⁴⁸ LEAF : Linking Environment And Farming

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Tableau 6 : Détection des pathogènes STEC et Salmonella dans les laitues des 4 quatre exploitations lors des différentes campagnes de prélèvements. Les résultats sont présentés sous la forme a/b où a correspond au nombre d'échantillons positifs aux pathogènes et b le nombre total d'échantillons constituant le lot analysé.

		Site A		Site B		Site C		Site D	
		STEC	<i>Salmonella</i>	STEC	<i>Salmonella</i>	STEC	<i>Salmonella</i>	STEC	<i>Salmonella</i>
Campagne 1	09/05/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 2	15/05/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 3	29/05/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 4	12/06/2017	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 5	03/07/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 6	17/07/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 7	21/08/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 8	04/09/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 9	11/09/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 10	25/09/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 11	09/10/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Campagne 12	23/10/2017	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

sont des sources potentielles majeures de micro-organismes. De plus, la présence d'animaux, tels les canards et les grenouilles ne fait qu'augmenter le risque microbiologique. Il faut ajouter à cela la présence d'un circuit enterré d'eaux usées à proximité qui peut entraîner des contaminations du sol si des tuyaux viennent à céder ou en cas de simples fuites. Un autre point critique est l'utilisation de caisses en bois, et non en plastiques plus facile à nettoyer, qui peut aussi favoriser les contaminations croisées entre ancienne et nouvelle récolte. Enfin, un stockage intermédiaire, bien qu'à 8°C pendant 24h maximum, augmente le risque de développement microbien.

Sur toutes les exploitations interrogées, aucune n'a obtenu le score de risque maximal, le site D faisant partie des plus hauts score obtenus et étant donc le plus vulnérable de notre étude. Ceci montre que les exploitants agricoles sont déjà très sensibilisés aux bonnes pratiques d'hygiène et très volontaires pour mieux comprendre et maîtriser les éventuels points critiques de leur itinéraire, au moins pour ceux qui ont accepté de participer à notre étude et que nous remercions ici.

II. Plan à deux classes : Recherche de bactéries entériques pathogènes sur les laitues

La présence des pathogènes STEC et *Salmonella* a été recherchée sur la laitue par PCR en temps réel à l'aide des kits IQ-Check *Salmonella* II et STEC-VirX de chez Bio-Rad (Tableau 6).

Concernant les STEC, sur les 48 lots analysés (comprenant 5 échantillons chacun), aucune présence n'a été détectée dans 25g d'échantillon (absence dans 25g pour chaque échantillon ainsi qualifié de satisfaisant). Ceci est plutôt rassurant, car la DMI des STEC est faible (< 100 UFC) (Strachan *et al.* 2001; Teunis *et al.* 2004).

Pour *Salmonella*, 47 lots se sont montrés négatifs, donc satisfaisants, mais elle a été détectée dans 25g d'un échantillon (campagne 4 du 12/06/17 sur le site A). Un seul échantillon sur les 5 du lot était positif, rendant cependant le lot entier non satisfaisant. Ceci pourrait indiquer une contamination plutôt ponctuelle et localisée. De plus, la laitue provenait du site A qui est celui présentant le moins de risque, les cultures n'étant ni irriguées, ni arrosées après récolte. Ne venant pas de l'eau, il est alors possible que la *Salmonella* provienne d'un animal ou peut être d'un opérateur d'exploitation. Nous avons isolé la bactérie à partir du bouillon d'enrichissement sur milieu spécifique Rapid'*Salmonella* et sur différents milieux spécifiques,

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Tableau 7 : Densité N de E. coli en UFC/g dans les différents échantillons de laitues collectées lors des campagnes de prélèvements sur les quatre exploitations maraichères. La limite de détection est 10_UFC/g. En gras et grisé se trouvent les échantillons pour lesquels N ≥ 10 UFC/g. Le lot non satisfaisant, dont l'un des échantillons contenait Salmonella dans la prise d'essai de 25g est encadré (campagne 4, site A).

		Densité N en E. coli (UFC/g)																			
		Site A					Site B					Site C					Site D				
		Echantillons					Echantillons					Echantillons					Echantillons				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Campagne 1	09/05/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Campagne 2	15/05/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Campagne 3	29/05/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	355	< 10
Campagne 4	12/06/2017	< 10	< 10	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	< 10	< 10	15	< 10	< 10	10	30	< 10
Campagne 5	03/07/2017	< 10	< 10	< 10	30	10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	15	< 10	< 10
Campagne 6	17/07/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	360	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Campagne 7	21/08/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	< 10	< 10	15	< 10	< 10	20	< 10	< 10	10
Campagne 8	04/09/2017	< 10	< 10	10	< 10	< 10	610	< 10	20	< 10	10	< 10	350	< 10	20	65	10	< 10	< 10	< 10	< 10
Campagne 9	11/09/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	35	10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Campagne 10	25/09/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	15	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Campagne 11	09/10/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Campagne 12	23/10/2017	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	35	< 10	< 10	< 10	< 10

mais la souche a montré des difficultés de croissance et a rapidement été perdue. Les conditions de laboratoire classiquement utilisées pour *Salmonella* (notamment la température et la sélectivité des milieux), n'étaient peut-être plus adéquates pour cette bactérie isolée dans l'environnement. Cette perte de cultivabilité de certaines souches entériques issues de l'environnement (notamment *E. coli*) au cours des isolements nécessaires à leur purification avant stockage a déjà été constatée au laboratoire. Néanmoins, la présence de *Salmonella* était avérée sur le premier milieu d'isolement utilisé et a été confirmée plusieurs fois en PCR dans le bouillon d'enrichissement. Il sera intéressant de regarder la densité de *E. coli* dans cet échantillon pour voir s'il y a un apport de matières fécales expliquant cette présence.

III. Plan à trois classes : Dénombrement de *E. coli* sur les laitues

La numération de *E. coli* dans les laitues a été réalisée sur milieu chromogène spécifique (Rapid'*E.coli*) (Tableau 7).

Sur les 240 échantillons de nos 48 lots, seuls 28 (soient 11.67%) présentaient une densité de *E. coli* supérieure à notre limite de détection qui était de 10 UFC/g (Tableau 7). Parmi ces 28 échantillons, 24 avaient une densité comprise entre 10 et 100 UFC/g et restent donc satisfaisants, puisque « m » = 100 UFC/g (Figure 49). Les 4 autres échantillons, appartenant à des lots différents, présentaient une densité supérieure à 100 UFC/g, quoique restant inférieure à « M » (Tableau 5) et se sont donc vus attribués le qualificatif acceptable (Figure 49).

Pour le site A, globalement, très peu de *E. coli* ont été retrouvées. Seuls 4 échantillons sur 60 (6.67% des échantillons, répartis sur 3 campagnes) sont compris entre 10 et 100 UFC/g. Si l'on regarde de plus près la campagne C4 (12/06/2017), où l'on avait présence de *Salmonella*, il est possible de constater que l'échantillon 4 du lot a une densité en *E. coli* plus élevée que les autres, mais elle n'est que de 10 UFC/g, soit une colonie sur la boîte de numération. On ne peut donc pas parler de contamination fécale franche de ce lot qui aurait pu expliquer la présence suspecte de *Salmonella*, mais cela renforce l'idée d'une contamination ponctuelle et qui était possiblement ancienne, étant donné les difficultés de croissance de la souche pathogène. En dehors du lot récolté le 12 juin 2017, tous les lots analysés pendant 6 mois sur cette exploitation ont été déclarés satisfaisants.

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Pour le site B, cinq échantillons sur 60 (8,3% des échantillons, répartis sur 3 campagnes) ont montré une densité supérieure à la limite de détection dont deux de qualité seulement acceptable ($10^2 < N \leq 10^3$), aux campagnes C6 et C8. Pour la campagne C6 (17/07/2017), un seul des cinq échantillons ressortait contaminé, les autres étant inférieur à 10 UFC/g ce qui montre une contamination très localisée. Pour la campagne C8 (04/09/2017), par contre, 3/5 échantillons présentaient des *E. coli* dont 1 avec une densité de 610 UFC/g. Entre autres explications, il est possible qu'il y ait eu un évènement de contamination ayant touché un échantillon en particulier et éclaboussé les autres. Cela pourrait également provenir d'une contamination à un endroit du champ qui s'est propagée par ruissellement lors de précipitations ou encore avec le lavage des colis évoqué précédemment. Si l'on regarde les données météorologiques du site (données fournies par les chambres d'agriculture), on voit qu'il y a effectivement eu des évènements pluvieux le 30 août (5,8mm de pluie) et le 03 septembre, la veille du prélèvement, avec 6 mm tombés dans le secteur (soit 6 L/m²). Ce que l'on peut dire avec certitude, c'est que le site B est plus sujet à la contamination microbiologique par *E. coli* que le site A, comme il était attendu après les résultats d'enquête. Malgré tout, cette circulation de *E. coli* reste faible, puisque tous les lots de ce site ont pu être déclarés satisfaisants, même le lot récolté lors de la campagne C8, puisqu'un seul des échantillons n'était que de qualité acceptable, les 4 autres étant satisfaisants.

Au niveau de l'exploitation C, 11 échantillons sur 60 (18,3% des échantillons, répartis sur 6 campagnes) montraient une densité supérieure ou égale à 10 UFC/g dont un à 350 UFC/g (échantillon acceptable, donc). Ce dernier provient de la campagne 8 et est accompagné de deux autres échantillons faiblement contaminés (20 et 65 UFC/g). Comme pour le site B, il y a très certainement eu une contamination localisée. Les données météorologiques nous indiquent des phénomènes de précipitations peu avant la récolte avec 9,3 mm le 29 août, puis 6,4 mm le 30 août et 3,3 mm le 02 septembre. Ces précipitations, par cumul, ont pu favoriser des phénomènes de ruissellement. Sur cette exploitation, on peut constater une circulation faible, mais récurrente, de *E. coli*. Cela n'a cependant pas de conséquence sur la qualité globale de la production selon les normes en vigueur, puisque tous les lots ont pu être déclarés satisfaisants.

Enfin, sur le site D, 8 échantillons sur 60 (13,3% des échantillons, répartis sur 6 campagnes) ont une densité supérieure ou égale à 10 UFC/g, dont l'un à 355 UFC/g. Cet

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

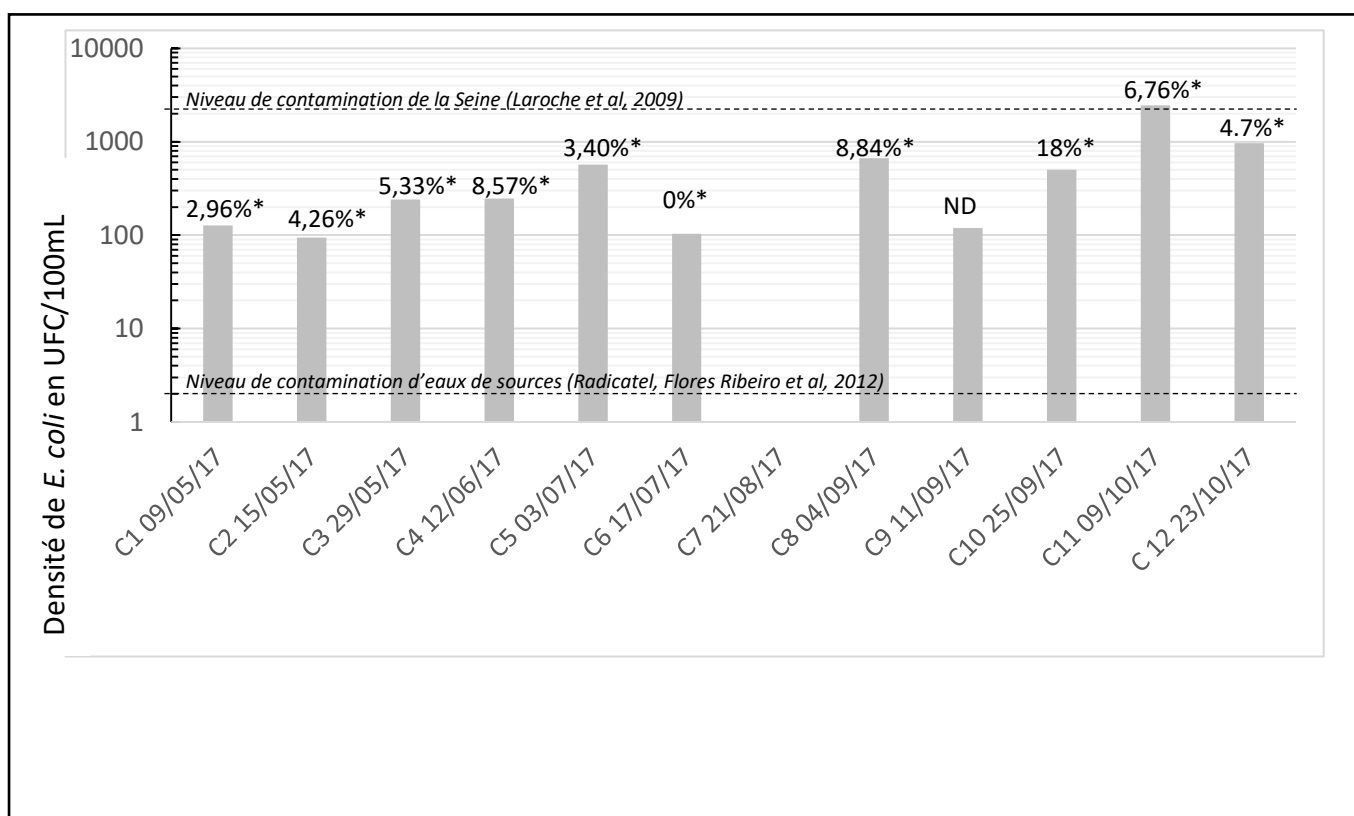


Figure 51 : Densité bactérienne de E. coli (en UFC/100mL) dans l'eau d'irrigation de l'exploitation D au cours des campagnes d'échantillonnage. Les seuils de contamination de sites peu pollués (eaux de source) et pollués (Seine) sont indiqués à titre de comparaison. En haut de chaque histogramme, avec un astérisque sont indiqués les pourcentages de souches résistantes et multirésistantes aux antibiotiques parmi les isolats analysés.

ND : la campagne C9 ne présente pas de pourcentage suite à la présence de flore envahissante empêchant d'isoler les E. coli

échantillon, qui provient de la campagne C3 (29/05/2017), est le seul de son lot à présenter une densité supérieure à notre limite de détection. Il est intéressant de noter que le site D présente globalement moins d'échantillons contaminés que le site C, contrairement à ce qui était attendu avec l'enquête, puisque l'eau utilisée pour une partie de l'arrosage est une réserve à ciel ouvert, en contrebas de champs et d'habitations. Comme pour le site C, malgré cette circulation de *E. coli* faible, mais relativement fréquente, tous les lots du site D sont déclarés de qualité satisfaisante.

Ainsi, les 48 lots de laitues prélevées sur les 4 exploitations de l'étude pendant les six mois de production en 2017 ont pu être déclarés de qualité satisfaisante concernant le classique témoin d'hygiène *E. coli*. Ainsi, aucune contamination fécale d'ampleur n'a été mise en évidence. Il existe cependant des voies d'apports de cette bactérie au niveau des cultures, limitées, intermittentes, mais réelles.

Avec notre prise d'essais, qui était de 10 laitues par campagne de prélèvement et par exploitation, nous n'avons que 1% de la production journalière. En effet, en moyenne, une culture de laitues comprend entre 6 et 10 pieds de laitue / m², soit 6000 à 10000 laitues / hectares. Le rendement de récolte manuelle moyen est de 150 salades/heure, soit 1050 salades sur une journée de 7h de travail pour un ouvrier (Agrobio-Bretagne 2009; Chambre d'Agriculture Languedoc-Roussillon 2012; APABA Bio-Aveyron 2017). Nous pouvions donc détecter des contaminations généralisées à tout le champ (ce qui ne s'est pas produit) ou des événements ponctuels touchant les échantillons analysés. D'autres événements ponctuels touchant d'autres zones non échantillonnées sont cependant certainement passés inaperçus.

IV. Dénombrement de *E. coli* dans l'eau d'irrigation du site D

En parallèle des recherches des pathogènes, *Salmonella* et STEC, via un plan à deux classes, et du dénombrement de *E. coli* sur les laitues de chaque exploitation, des prélèvements d'eau d'irrigation ont été effectués pour savoir si elle pouvait être l'une des voies de contamination des laitues.

Comme dit précédemment, seule l'eau d'irrigation du site D a pu être analysée aux mêmes dates que les prélèvements de laitues.

Les résultats, présentés dans la Figure 51, montrent une présence continue de *E. coli* avec une densité régulière aux alentours de 100 *E. coli*/100mL. Pour les campagnes C5, C8,

C10, C11 et C12, une densité nettement supérieure a pu être observée, laissant supposer un apport de *E. coli* supplémentaires. Si l'on compare avec des travaux précédemment réalisés au laboratoire (Flores Ribeiro *et al.* 2012), des sources d'eaux souterraines (karst de Radicatel), non polluées en période sèche, présentent une densité de 2 *E. coli* /100mL. Toujours selon ces travaux, des niveaux de densités de 10^2 à 10^3 *E. coli*/100mL peuvent être atteints dans ces sources, en période pluvieuse, lorsque les eaux de surface contaminées s'engouffrent dans l'hydrosystème karstique et viennent contaminer les sources situées en bas de falaise. D'autres travaux (Laroche *et al.* 2009), toujours au laboratoire, ont montré que la densité de *E. coli* dans la Seine variait, en moyenne, de $1,2 \cdot 10^2$ à $1,5 \cdot 10^3$ UFC/100mL en fonction du site de prélèvement. Comme évoqué précédemment, ce fleuve, réceptacle des effluents de plusieurs STEP importantes, est considéré comme étant pollué, interdit à la baignade et à la consommation, comme beaucoup d'autres effluents ou rivières recueillant des rejets de STEP. Ainsi, la densité en *E. coli* mesurée dans le point d'eau du site D est importante et montre même certaines augmentations qui peuvent témoigner d'apports supplémentaires ponctuels de contamination, comme dans le cas des deux campagnes d'octobre 2017 (C11 et C12, avec, respectivement, $2,45 \cdot 10^3$ *E. coli*/100mL et $9,65 \cdot 10^2$ *E. coli*/100mL). Ces résultats justifient de considérer cette réserve d'eau comme un point critique dans l'itinéraire technique de l'exploitation. D'ailleurs, des recommandations parues en 2017 au journal officiel de l'Union Européenne (N° 2017/C 163/01) préconisent de ne pas utiliser d'eau comportant plus de 100 *E. coli*/100mL pour l'irrigation des légumes à feuilles.

Il faut cependant rappeler que, malgré la contamination constante présente dans l'eau d'irrigation du site D, les laitues ne portent pas ou peu de *E. coli* (beaucoup d'échantillons comportaient moins de 10 UFC/g). Néanmoins, la relation entre l'eau d'irrigation et les laitues échantillonnées doit faire l'objet de quelques réserves. En effet, bien que sur le site D, les laitues soient *a priori* régulièrement arrosées, parfois même juste avant la récolte, nous ne sommes pas absolument certains que tous nos échantillons aient bien été toujours arrosés avec l'eau issue de ce bassin (l'eau du réseau est en effet parfois utilisée par le cultivateur), ni à quelle fréquence exacte. Des fiches de suivi avaient été mises en place, mais étaient parfois partiellement complétées. Ce biais sera pris en compte dans notre analyse.

V. Antibiorésistance au sein des exploitations maraîchères

Connaitre l'origine des souches circulantes de *E. coli* permettrait de mieux comprendre la dynamique de contamination des laitues et du point d'eau, et nous renseignerait sur les dangers sanitaires associés. Comme expliqué dans la première partie de ce travail, l'étude du niveau d'antibiorésistance d'un panel de souches d'*E. coli* (20 à 50 isolats), collectées au cours de la même campagne et à partir du même site, peut permettre d'émettre des hypothèses sur la provenance des souches (Laroche *et al.* 2010). Ainsi, il peut être possible de discriminer entre des souches naturellement circulantes (toutes sensibles) ou issues d'une contamination fécale d'origine humaine (présence de souches multirésistantes) ou issues d'une contamination fécale d'origine animale (bovine) (présence de souches résistantes à un ou deux antibiotiques, mais en l'absence de multirésistantes). La densité en *E. coli* dans la matrice étudiée et la taille du panel représentatif sont des facteurs importants dans l'interprétation. Ainsi, l'étude de l'antibiorésistance portée par les souches de *E. coli* 1) nous renseignera sur la présence ou non de ce danger émergent sur les laitues et 2) nous permettra de formuler des hypothèses quant à l'origine des isolats.

1. Sur les laitues

Les *E. coli* présentes sur les laitues des différentes exploitations agricoles ont été isolées et stockées à -80°C, puis des antibiogrammes ont été réalisés à partir d'un panel de 16 antibiotiques (Tableau 8). Ces antibiotiques ont été choisis car ils sont largement utilisés dans la lutte contre les bacilles à Gram négatif, en accord avec les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Comité de l'antibiogramme de la SFM 2018).

En parallèle des numérations de *E. coli* sur Rapid'*E.coli*, nous avons effectué des isolements à partir du sac d'échantillon de *Salmonella* après 24h d'enrichissement. Cela nous permettait, lorsqu'en numération nous étions sous le seuil de détection (<10 UFC/g), de savoir s'il y avait tout de même présence de *E. coli* dans l'échantillon, bien que la méthode ne soit pas quantitative. Ainsi, pour certaines campagnes de prélèvement, par exemple C9, C10 et C11 du site A, même si en numération nous étions < 10 UFC/g, nous avons pu isoler des souches supplémentaires pour analyser leur profil d'antibiorésistance. Lorsque les *E. coli* ont

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Tableau 8 : Répartition de l'antibiorésistance présente chez les *E. coli* isolées des laitues en fonction des sites d'exploitation. Les souches dites résistantes portent une ou deux résistances aux antibiotiques, tandis que les multirésistantes portent au moins 3 résistances. Les isolats signalés par (*) correspondent à des bactéries récupérées après une étape d'enrichissement, la numération étant sous le seuil de détection (<10UFC/g). Les 0+ correspondent à la perte des isolats qui n'ont pas pu être isolés correctement pour réaliser les antibiogrammes (il y a bien des souches de *E. coli* mais nous n'avons pas pu les séparer des coliformes totaux).

	Campagne	Nombre d'isolats	Sensibles n (%)	Résistantes (1 ou 2 R) n (%)	Multirésistantes (≥ 3R) n (%)	Profil d'antibiorésistance
Site A	C4 12/06/17	0+	/	/	/	
	C5 03/07/17	4	2 (50%)	2 (50%)	0	[TIC]
	C8 04/09/17	1	1 (100%)	0	0	
	C9 11/09/17	2*	2 (100%)	0	0	
	C10 25/09/17	2*	2 (100%)	0	0	
	C11 09/10/17	4*	4 (100%)	0	0	
Site B	C3 29/05/17	1	1 (100%)	0	0	
	C6 17/07/17	14	13 (93%)	1 (7%)	0	[TIC – AMX]
	C8 04/09/17	52	51 (98%)	1 (2%)	0	[TIC]
	C9 11/09/17	1*	1 (100%)	0	0	
	C10 25/09/17	2*	2 (100%)	0	0	
	C11 09/10/17	2*	2 (100%)	0	0	
Site C	C4 12/06/17	0+	/	/	/	
	C5 03/07/17	0+	/	/	/	
	C6 17/07/17	3*	3 (100%)	0	0	
	C7 21/08/17	4	4 (100%)	0	0	
	C8 04/09/17	27	27 (100%)	0	0	
	C9 11/09/17	14	14 (100%)	0	0	
	C10 25/09/17	2	0	0	2 (100%)	[AMX – TIC – CTX – CEF]
	C3 29/05/17	30	30 (100%)	0	0	
Site D	C4 12/06/17	11	11 (100%)	0	0	
	C5 03/07/17	3	3 (100%)	0	0	
	C7 21/08/17	1	1 (100%)	0	0	
	C8 04/09/17	4	4 (100%)	0	0	
	C9 11/09/17	4	4 (100%)	0	0	
	C10 25/09/17	2*	2 (100%)	0	0	
	C 12 23/10/17	10	9 (90%)	0	1 (10%)	[AMX – AMC – TIC – TIM]

été trouvées après enrichissement, les isolats sont signalés par une étoile dans le Tableau 8. C'est ainsi un total de 200 isolats qui ont été étudiés.

Nous pouvons voir, à partir du Tableau 8, que nous avons des bactéries sensibles, résistantes à 1 ou 2 antibiotiques, ou multirésistantes (portant plus de 3 résistances).

Pour le site A, 6 campagnes étaient concernées par la présence de *E. coli*, et 13 isolats au total ont pu être analysés. Parmi les 6 campagnes, 4 (C8, C9, C10 et C11), dont les isolats proviennent d'un isolement après enrichissement, ne présentent que des *E. coli* 100% sensibles. La campagne C5 (30/07/2017) est la seule à présenter 50% d'isolats sensibles et 50% de *E. coli* résistantes. Le profil d'antibiorésistances des deux souches révèle qu'elles sont toutes les deux résistantes à la Ticarcilline. Pour la campagne C4, bien que des *E. coli* aient été dénombrées, elles n'ont pas pu être séparées de la flore accompagnante, malgré plusieurs isolements.

Etant donné qu'il n'y a pas présence d'isolats présentant un profil de multi-résistance, et d'après les travaux de Flores-Ribeiro *et al* (2012), nous pouvons éliminer une origine humaine de la contamination. Le fait qu'il n'y ait qu'une sous-population R1-2 pourrait indiquer une origine de contamination plutôt animale. Le faible nombre d'isolats nous incite cependant à la prudence.

Le site B présente, lui aussi, 6 campagnes concernées par la présence de *E. coli* sur les échantillons de laitue, présentant un total de 72 isolats analysés. Là encore, 4 campagnes (C3, C9, C10 et C11) ne rassemblent que des *E. coli* sensibles aux antibiotiques, mais le nombre d'isolats testés est très faible pour ces 4 campagnes (Tableau 8). Les deux campagnes, C6 et C8, possèdent des souches résistantes (R1-2). La campagne C6 présente 7% (1/14) de souches résistantes à l'Amoxicilline et à la Ticarcilline, tandis que la campagne C8 présente 2% (1/52) de souches résistantes à la Ticarcilline (Tableau 8). Tout comme pour le site A, l'absence de profil de multi-résistance nous laisse penser que l'origine de contamination n'est pas humaine, mais peut être animale (élevages bovins). De plus, cette contamination n'est pas continue et n'intervient qu'épisodiquement (2 campagnes positives sur 12 au cours de la saison 2017, le 17 juillet pour la C6 et le 4 septembre pour la C8).

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Au niveau du site C, 7 campagnes sont concernées par la présence de *E. coli*, avec un total de 50 isolats. Pour les campagnes C4 et C5, aucun isolat n'a pu être obtenu à cause de la présence d'un excès de flore accompagnante. 4 campagnes (C6, C7, C8 et C9) ne présentent que des isolats sensibles à tous les antibiotiques utilisés. A noter que la campagne C8 était pourtant celle ayant le plus d'échantillons contaminés, dont un avec une densité en *E. coli* de 350 UFC/g (Tableau 7). L'absence d'isolats multi-résistants parmi les 27 étudiés suggère que cet apport de *E. coli* n'est pas issu d'une STEP ou d'une fosse septique. La campagne C10 du 25 septembre 2017 est la seule du site à présenter de l'antibiorésistance, avec deux souches multi-résistantes dont le profil de résistance est [AMX – TIC – CTX – CEF]. La présence de souches multi-résistantes de *E. coli* pourrait indiquer une contamination fécale d'origine humaine pour cette période, bien que le nombre d'isolats soit faible (2).

Pour finir, le site D comporte 8 campagnes au cours desquelles des *E. coli* ont été isolées sur les laitues, permettant d'obtenir un total de 65 isolats. Sur ces 8 campagnes, 7 présentent des isolats uniquement sensibles, ce qui représente 55 isolats (soit 84,6%). Comme dans le cas précédent, une origine humaine de la contamination est donc peu probable, notamment concernant la campagne C3 pour laquelle 30 isolats ont été étudiés. Seule la campagne C12 possède une souche multi-résistante (10% des isolats) dont le profil d'antibiorésistance est le suivant : [AMX – AMC – TIC – TIM] (que des résistances aux β -lactamines pénicillines). Comme pour le site C, la présence de cette souche présentant des résistances à plus de 3 antibiotiques dans l'échantillon de laitue pourrait indiquer une origine humaine de la contamination.

Sur chacun des sites, nous pouvons remarquer qu'il y a une importante proportion de *E. coli* sensibles aux antibiotiques, représentant 84,6% pour le site A, 97,2% pour le site B, 96% pour le site C et 98,4% pour le site D (Tableau 8). Comme expliqué précédemment, et selon les travaux précédents, les souches de *E. coli* présentes dans l'environnement, en absence de contamination fécale, sont sensibles aux antibiotiques. Certaines contaminations d'origine animale comportent cependant aussi une proportion conséquente de *E. coli* sensibles.

Bien que n'ayant qu'une très faible contamination des laitues par des bactéries résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques, nous pouvons distinguer deux cas. D'une part les exploitations ne présentant que des contaminations potentiellement d'origine animale (élevages), qui correspondent à nos sites A et B. Ces sites, comme évoqué plus haut,

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Tableau 9 : Répartition de l'antibiorésistance présente chez les *E. coli* isolées de la réserve d'eau du site D. Les souches dites résistantes portent une ou deux résistances aux antibiotiques tandis que les multirésistantes portent au moins 3 résistances

	Isolats	Sensibles	Résistantes	Multirésistantes	Profils
C1 09/05/17	135	131	4 (2,69%)	0	[IMP] [AMC ?? – TIC]
C2 15/05/17	94	90	4 (4,25%)	0	[TET – SXT] [AMX - TIC]
C3 29/05/17	150	142	7 (4,66%)	1 (0,66%)	[TET] [CEF] [AMX – TIC – TIM – CEF – CAZ – KAN – AMC – TET - STR]
C4 12/06/17	140	128	9 (6,42%)	3 (2,14%)	[TET] [STR] [AMX – TIC] [TIC – CAZ] [TET – SXT] [AMX – TIC – TIM ?? – TET]
C5 03/07/17	147	142	4 (2,72%)	1 (0,68%)	[CIP] [AMX – TIC – CHL - TET]
C6 17/07/17	23	23	0	0	–
C7 21/08/17	<i>Prélèvement non réalisé (sècheresse)</i>				
C8 04/09/17	147	134	10 (6,80%)	3 (2,04%)	[TET] [CIP] [TET – STR] [TIC – AMC ??] [TIC – TIM] [AMX – CEF – AMC]
C9 11/09/17	<i>Aucun isolat pur obtenu</i>				
C10 25/09/17	150	123	17 (11,33%)	10 (6,66%)	[TET] [AMX] [TIM] [CAZ] [AMX – AMC] [AMX – TIC] [AMX – CEF – AMC] [AMX – TIC – NAL] [AMX – CEF – AMC – TET]
C11 09/10/17	148	138	5 (3,37%)	5 (3,37%)	[NAL] [CIP] [KAN] [AMX] [NAL – CIP] [AMX – TIC – STR] [AMX – CEF – AMC] [SXT – NAL - STR]
C12 23/10/17	149	142	5 (3,35%)	2 (1,34%)	[KAN] [TET] [CEF] [TET – STR] [AMX – TIC – TIM ??] [AMX – TIC – TIM – AMC]

font partie des exploitations tournées vers les produits de 4^e gamme, donc en lien direct avec les industriels et leur charte de qualité. D'autre part, les exploitations C et D, dirigées vers les produits de 1^e gamme, sur lesquelles nous avons pu isoler des bactéries multi-résistantes, probablement d'origine humaine. Cependant, les contaminations étaient très faibles au niveau des productions, notamment par rapport à l'eau d'irrigation pour le site D.

2. Dans l'eau d'irrigation du site d'exploitation D

Sur la Figure 49, au niveau de chaque densité de population de *E. coli* dans l'eau d'irrigation, se trouve le pourcentage des souches résistantes aux antibiotiques. On peut constater que le niveau de résistance des populations n'est pas en relation avec leur densité. Par exemple, la densité en *E. coli* obtenue lors de la campagne C11 est la plus élevée dans l'étude ($2,4 \cdot 10^3$ UFC/100mL), pour un niveau de résistance de cette population de 6,76%, alors que la densité de *E. coli* obtenue lors de la campagne C10 est plus faible ($5 \cdot 10^2$ UFC/100mL), bien que le niveau de résistance soit le plus fort de l'étude (18%). Un apport de *E. coli* n'entraîne donc pas forcément un apport supplémentaire de résistance. Cela dépendra du niveau de résistance de la population arrivante, et donc, de son (ou ses) origine(s).

Le Tableau 9 présente le profil d'antibiorésistance des 90 souches d'*E. coli* résistantes (portant 1 à 2 résistances) ou multi-résistantes (hébergeant plus de 2 résistances) isolées de la réserve d'eau du site D au cours des différentes campagnes. Nous voyons que, excepté la campagne C6 du 17 juillet 2017 où les 23 isolats sont sensibles aux 16 antibiotiques testés, tous les panels d'isolats collectés lors des autres campagnes contiennent des *E. coli* résistantes et/ou multi-résistantes. Dans les campagnes C1 et C2, aucune souche n'est multi-résistante et la contamination serait donc plutôt d'origine animale, bien que la nature des résistances soit particulière, notamment la résistance à l'imipénème.

Pour les autres campagnes, et notamment la campagne C3 où l'isolat multirésistant porte 9R, la présence de multirésistance suggère une origine humaine de la contamination, sans bien sûr exclure une contribution d'origine animale. Il est à souligner que la campagne C12 contient un isolat présentant le même profil de résistance que celui porté par la souche multirésistante isolée des laitues sur cette même campagne (AMX – AMC TIC – TIM). Bien qu'il

Troisième partie : Etat des lieux de la contamination des laitues en champs

Tableau 10 : Répartition (en pourcentage) des résistances en fonction des antibiotiques testés dans la population totale de E. coli provenant des laitues contaminées et de l'eau d'irrigation (site D).

Antibiotiques testés	% de résistance détectée dans la population totale de E. coli (n) isolée de :	
	Laitues (n=196)	Eau d'irrigation (n=1283)
Amoxicilline (AMX)	1,52%	3,04%
Amoxicilline + Ac. Clavulanique (AMC)	1,01%	1,87%
Ticarcilline (TIC)	3,55%	1,70%
Ticarcilline + Ac. Clavulanique (TIM)	0,51%	0,47%
Imipénème (IMP)	0%	0,23%
Céfotaxime (CTX)	1,01%	0%
Céfalotine (CEF)	1,01%	1,80%
Ceftazidime (CAZ)	0%	0,23%
Gentamycine (GEN)	0%	0%
Kanamycine (KAN)	0%	0,23%
Chloramphénicol (CHL)	0%	0,08%
Tétracycline (TET)	0%	3,20%
Sulfaméthoxazole + Triméthopri- (SXT)	0%	0,23%
Ac. Nalidixique (NAL)	0%	0,40%
Ciprofloxacine (CIP)	0%	0,55%
Streptomycine (STR)	0%	1,10%

Il y a des souches résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, la majeure partie, soit 93%, est sensible aux 16 antibiotiques testés comme c'est le cas pour les laitues.

Pour terminer, nous avons voulu essayer d'avoir une vision plus globale des résistances hébergées par les populations de *E. coli* circulant au niveau d'une production végétale maraîchère, les laitues de cette étude, et au niveau d'un point d'eau, la réserve de l'exploitation D. Le Tableau 10 présente la répartition, en pourcentage, des différentes résistances détectées soit à partir des laitues, soit à partir de l'eau d'arrosage. Pour les laitues, on s'aperçoit que les résistances ne concernent que 6 antibiotiques sur les 16 testés. Ces 6 antibiotiques appartiennent à deux sous-familles des β -lactamines, *i.e* les pénicillines (AMC, AMX, TIC, TIM) et les céphalosporines (CTX et CEF). Les résistances aux pénicillines et à la céfalotine (CEF) sont également très présentes dans les souches issues de l'eau, contrairement à la résistance à la céfotaxime (CTX) qui n'a pas été détectée parmi les 1283 isolats prélevés dans l'eau. Inversement, il est intéressant de remarquer que les résistances à la tétracycline et à la streptomycine (aminosides) portées par, respectivement, 3,2% et 1,1% des isolats collectés dans l'eau, ne sont pas représentées dans les 196 isolats testés issus des laitues (Tableau 10). La différence de taille des deux panels et la faiblesse de certains pourcentages peuvent bien sûr expliquer l'absence de certaines représentations au niveau des laitues. Il existe cependant un certain parallèle entre les deux profils, notamment au niveau des résistances les plus globalement représentées (pénicillines, céfotaxime) qui correspondent par ailleurs à des résistances souvent décrites dans les environnements contaminés par des rejets fécaux.

D. Conclusions

L'objectif de notre étude était d'évaluer la qualité sanitaire de la production de quatre exploitations maraîchères normandes vis-à-vis de la contamination microbiologique par des pathogènes entériques, *Salmonella* et STEC, de détecter d'éventuelles contaminations fécales des laitues par dénombrement d'*E. coli* et de rechercher, chez ces dernières, la présence de résistances aux antibiotiques.

Ce qui ressort de notre enquête est que la qualité sanitaire microbiologique des laitues dans les exploitations échantillonnées est satisfaisante selon l'arrêté européen 2073/2005. En effet, pour les exploitations B, C et D, aucun pathogène n'a été détecté. Tous les lots sont donc

satisfaisants, propres à la consommation, selon les plans à deux classes et à trois classes réalisés. Au niveau du site A, un lot a été classé non satisfaisant (lors de la campagne C4), car la présence de *Salmonella* a été détectée dans un échantillon. Cette souche de *Salmonella*, difficile à cultiver en laboratoire, pouvait provenir d'une contamination ancienne et avoir développé des capacités de survie, voire d'adaptation à son nouvel environnement. En effet, aucune contamination fécale importante n'a été détectée sur le même lot, la densité de *E. coli* étant inférieure à notre limite de détection de 10 UFC/g. Or, généralement, la présence de *Salmonella* s'accompagne d'une forte densité de *E. coli*, même si cette dernière ne permet pas de prédire systématiquement la présence de pathogènes entériques dans l'eau (Pachepsky *et al.* 2016).

Par ailleurs, la contamination fécale, dont le témoin est *E. coli*, n'est pas importante sur les laitues. De nombreux échantillons se trouvaient sous notre seuil de détection. Des apports ont tout de même pu être mis en évidence avec une certaine fréquence (11.6% de la totalité des échantillons présentaient des *E. coli* cultivables), mais ils étaient de relativement faible intensité et non généralisés. La contamination des 5 échantillons d'un même lot n'était en effet pas homogène. Il pourrait être possible qu'un échantillon avec une plus forte contamination ait contaminé les autres échantillons au moment de la récolte, notamment par contact entre les feuilles dans les caisses de récoltes, pouvant provoquer des transferts bactériens (Jensen *et al.* 2015; Mokhtari *et al.* 2018).

L'étude des profils d'antibiorésistances des souches d'*E. coli* isolées des laitues montre que la plupart sont sensibles aux antibiotiques testés. Parmi les bactéries résistantes, certainement issues d'une contamination fécale récente, seulement 2% (4/200) sont résistantes à 1 ou 2 antibiotiques et se trouvent sur les exploitations A et B (de 4^e gamme). 1,5% (soit 3/200) des souches de *E. coli* présentent une multi-résistance, c'est-à-dire qu'elles résistent à au moins 3 antibiotiques, ce qui pourrait suggérer une origine de contamination humaine (Flores Ribeiro *et al.* 2012). Ces 1,5% se retrouvent sur les sites C et D.

L'analyse de l'eau d'irrigation du site D nous a permis de mettre en évidence une contamination continue avec une densité moyenne autour de 100 *E. coli* /100mL non négligeable. La présence de souches multi-résistantes dans certaines campagnes et seulement résistantes dans d'autres (campagne C1 et C2) suggère un apport variable, mais permanent, de souches d'origine fécale, plutôt animale (élevages), avec cependant une contribution

humaine assez régulière. Ce plan d'eau, de qualité sanitaire non satisfaisante pour son usage (la densité de *E. coli* ne doit pas excéder 100 UFC / 100mL (JO UE N° 2017/C 163/01)), peut donc être défini comme un point critique sur l'exploitation D, mais le lien entre la contamination de l'eau d'irrigation et celle des laitues, est quant à lui difficile à certifier. En effet, comme énoncé au-dessus, la densité bactérienne de *E. coli* sur les feuilles est faible, bien en dessous de celle de l'eau. La seule souche antibiorésistante isolée des laitues (campagne C12) montre cependant un profil de résistance également présent dans l'eau pour la même campagne. Il est malgré tout délicat de conclure fermement avec une seule souche.

Quoiqu'il en soit, la présence de souches de *E. coli* résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques est avérée au niveau de la production de laitues sur les quatre sites et devrait donc être surveillée, même si le nombre d'échantillons concernés et la densité des souches sont faibles.

Discussion

Un nombre croissant de Toxi-Infections Alimentaires Collectives impliquant les produits végétaux a été rapporté, dont la plus marquante en Europe fut celle causée par les graines de fenugrec en 2011 (van Overbeek *et al.* 2014; Callejón *et al.* 2015; Radosavljević *et al.* 2016). Cela a conduit à de nombreux travaux scientifiques qui tendent à démontrer une capacité d'adaptation de certaines bactéries entériques pathogènes aux végétaux, comme *Salmonella* ou des souches entérohémorragiques de *Escherichia coli*. Dès lors, la persistance d'autres bactéries entériques peut également être attendue, notamment celle de souches résistantes, voire multi-résistantes aux antibiotiques. Dans ce domaine, de nombreuses études ont en effet rapporté que les contaminations fécales de l'environnement (effluents de STEP, ruissellements sur pâturages,...) étaient pourvoyeuses d'antibiorésistances, notamment via l'émission de souches de *E. coli* porteuses de plasmides de résistances (Kovačić *et al.* 2017; Gao *et al.* 2017; Larsson *et al.* 2018; O'Flaherty *et al.* 2019a). Ces dernières se disséminent ensuite grâce à la circulation des eaux environnementales et peuvent parvenir aux cultures maraîchères. L'ingestion de telles bactéries peuvent renforcer les phénomènes de résistance aux antibiotiques chez l'Homme et les animaux, compromettant ainsi grandement nos moyens de défense contre les maladies d'origine bactérienne.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication des bactéries entériques antibiorésistantes ou pathogènes dans la contamination des laitues, produits maraîchers consommés crus.

La caractérisation de plasmides d'antibiorésistance, isolés de souches de *E. coli* issues d'environnements aquatiques pollués, nous a permis de constater la capacité de transfert par conjugaison de la plupart des 22 plasmides étudiés, au moins au sein de la même espèce, voire, pour certains, vers un autre genre, *Pseudomonas*. Il faut souligner que ce genre est très répandu dans l'Environnement et qu'il pourrait se comporter comme un relai efficace dans les phénomènes de circulation et d'évolution de l'antibiorésistance dans les milieux naturels qui sont considérés comme des réservoirs dynamiques de gènes de résistance (voir article en annexe, Camiade *et al.*, en cours de soumission). La conjugaison est le transfert horizontal de gènes le plus fréquemment recherché et mis en évidence au sein des populations bactériennes et généralement dit le plus efficace (von Wintersdorff *et al.* 2016). Durant une

étude sur les plasmides conjugatifs présents dans une rivière en Chine, Dang *et al.* (2017) ont démontré que les gènes de résistances plasmidiques étaient les gènes dominants au sein de la rivière, montrant ainsi le rôle crucial des plasmides conjugatifs dans la dissémination des gènes de résistance.

Même si tous les plasmides que nous avons étudiés ne sont pas conjugatifs, ils restent transférables par transformation ou transduction. De plus, les nombreux éléments génétiques qu'ils portent, comme les intégrons (10/22 plasmides portent des intégrons de classe 1 et 1/22 plasmides des intégrons de classe 2) ou des transposons (présence des gènes de transposases dans 19/22 plasmides) favorisent la circulation des gènes d'antibiorésistance entre réplicons au sein de la cellule. Un emboitage de ces différents éléments augmente encore l'efficacité de leur dissémination. En effet, des intégrons peuvent être hébergés au sein de transposons, comme le Tn402-like, qui peuvent eux-mêmes se transposer au niveau de plasmides par exemple (Gillings 2017). En fonction de leur support génétique (chromosome, plasmide, ADN de phage), ces éléments sont susceptibles d'être transportés vers une autre bactérie, par conjugaison, transformation ou transduction (Penadés *et al.* 2015; von Wintersdorff *et al.* 2016; Colavecchio *et al.* 2017; Gunathilaka *et al.* 2017). Lors de la transduction, ce sont notamment des éléments génétiques tels que des transposons, des îlots génomiques ou des plasmides qui sont transférés (Brown-Jaque *et al.* 2015). Chez les bactéries entériques, de nombreux intégrons de classe 1, 2 et 3 ont été retrouvés, ceux de classe 1 étant les plus étudiés à cause de leur large distribution parmi les bactéries à Gram-négatif d'intérêt clinique et sont les plus rapportés chez l'Homme et les animaux (Ploy *et al.* 2005; Stalder *et al.* 2012). Les intégrons de classe 1 sont libérés dans l'environnement notamment *via* les STEP où il a été rapporté que 10^{19} bactéries portant des intégrons de classe 1 étaient relâchées chaque année dans l'environnement au Royaume-Uni (Gaze *et al.* 2011). De plus, les STEP n'éliminant pas les ADN des bactéries lysées, une augmentation de la quantité de gènes *intI1* codant l'intégrase des intégrons de classe 1 au cours du traitement des eaux est observée (Gillings *et al.* 2015) et le taux de dégradation de ces intégrons au sein des boues d'épuration (parfois utilisées comme engrais) est assez lent, entraînant leur dissémination, notamment dans le sol (Burch *et al.* 2014). Les fumiers porcins et bovins contiennent aussi beaucoup d'intégrons de classe 1, pouvant aller jusqu'à 5.10^8 copies du gène *intI1* /g

(Sandberg and LaPara 2016; Gillings 2017). Les gènes *int11* des intégrons de classe 1 issus de d'isolats cliniques sont hautement conservé (possédant une identité nucléotidique de 99% à 100%) ce qui suggère une origine commune récente. A l'inverse, les gènes *int11* d'intégrons de classe provenant de l'Environnement (sol, sédiment, biofilm) ont montré une grande diversité de séquences (Gillings *et al.* 2015). Ainsi, Gillings *et al.* propose d'utiliser les intégrons de classe 1 « cliniques », c'est-à-dire ceux ayant une séquence du gène *int11* hautement conservé, comme indicateurs de contamination fécale. De leur côté, Borruso *et al.* en 2016, ont montré l'absence d'intégrons de classe 1 dans de l'eau douce d'un parc national, zone peu soumise à un impact anthropique, à la différence d'eaux provenant de zones urbaines, industrielles ou agricoles. Ils ont aussi remarqué que les intégrons de classe 1 présent dans les zones industrielles ne présentaient pas de gènes de résistances aux antibiotiques a contrario des zones urbaines et agricoles, plus impactées par les rejets fécaux. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la prévalence des intégrons de classe 1 et la nature des cassettes portées pourraient être développées en tant que bio-indicateur de l'origine de la contamination dans des environnements d'eaux douces polluées (Borruso *et al.* 2016).

Les gènes de résistance que nous avons identifiés sur les différents plasmides étaient généralement identiques, les résistances majoritaires portées appartiennent à la famille des β -lactamines, assez répandus dans l'environnement

Nos contaminations de jeunes plants de laitues, en conditions contrôlées, par les souches de laboratoire portant certains des plasmides de résistance d'intérêt, d'une part, et les souches environnementales associées, d'autre part, nous ont permis de mettre en évidence trois facteurs influençant la persistance des souches d'*E. coli* choisies au niveau des feuilles de laitues. Ces facteurs sont le temps de contact des bactéries avec les feuilles, la variété de laitue étudiée, ainsi que l'origine des souches (laboratoire ou isolées de l'environnement).

En effet, nos investigations ont montré que plus le temps de contact entre bactéries et feuilles augmentait, plus la fréquence de survie diminuait (sauf pour deux environnements). Cette létalité (ou entrée en état Viable Non Cultivable) pourrait provenir des conditions de vie particulières à la surface des feuilles, qui n'est pas un environnement favorable aux bactéries entériques, mais pourrait également venir de la plante elle-même. Des travaux ont démontré que, pour une même taille d'inoculum, de *E. coli* O157:H7 ou *Salmonella*, déposé sur des feuilles d'âge différent, les densités bactériennes retrouvées après 3 jours d'incubation n'étaient pas les mêmes (Brandl and Amundson 2008). La population bactérienne cultivable restait plus importante sur les jeunes feuilles par rapport aux feuilles moyennes. Selon les auteurs, cette différence pourrait être expliquée par les exsudats foliaires, qui, chez les jeunes feuilles, contiennent plus d'azote et de carbone, nutriments pouvant permettre le développement bactérien (Brandl and Amundson 2008).

À la surface foliaire ce trouve aussi des communautés bactérienne formant la phyllosphère. Elle peut être composée de bactéries bénéfiques, appelées « Phyllospheric Plant Growth-Promoting Bacteria » (Wagi and Ahmed 2017) ou de bactéries néfastes pour la plante comme les phytopathogènes (par exemple *Pseudomonas syringae*). Cet ensemble bactérien peut procurer de la nourriture aux bactéries entériques, par dégradation des cellules végétales. Mais il peut aussi jouer un rôle d'éviction vis-à-vis des bactéries allochtones par compétition au sein des niches écologiques, et lutte pour un abris, tels que les stomates, fissures et crevasses qui offrent protection contre certains stress environnementaux, ou pour les nutriments présents à la surface des feuilles (Cooley *et al.* 2003; Cooley *et al.* 2006; Brandl 2008; Williams and Marco 2014; López-Gálvez *et al.* 2018). En plus de cette compétition, les bactéries entériques vont induire les défenses des plantes. En effet les végétaux vont reconnaître les flagellines des bactéries et déclencher une réponse immunitaire (PTI) (Jo and Park 2019).

Ces différentes interactions conduisent, comme nous l'avons constaté, à une chute rapide de la survie de la plupart des bactéries entériques testées (mort ou entrée dans un état de grand stress (état VNC)).

L'effet bactéricide au cours du temps que nous avons décelé dépend effectivement de la variété des plants étudiés, confirmant que les propriétés physico-chimiques de la surface

Discussion

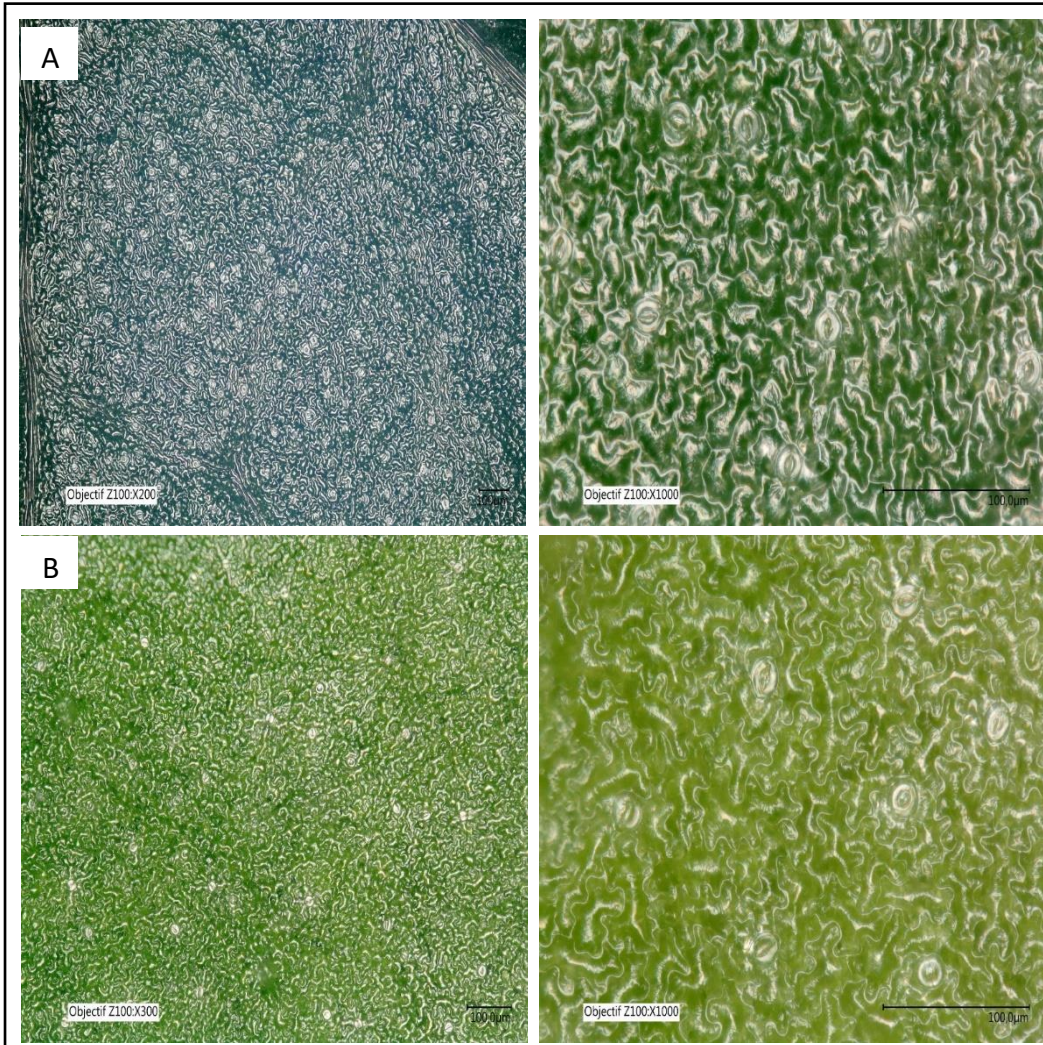
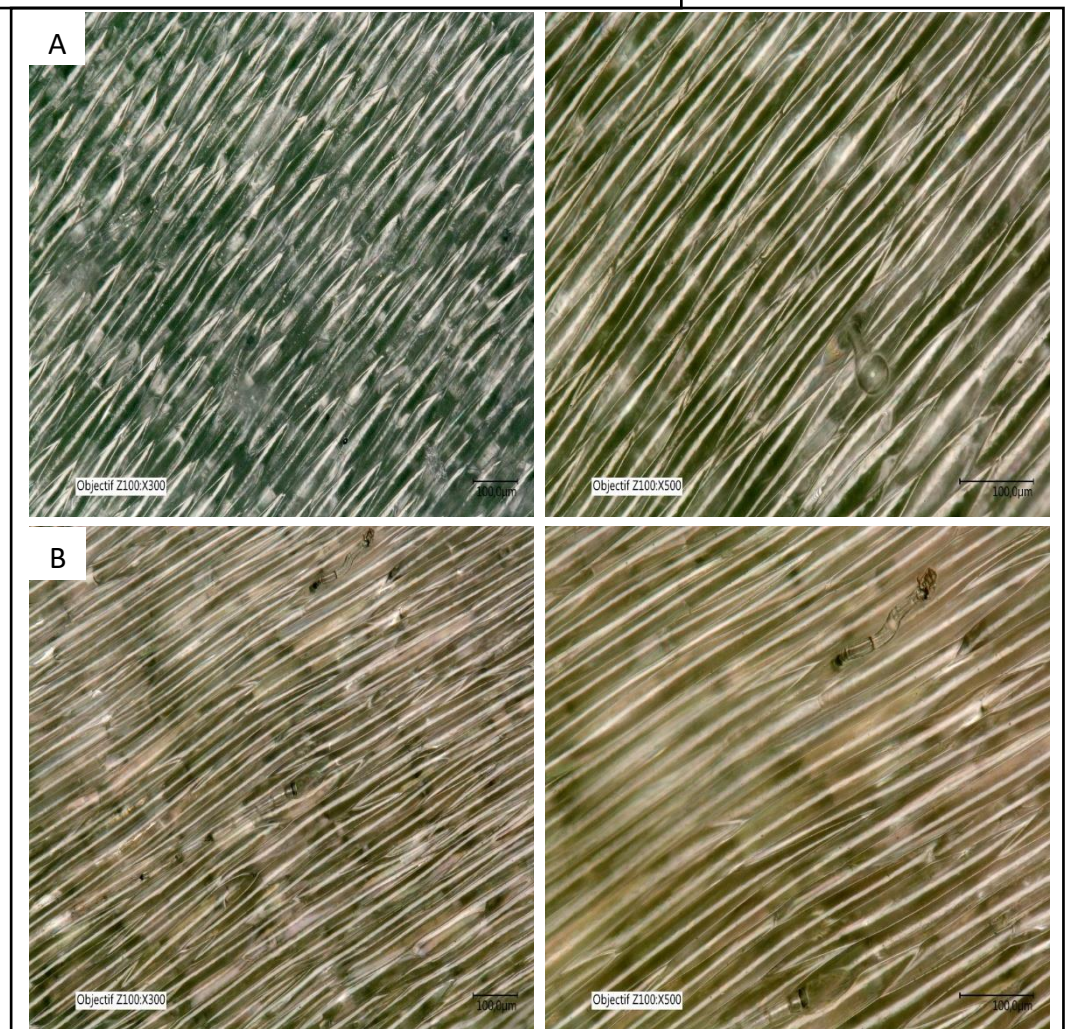


Figure 52: Architecture d'une feuille de laitue Romaine (A) et Pommée (B) vue au microscope 3D à différents grossissements. Sont visibles sur ces photographies les cellules végétales et les stomates

Figure 53 : Architecture d'une nervure centrale de feuille de laitue Romaine (A) et Pommée (B) vue au microscope 3D à différents grossissements. Sont visibles les cellules allongées de la nervure et des trichomes



foliaire et/ou la réaction de défense des plants sont différents. Nous avons vu plus haut que les exsudats foliaires changent selon l'âge de la feuille, ils change donc selon la variété, tout comme la topologie de la feuille (Erickson *et al.* 2019). En effet, parmi les laitues se trouvent de nombreuses variétés qui, au stade mature, sont largement différenciables en fonction de la topologie des feuilles, comme la laitue Pommée, Romaine ou encore Batavia. Si, au stade mature, ces variétés sont visuellement très identifiables, les différences sont présentes dès le stade jeune plant. Lors de nos expérimentations, nous avons pu remarquer une différence de couleur et d'épaisseur entre les variétés Pommée et Romaine, ces dernières étant plus foncées et plus épaisses (Figures 52 et 53). Cette diversité morphologique pourrait se traduire par des différences dans les réponses immunitaires mises en place par les végétaux.

Un troisième facteur important intervenant dans la persistance des bactéries entériques à la surface foliaire a pu être identifié au cours de ces travaux : la souche bactérienne elle-même. Il est attendu que l'état métabolique des bactéries entériques ait une grande importance pour qu'elles réussissent à s'installer durablement. Lors de nos expérimentations, nos bactéries, en plus d'être en phase exponentielle de croissance, étaient étalées avec un peu de leur milieu de culture (LB). Pour beaucoup d'entre elles, ces conditions optima ne leur a cependant pas suffi pour survivre en bon état métabolique et établir des interactions fortes avec la feuille. Une étude de Quilliam *et al.* en 2012, a montré que l'activité métabolique de bactéries *E. coli* O157:H7 internalisées ou très fermement attachées était plus grande que celles juste posées à la surface, donc faiblement liées, suggérant ainsi que ces bactéries entériques non seulement persistent sur les feuilles, mais arrivent aussi à métaboliser des nutriments d'origine végétale (Quilliam *et al.* 2012).

Lors de ces travaux, nous avons pu mettre en évidence que les souches de *E. coli* issues de l'environnement présentaient une meilleure survie sur feuille que les souches de DH5 α MCR transformées. Dans leur étude de 2018, Jang and Matthews ont montré l'existence d'une différence de survie entre les souches O157:H7 et O104:H4 sur la laitue, avec une meilleure persistance de la dernière. Les différences se trouveraient notamment au niveau de leur capacité à former un biofilm et de la sécrétion de polysaccharides (capsulaires dans le cas présent) qui serait plus importante chez O104:H4 (Jang and Matthews 2018). Dans notre cas, la différence entre les souches de laboratoire et celles issues de l'environnement pourrait

suggérer une possible pré-adaptation de ces dernières vis-à-vis de stress environnementaux, leur permettant un temps de survie plus long dans des écosystèmes naturels. En effet, il semblerait que des pré-expositions à des stress permettent aux bactéries de mieux s'adapter et même de répondre à d'autres stress plus efficacement (Moghaddam *et al.* 2017). Deux de nos souches récoltées dans l'environnement (effluents de STEP), multi-résistantes aux antibiotiques et donc, très probablement d'origine humaine, sont tout particulièrement à remarquer : ECα2409 et ECα2424 ont en effet su s'imposer au niveau de la niche écologique foliaire, surmonter la réaction immunitaire du plant de laitue (chez les deux variétés) et se maintenir pendant au moins 11 jours à la surface des feuilles.

Les plasmides sont susceptibles d'améliorer les capacités d'adhésion de leur souche-hôte, notamment, dans le cas des conjugatifs, grâce aux pili de conjugaison qui peuvent se comporter comme des facteurs d'adhésion (Hori and Matsumoto 2010; Berne *et al.* 2015). Deux des plasmides de notre étude, pME8 (conjugatif) et pME11, sembleraient avoir un impact positif sur l'adhésion de DH5αMCR, mais la dégradation rapide de l'état métabolique de la souche de laboratoire sur les feuilles de laitue ne nous permet pas de l'affirmer.

Différents travaux ont pu établir des corrélations entre l'adhésion, la formation de biofilm et la présence de multi-résistances, mais aucune preuve formelle ne permet de dire que la présence de plasmides conjugatifs favorise réellement l'adhésion, sachant que le coût métabolique du plasmide peut être important et diminuer la survie bactérienne (Lee *et al.* 2008; Rao *et al.* 2008; Alcántar-Curiel *et al.* 2018).

Nous avons tout de même pu démontrer la survie de certaines souches environnementales antibiorésistantes, pendant 11-12 jours, à la surface des feuilles de laitues (Romaines et Pommées). Un essai préliminaire de suivi de survie, après contamination volontaire par EC2146 et EC4952, a été réalisé sur 6 semaines. A l'issue de cette période, la présence de *E. coli* cultivables était encore détectable. Le suivi a dû être interrompu, car les laitues, cultivées en pot, fanaient. Cela montre tout de même que des bactéries entériques multi-résistantes sont capables de survivre sur feuille, en étant cultivables, jusqu'à 1,5 mois au minimum. Notons également que la taille des populations bactérienne est un élément fort en faveur de leur persistance. Si la contamination initiale est importante, comment exclure que quelques-unes parviennent malgré tout à se maintenir ?

L'étude sur parcelles maraîchères de quatre exploitations normandes a révélé une qualité sanitaire satisfaisante des cultures de laitues, sans détection de bactéries entériques pathogènes (*Salmonella* et les souches STEC ont été recherchées), sauf pour un échantillon présentant une *Salmonella* difficilement cultivable. Le témoin de contamination fécale *E. coli* a cependant pu être dénombré sur 11,7% des échantillons de laitues collectés au total sur les quatre exploitations (28/240 échantillons). Les densités étaient le plus souvent faibles et n'ont pas remis en cause la qualité sanitaire des lots étudiés selon les critères microbiologiques en vigueur (arrêté européen N°2073/2005). Cependant, certaines souches d'*E. coli* isolées à partir des laitues portent des résistances aux antibiotiques, ce qui montre que la consommation de végétaux constitue une voie de retour à l'Homme pour l'antibiorésistance et contribue à l'enrichissement de notre microbiote intestinal en bactéries résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques (Al-Kharousi *et al.* 2018). Nous reviendrons sur ce sujet un peu plus loin.

L'eau d'arrosage de l'une des exploitations a été analysée et présentait une présence constante d'*E. coli* à une densité régulière de 100 UFC/100 mL, avec, par période, des apports plus conséquents. Ce résultat n'est pas en rapport avec ceux obtenus sur les échantillons de laitues de cette exploitation dans lesquels nous n'avons détecté des *E. coli* que dans 13,3% des cas (8 échantillons sur 60). Nous devons cependant rester prudents dans cette comparaison, car il nous a été difficile d'être certains que les échantillons de laitues analysés avaient bien i) été arrosés et ii) avec cette eau (une autre réserve d'eau est disponible sur l'exploitation, mais plus éloignée). Quoiqu'il en soit, la production de l'année 2017 de ce cultivateur a été de bonne qualité bactériologique, malgré le point critique lié à la qualité de sa réserve d'eau principale. Ce plus faible signal de *E. coli* sur laitues que dans l'eau d'irrigation pourrait être expliqué par une mortalité importante des souches bactériennes, exposées à de nombreux paramètres environnementaux. Les stress environnementaux, comme l'exposition aux UV, la température, ainsi que la disponibilité en eau à la surface des feuilles, vont avoir un impact sur les populations bactériennes, notamment sur les bactéries entériques dont la niche écologique principale est très différente. Pour ces dernières, des études montrent une survie plus importante lorsque les températures sont chaudes (printemps / été) plutôt que lorsqu'elles diminuent (Heaton and Jones 2008; Xu *et al.* 2016). Cependant, une diminution

des températures peut aussi induire un état VNC des bactéries entériques sur les feuilles, leur permettant de se maintenir un temps (Dinu and Bach 2011). Lorsque l'on regarde les champs maraîchers en début d'année, vers mars-avril, des voiles d'hivernage ou des paillis (en papier ou en plastique) peuvent être installés pour protéger les jeunes plants des gelées tardives ou des ravageurs tels que les oiseaux ou les lapins, qui semblent apprécier les feuilles tendres. Ces protections sont également bénéfiques pour les bactéries entériques éventuellement présentes, puisqu'elles les abritent des UV, les maintiennent dans une hygrométrie stable et leur permettent de bénéficier de la chaleur provenant du sol, améliorant ainsi leur survie (Xu *et al.* 2016; López-Gálvez *et al.* 2018).

Il ne faut pas oublier non plus la phyllosphère des laitues en champs, qui est largement plus riche que celles des laitues cultivées sous serre, que ce soit au niveau de l'abondance de taxa qu'à celui des genres bactériens prédominants, entraînant des compétitions certainement plus importantes (Williams and Marco 2014).

Si l'on considère les profils d'antibiorésistance présentés par les souches d'*E. coli* isolées des laitues (des quatre exploitations) et de l'eau d'arrosage (de l'une des exploitations), nous retrouvons une certaine homogénéité, avec très souvent la présence de résistances aux pénicillines (amoxicilline et ticarcilline, associées ou non à l'acide clavulanique) et à la céphalosporine céfalotine. Ces résistances sont d'ailleurs très souvent décrites comme circulantes dans l'environnement. Au total, nous avons pu mettre en évidence des résistances à 15 antibiotiques sur les 16 testées, y compris à l'imipenème (3 souches résistantes), couvrant 8 familles et sous-familles d'antibiotiques. Le seul antibiotique pour lequel nous n'avons isolé aucune souche résistante au cours de cette étude sur parcelles est la gentamycine (aminoside). Les souches résistantes que nous avons pu isoler des salades portent de 1 à 5 résistances, tournées vers 6 antibiotiques, uniquement des β -lactamines. Ces souches sont peu nombreuses, mais présentes sur un aliment qui sera consommé lavé, mais sans cuisson. Les souches résistantes que nous avons pu isoler de l'eau d'arrosage, et donc susceptibles de parvenir au contact des laitues, portent de 1 à 9 résistances, tournées vers 14 antibiotiques répartis sur 8 familles et sous-familles. Notre panel beaucoup plus important de souches isolées à partir de l'eau peut expliquer cette différence.

Nous pouvons enfin remarquer que les souches multi-résistantes de *E. coli* (portant au moins 3 résistances), probablement d'origine humaine, présentent des profils d'antibiorésistance très proches, voire identiques à ceux portés par les plasmides que nous avons étudiés au début de ce travail, notamment le profil AMX-AMC-TIC-TIM et AMX-TIC-CHL-TET. Rappelons que ces plasmides ont été extraits de souches de *E. coli* isolées d'environnements aquatiques contaminés par des rejets fécaux. Il serait donc intéressant d'isoler et de caractériser le probable contenu plasmidique des souches multi-résistantes issues des laitues et de l'eau du bassin d'irrigation.

Conclusion générale et Perspectives

Selon l'arrêté européen N°2073/2005, la qualité sanitaire des quatre exploitations maraîchères étudiées est satisfaisante. Cependant, la présence de *E. coli* a elle aussi été relevée sur les laitues et dans l'eau d'irrigation (densité plus importante), dont certaines souches présentaient des résistances aux antibiotiques. Cela montre que, même dans un pays possédant des normes d'hygiène strictes, les végétaux de consommation crus ne sont pas si sains. En plus du risque sanitaire de la persistance de bactéries entériques pathogènes, s'ajoute le risque émergent de l'antibiorésistance. La résistance aux antibiotiques et sa dissémination deviennent un problème majeur au cœur des inquiétudes de la société. La grande question qui se pose maintenant est comment lutter contre la dissémination de l'antibiorésistance. Des campagnes de sensibilisation pour une meilleure utilisation des antibiotiques en médecine humaine ont été mises en place (« Les antibiotiques, c'est pas automatique ») et un meilleur encadrement de l'utilisation des antibiotiques au niveau des élevages pourrait être envisageable. Il pourrait aussi être concevable d'introduire des normes ou des suivis concernant les antibiorésistances dans les produits alimentaires.

Au cours de nos études sur la survie et l'adhésion bactériennes sur les laitues, la visualisation de nos souches et de leur organisation nous fait défaut. Est-ce que, selon l'origine de la souche par exemple, les zones de colonisation sont les mêmes ? Le biofilm formé est-il différent selon les plasmides de résistance portés ? Comment apparaissent les souches que l'on n'arrive pas à décrocher et que nous pensons en vie et fortement liées sur la laitue ? Pour répondre à ces questions, des techniques d'imagerie seraient intéressantes à développer sur surfaces végétales et à appliquer, notamment avec les kit dead or alive, permettant de différencier les bactéries vivantes et mortes, ou des souches possédant un gène codant une protéine fluorescente, comme la GFP⁴⁹ par exemple.

D'autre part, nous nous sommes concentrés exclusivement sur la persistance des bactéries sur les feuilles, étudiant ainsi des contaminations provenant du dessus de la plante (arrosage par aspersion, phénomènes d'éclaboussures ou de forts ruissellements), mais la

⁴⁹ GFP : Green Fluorescent Protein

contamination peut aussi venir de la terre, comme nous l'avons décrit dans l'étude bibliographique. Il pourrait être intéressant d'étudier l'éventuelle contamination de la plante par des bactéries entériques pathogènes et/ou multi-résistantes aux antibiotiques *via* les racines. Déclenchaient-elles des mécanismes de défense racinaire différents ? Il a été montré que les *Salmonella* pouvait être internalisée dans les racines, mais combien de temps mettent-elles à pénétrer et à monter dans la racine ?

Enfin, comme nous l'avons vu dans la discussion, les bactéries de la phyllosphère, que l'on pourrait considérer comme le microbiote végétal, peuvent influencer sur la survie des bactéries extérieures, qu'elles soient bénéfiques pour la plantes, phytopathogènes ou des bactéries entériques. Les connaissances sur la structuration de ce microbiote végétale sont encore faibles, et il serait donc intéressant de l'analyser sur les laitues en présence ou non de *E. coli* et voir si des modifications de composition peuvent être détectées (en métagénomique par exemple).

Matériels et Méthodes

Tableau 11 : Souches environnementales et de laboratoire

Souches	Antibiorésistance	Références
Souches environnementales		
EC 129	AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-KAN-CHL-TET-SXT-NAL-CIP-STR	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 210	AMX-AMC-TIC-TIM-KAN-STR-CHL-TET-SXT-NAL-CIP	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 421	AMX-TIC-KAN-STR-CHL-TET-SXT-NAL-CIP	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 528	AMX-TIC-GEN-KAN-STR-CHL-TET-SXT	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 1250	AMX-TIC-STR-CHL-TET-SXT	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 2146	AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-STR-CHL-SXT	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 2183	AMX-TIC-CEF-STR-SXT	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 2521	AMX-AMC-TIC-TIM-STR-CHL-TET-SXT-NAL	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 2660	AMX-TIC-STR-TET-SXT-NAL	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
EC 5008	AMX-AMC-KAN-TET-SXT-STR	Ce travail
EC 5618	AMX-AMC-TIC-TIM-CHL-TET-NAL-STR	Ce travail
EC 5718	AMX-AMC-TIC-TIM	Ce travail
EC 4952	AMX-TIC-CHL-TET	Ce travail
ECα 1669	AMX-TIC-TIM-AMC-CHL-TET-SXT-NAL-CIP	Ce travail
ECα 1704	AMX-AMC-TIC-TIM-TET-STR	Ce travail
ECα 1791	AMX-TIC-KAN-TET-SXT	Ce travail
ECα 1760	AMX-TIC-KAN-STR	Ce travail
ECα 2409	AMX-TIC-GEN-TET-SXT-STR	Ce travail
ECα 2424	AMX-TIC-KAN-SXT-STR	Ce travail
ECα 2604	AMX-TIC-TIM-KAN-STR	Ce travail
ECα 2587	AMX-TIC-TET-SXT-STR	Ce travail
Souches de laboratoire :		
<i>E. coli</i> DH5αMCR	<i>recA1, mcrA, mcrB, hsdR, endA1</i>	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> SC12 (W3101 Rif ^r)	<i>recA13, trpE, RIF</i>	Kopecko <i>et al</i> (1976)
<i>P. fluorescens</i> SBW25 Rif ^r	AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-CTX-AZT-CFS-RIF	Laroche-Ajzenberg <i>et al</i> (2015)
<i>P. putida</i> KT2440	AMX-TIC-TIM-CTX-CEF-AMC-CHL-SXT-NAL-FOS-RIF	Bagdasarian <i>et al</i> (1981)

A. Caractérisation des plasmides

I. Choix des souches

Dans un soucier de *E.coli* environnementales, nous avons choisi 21 souches parmi celles possédant le plus de résistances et ayant, pour quelques-unes, déjà fait l'objet de publications. Ces souches comportent entre 4 et 12 résistances aux antibiotiques et ont été isolées d'eaux de surfaces ou d'eaux souterraines lors de différentes campagnes de prélèvement.

Ces 21 souches ont fait l'objet d'extractions plasmidiques et les plasmides ont été introduits par transformation dans une souche de laboratoire DH5 α MCR lors de précédents travaux de thèses (Tableau 11).

II. Croissance bactérienne

Afin d'obtenir des souches en phase exponentielle de croissance ou stationnaire pour la réalisation des conjugaisons, des suivis de croissance ont été effectués. Une pré-culture (5mL de LB liquide) est réalisée à partir d'une boîte LB gélosée ensemencée avec une cryobille issue du soucier conservé à -80°C. Après incubation sur la nuit à 30°C ou 37°C selon la souche étudiée, une culture bactérienne est réalisée et la DO₅₈₀ est mesurée toute les heures, à l'aide d'un spectrophotomètre (Genesys 20 Thermo Spectronic, ThermoFisher, USA) et les courbes LogDO₅₈₀ = f(t) sont tracées.

Composition du LB liquide : 10 g.L⁻¹ de bacto-tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure ; 5 g.L⁻¹ de NaCl ; pH 7 ; 15 g.L⁻¹ d'agar pour les milieux gélosés

III. Survie Bactérienne

Pour connaître les concentrations en antibiotiques à utiliser pour les conjugaisons, des survies bactériennes ont été réalisées à partir de cultures bactériennes en phase exponentielles (DO₅₈₀ = 1). Des gouttes de 10 μ L des dilutions 10⁻¹ à 10⁻⁶ (réalisées dans de l'eau physiologique) sont déposées sur des boîtes de LB gélosé complémenté avec l'antibiotique étudié à des concentrations croissantes avec un écart de 5 μ g.mL⁻¹ entre chaque. Ces « tests en gouttes », moins précis qu'une numération classique par étalement de 0,1mL/boîte, permettent l'obtention rapide de la fréquence de survie sur les différents antibiotiques.

Tableau 12 : Antibiotiques testés au cours de l'étude pour la détermination de la résistance aux antibiotiques de E.coli, classés par famille

Familles	Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µG)
Pénicillines	Amoxicilline	AMX	25
	Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	20 + 10
	Ticarcilline	TIC	75
	Ticarcilline + Acide Clavulanique	TIM	75 + 10
Carbapénèmes	Iminépénème	IPM	30
Céphalosporines	Céfalotine	CEF	30
	Ceftazidime	CAZ	30
	Céfotaxime	CTX	30
Aminosides	Gentamycine	GEN	10
	Kanamycine	KAN	30
	Streptomycine	STR	10
Phénicolés	Chloramphénicol	CHL	30
Cyclines	Tétracycline	TET	30
Sulfamides	Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	SXT	75 + 1,25
Quinolones	Acide Nalidixique	NAL	30
	Ciprofloxacine	CIP	5

sont déposés sur la gélose à l'aide d'un distributeur (i2A, France). Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24h, à la température optimale de croissance des bactéries testées.

Les boîtes sont ensuite interprétées à l'aide du lecteur automatique de plaque SirScan μ (i2A, France) et du logiciel SirWeb (i2A, France).

IV. Profils d'antibiorésistance

La résistance aux antibiotiques est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose, selon les recommandations du comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Ainsi, seize antibiotiques (i2A, France), appartenant à différentes familles utilisées en traitement médical humain et animal, sont testés sur les bactéries (Tableau12).

Une gélose Mueller-Hinton (i2A, France) estensemencée par écouvillonnage avec une suspension bactérienne, normalisée à environ 10^8 bactéries.mL⁻¹, réalisé dans 9 mL d'eau physiologique à partir de colonies prélevées avec une anse stérile de 1 μ L d'une boîte gélosée de 24h. Des disques de papier-filtre imprégnés d'une concentration connue en antibiotiques sont déposés sur la gélose à l'aide d'un distributeur (i2A, France). Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24h, à la température optimale de croissance des bactéries testées.

Les boîtes sont ensuite interprétées à l'aide du lecteur automatique de plaque SirScan μ (i2A, France) et du logiciel SirWeb (i2A, France).

V. Conjugaison plasmidique

Sur un filtre de 0,45 μ m placé dans sur un milieu gélosé LB, 100 μ L de la souche donatrice en phase exponentielle de croissance (KT2240 ou SC12), sont déposés avec 100 μ L de la souche réceptrice en phase stationnaire de croissance (DH5 α MCR(pMEX⁵⁰)). Après incubation de 24h à 30°C (DH5 α MCR(pMEX) x KT2440) ou 37°C (DH5 α MCR(pMEX) x SC12), les filtres sont placés dans 5mL de LB liquide, et mis 1h30 en agitation à 30°C ou 37°C, le temps nécessaire à l'expression phénotypique dans un agitateur-incubateur (Innova 4300, New Brunswick Scientific, USA). Une numération de 100 μ L sur milieux LB gélosés, en présence des

⁵⁰ DH5 α MCR(pMEX⁵⁰) : Souche de laboratoire DH5 α MCR transformée par un plasmide pME portant le numéro X

Tableau 13 : Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les PCR de groupes d'incompatibilité.

Région Ciblée	Amorces	Séquences	Taille amplicon (pb)	Référence
RNAI	B/O f	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'	159	Carattoli et al, 2005
	B/O r	5'-TCTGCGTTCGCGCAAGTTCGA-3'		
<i>repA2</i>	FIC f	5'-GTGAACTGGCAGATGAGGGAAGG-3'	262	
	FIC r	5'-TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT-3'		
<i>repA</i>	A/C f	5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3'	465	
	A/C r	5'-ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT-3'		
Itérons	P f	5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3'	534	
	P r	5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'		
<i>repA</i>	T f	5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	750	
	T r	5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'		
RNA1	K/B f	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'	160	
	K/B r	5'-TCTTTCACGAGCCCGCAAA-3'		
<i>repA</i>	W f	5'-CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG-3'	242	
	W r	5'-GGTGC GCGGCATAGAACCGT-3'		
Itérons	FIA f	5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG-3'	462	
	FIA r	5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'		
<i>repA</i>	FIB f	5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'	702	
	FIB r	5'-GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG-3'		
<i>repA</i>	Y f	5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	765	
	Y r	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT-3'		
RNA1	I1 f	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	139	
	I1 r	5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'		
Ori-γ	X f	5'-AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT-3'	376	
	X r	5'-TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC-3'		
<i>parA – parB</i>	HI1 f	5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	471	
	HI1 r	5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'		
<i>repA</i>	N f	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	559	
	N r	5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'		
Itérons	HI2 f	5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC-3'	644	
	HI2 r	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'		
<i>repA, B, C</i>	L/M f	5'-GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG-3'	785	
	L/M r	5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'		

antibiotiques appropriés est ensuite effectuée. En parallèle des dilutions en cascade dans de l'eau physiologique sont réalisées et des numérations en gouttes (10µL des dilutions 10⁻¹ à 10⁻⁶ déposés) sur chaque boîte de sélection sont faites. Les transconjugants sont sélectionnés et numérés avec une double pression de sélection aux antibiotiques, l'une permettant de sélectionner le plasmide et l'autre de sélectionner la bactérie réceptrice. Le choix des antibiotiques est effectué en fonction du profil de résistance du plasmide, de la souche réceptrice et donatrice. Les numérations des bactéries réceptrices sont également réalisées afin de pouvoir déterminer la fréquence de conjugaison :

$$F_{conj} = \frac{Nb\ de\ transconjugants.\ mL^{-1}}{Nb\ de\ réceptrices.\ mL^{-1}}$$

Les bactéries parentales seules sont également dénombrées sur LB et milieu double sélection afin de calculer la fréquence de mutations spontanées :

$$F_{mut} = \frac{Nb\ de\ mutant.\ mL^{-1}}{Nb\ de\ réceptrices.\ mL^{-1}}$$

VI. Groupe d'incompatibilité

Les ADN des transformants DH5αMCR ont été obtenus par choc osmotiques (eau ultra pure) et choc thermique (10 min à 95°C).

Les groupes d'incompatibilité ont été détectés en utilisant la PCR based Replicon Typing rapportée par Carattoli *et al* (2005) et améliorée Jonson *et al* (2007). Nous avons testé les groupes suivant : Inc B/O, Inc FIC, Inc A/C, Inc P, Inc T, Inc K/B, Inc W, Inc FIA, Inc FIB, Inc Y, Inc I1, Inc X, Inc HI1, Inc N, Inc HI2 et Inc L/M par PCR multiplex (Tableau 13). Chaque groupe détecté a été confirmé par PCR. Les PCR ont été réalisées sur 100-150 ng d'ADN, dans un volume final de 50µL avec 200µM de chaque amorce, 1,5mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP et 0,5U.µL⁻¹ de la GoTaq G2 Flexi DNA Polymérase (Promega, France). Le programme PCR utilisé comportait une étape de dénaturation de 5 min à 94°C suivi par 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 62°C et 1,5 min à 72°C. Une élongation finale a été réalisée pendant 5 min à 72°C. Les contrôles positifs ont été gentiment fournis par A.Carattoli.

Tableau 14 : Amorces oligonucléotidiques pour la PCR des intégrons de classe I et II.

Région ciblée	Amorces	Séquences	Taille amplicon (bp)	Références
<i>intl1</i>	Intl1 f	5'-CCTCCCGCACGATGATC-3'	280	Bass <i>et al</i> , 1999
	Intl1 r	5'-TCCACGCATCGTCAGGC-3'		
<i>intl2</i>	Intl2 f	5'-CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3'	790	Mazel <i>et al</i> , 2000
	Intl2 r	5'-GTAGCAAACGAGTGACGAAATG-3'		

VII. Recherche des intégrons de classe I et II

La recherche des gènes *int11* et *int12* (Tableau 14) a été réalisée par PCR sur 100-150ng d'ADN dans un volume final de 50 μ L avec 200 μ M de chaque amorce, 2mM de MgCl₂ et 0.5U. μ L⁻¹ de GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, France). Pour les gènes *int11*, un cycle de dénaturation de 10min à 94°C a été suivi de 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 1 min à 72°C. Une élongation finale de 7 min à 72°C a ensuite été réalisée. Pour les gènes *int12*, le cycle de dénaturation a duré 5 min à 94°C suivi de 30 cycle de 30 sec à 94°C, 30 sec à 64°C et 1 min à 72°C et l'élongation finale a duré 7 min à 72°C.

VIII. Stabilité des plasmides

Des isollements successifs des transconjugants en absence de pression de sélection sur milieu LB ont été réalisés. Pour chaque isolement effectué, 50 colonies ont été repiquées sur milieu complémenté en antibiotiques permettant la sélection du plasmide. Le nombre de générations nécessaires à la formation d'une colonie a été estimée avec la formule suivante : $\ln N / \ln 2$.

IX. Séquençage plasmidique et analyse

Les plasmides des transformants DH5 α MCR ont été extraits en utilisant Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche Diagnostic, Meylan, France) à partir d'une culture de 300mL en suivant les recommandations du fabricant. Le séquençage PacBio a été réalisé par la société GATC (Konstanz, Allemagne). La détermination des groupes d'incompatibilité a été réalisée à l'aide de la base de données PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) organisé par H. Hasman et A. Carattoli et une cartographie des plasmides a été réalisée à l'aide de BASYS Bacterial Annotation System (<https://www.basys.ca/server4/basys/cgi/submit.pl>).

B. Développement des laitues

I. Variétés cultivées

Les variétés étudiées étaient les laitues Pommée et Romaine. La laitue Pommée est la variété la plus cultivée en France, tandis que la variété Romaine, qui est la plus cultivée aux Etats-Unis et qui commence à arriver en France, est aussi la variété la plus étudiée dans la bibliographie scientifique.

Au départ, des laitues Romaine Madrilène (Gondian, France) et Laitue Pommée Appia (Gondian, France) ont été utilisées pour le développement des expérimentations.

Par la suite, des jeunes plants de laitues Romaine et Pommée nous ont été fournis au stade 4 feuilles par le SILEBAN (partenaire du projet PATHOGREEN).

II. Culture en serre

Les plants de laitues ont été cultivés dans une cellule S3 de la serre NormandSerre (partenaire du projet PATHOGREEN). Leur culture jusqu'au stade 6 feuilles s'est faite avec une période de jour de 12h à 21°C et une période nuit de 12h à 17°C avec une hygrométrie entre 70 et 80% et un arrosage de 50mL tous les deux jours.

Les plants sont cultivés dans un pot contenant 2kg d'un mélange de 1/3 de terre à planter et 2/3 de terre végétale.

C. Adhésion des plasmides

I. Sur surface inerte

A partir d'une pré-culture de nuit, des cultures bactériennes d'une $DO_{580nm} = 0,2$ sont réalisées. 200µL des cultures sont ensuite déposés dans les puits d'une microplaque et cette dernière est incubée 2h à 37°C. Après le temps d'incubation les 200µL de culture sont retirés des puits délicatement, en posant la pointe du cône au fond du puits contre une paroi avant d'être passé au spectrophotomètre (Genesys 20 Thermo Spectronic, ThermoFisher, USA) pour obtenir ce que l'on appelle la fraction planctonique, c'est-à-dire les bactéries non adhérentes dans les puits. En parallèle, les puits des plaques sont lavés délicatement avec 200µL d'eau

ultrapure stérile puis 200µL de milieu nutritif LB neuf sont de nouveau déposés dans les puits. Les plaques sont alors incubées 24h à 37°C pour permettre le développement d'un biofilm. Le lendemain, les plaques sont sorties de l'étuve et les 200µL de LB sont délicatement enlevés des puits et jetés. Les puits sont ensuite lavés doucement trois fois avec 200µL d'eau ultrapure stérile, afin de n'avoir que les bactéries bien adhérentes, et 150µL de cristal-violet 1% sont introduits dans chaque puits et laissés 30 min à température ambiante. Le cristal-violet est ensuite enlevé doucement et jeté, les puits sont lavés deux fois à l'eau ultra-pure stérile pour enlever l'excédent de colorant. Enfin 200µL d'éthanol 70% est utilisé dans chaque puits durant 1 min afin de dissoudre le cristal-violet piégé dans les bactéries. La solution est de nouveau prélevée et la coloration est quantifiée à l'aide du spectrophotomètre pour obtenir la fraction biofilm. En effet, grâce au cristal-violet qui était piégé dans les bactéries nous pouvons estimer par densité optique la proportion de bactéries adhérentes aux parois des tubes. Afin de pouvoir comparer l'adhésion des différentes souches, les résultats sont ramenés sous la forme suivante :

$$\frac{DO_{580} \text{ Biofilm}}{DO_{580} \text{ Planctonique}}$$

Les expérimentations ont d'abord été réalisées sur des microplaques BioScreen de 100 puits mais le diamètre des puits était trop petit pour effectuer les lavages sans perturber les biofilms installés. Nous sommes donc passés sur des plaques Evergreen 96 puits en polystyrène (Référence 222-8030-01F, Lot M1648, Evergreen Scientist, Buffalo, NY). L'avantage de ces plaques est d'avoir un diamètre plus grand pour une meilleure manipulation, et qu'elles soient stériles avec un emballage individuel ainsi qu'un couvercle.

II. Sur feuille de laitues

A partir de pré-culture de nuit, des cultures bactériennes à $DO_{580nm} \approx 1$ sont réalisées. Des numérations de 0,1mL des dilutions 10^{-5} et 10^{-6} sur milieu gélosé sur LB sont effectuées et les boîtes sont mises à 37°C pendant 24h afin de connaître la densité exacte des cultures bactériennes.

100µL des cultures bactériennes sont ensuite étalées délicatement à la surface des feuilles de laitue par goutte de 10µL à l'aide d'une anse stérile de 10µL. Sur chaque plant de laitue au stade 6 feuilles, toutes les feuilles sont contaminées.

Au temps 1, 2, 4, 7, 9 et 11 jours après contamination, les feuilles les plus vieilles (les premières apparues) de chaque plant sont récoltées pour analyse. Elles sont mises dans un tube à centrifuger de 50mL dans lequel sont introduits 20mL d'eau physiologique stérile. Les tubes sont déposés à l'horizontale dans un agitateur incubateur (IKA 4001 ...) et agités à 230 rpm et 37°C pendant 1h afin de décrocher doucement les bactéries des feuilles et de les remettre en bon état métabolique. Les tubes sont ensuite vortexés 3 min à puissance maximale (VWR, Pennsylvanie) pour totalement décrocher les bactéries. Ensuite l'eau de lavage est utilisée pour faire des numérations en goutte des dilutions 10^{-1} à 10^{-6} sur milieu gélosé Rapid'*E.coli* (BioRad). Les boîtes sont incubées 24h à 37°C et vont permettre de connaître le nombre de bactéries décrochées de la feuille de laitue par rapport au nombre déposé. Le reste de l'eau de lavage est filtré à l'aide d'un filtre 0.45µM (Millipore) et le filtre est conservé à -20°C dans des boîtes de pétri de 20cm de diamètre.

La laitue est conservée à -20°C ou -80°C en attendant de réaliser des extractions d'ADN.

III. Extraction ADN eau de lavage et feuille de laitues

Les extractions d'ADN des bactéries contenues dans les eaux de lavage et restées accrochées sur la laitue sont réalisées avec le Kit FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France).

Les filtres et les feuilles de laitues sont découpées afin de rentrer dans les tubes lysing Matrix E puis 978µL de Sodium Phosphate Buffer et 122µL de MT Buffer sont ajoutés (afin de solubiliser les protéines membranaires, extracellulaires et les contaminants du sol). Les tubes sont placés dans un FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) 40 secondes à vitesse 6. Puis les tubes sont centrifugés 7 min à 13000g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Montesson, France). Le surnageant est transféré dans un microtube 1.5mL dans lequel 250µL de Protein Precipitation Solution est ajouté (pour séparer les acides nucléiques des protéines et des débris cellulaires). Le tube est retourné manuellement dix fois puis centrifugé 5 min à 13000g. Le surnageant est de nouveau transféré dans un microtube de 2mL dans lequel on ajoute 1mL de Binding Matrix resuspendu au préalable (contient des billes de

silice où les acides nucléiques viendront se fixer). Le tube est mélangé par retournement pendant 2 min puis laisser 3 min au repos. 500µL sont prélevés du surnageant et le reste est resuspendu dans le tube. 700µL sont transférés sur une colonne avec filtre et le tout est centrifugé 1 min à 13000g. Le tube collecteur est vidé et le reste du mélange est transféré sur la colonne et centrifugé 1 min à 13000g. Ensuite, 500µL de SEW-M, dilué dans le l'éthanol, sont ajouté dans la colonne et resuspendus avec les billes de silice avant d'être centrifugé 1 min à 13000g (permet de solubiliser les protéines). Le tube collecteur est vidé et la colonne est centrifugée une nouvelle fois 2 min à 13000g.

Le tube collecteur est changé et la colonne est laissée à sécher à l'air libre 5 min avant d'être resuspendue dans 75µL d'eau ultra-pure. La colonne est centrifugée 1min à 13000g et le filtre est jeté. Le tube collecteur contenant l'ADN élué est conservé à -20°C pour des PCR ultérieures.

IV. PCR temps réel

Pour connaître le nombre de bactéries présentes dans les eaux de lavages celles restées accrochées sur la feuille de laitue, une recherche du gène *uidA*, codant la β-D-Glucuronidase, présente en monocopie sur le chromosome bactérien de *E.coil* est effectuée.

Pour cela des dilutions successives au 1/10^e de DH5αMCR à des concentrations connues sont utilisées pour réaliser une gamme étalon. Les ADN des échantillons sont également dilués jusqu'à 10⁻² pour éviter de possibles inhibitions.

Les PCR sont réalisées sur 5µL d'ADN extrait dans un volume final de 45µL avec 0.2µM d'amorces et 1X de la GoTaq PCR Master Mix (Promega, France). Le programme PCR comporte une dénaturation initiale de 2 min à 95°C suivi de 50 cycle de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. Enfin une élongation finale est réalisée pendant 2 min à 72°C (Chromo 4, BioRad).

D. Evaluation microbiologique en champs

I. Préparation des échantillons

Les laitues sont appariées deux à deux au hasard pour former un échantillon. Elles sont ensuite effeuillées pour séparer le cœur de la laitue Pommée des feuilles externes, appelées jupe. Toutes les feuilles et le cœur sont découpés en petits morceaux de 1 à 2 cm à l'aide d'un

scalpel stérile. Les jupes des deux salades sont mélangées à la main de façon homogène et la même chose est réalisée avec le cœur. Puis 12,5g de jupe et 12,5g de cœur sont pesés et insérés dans un sac stomacher avec filtre (Seward, Angleterre) constituant un échantillon de 25g. Pour un même échantillon 4 sacs stomacher sont réalisés pour permettre les différentes analyses microbiologiques.

II. Recherche de pathogènes sur laitues

1. Enrichissement

a. Salmonella spp

Au sac stomacher de 25g d'échantillons sont ajoutés 225mL d'Eau Peptonée Tamponnée (Condalab, Pranodisa, Espagne) supplémentée avec une capsule de Rapid'*Salmonella* (BioRad) pour réaliser une dilution au 1/10^e de l'échantillon. Le sac est passé dans un broyeur-malaxeur (Stomacher 400 Circulator, Seward, Angleterre) durant 1 min à 230 rpm. Le sac est ensuite incubé 24h à 41,5°C.

Des isollements à l'anse 10µL sont par la suite réalisés sur milieu Rapid'*Salmonella* pour obtenir des bactéries cultivables si présence. En parallèle 100µL du sac stomacher sont ajoutés à 900µL d'Eau peptonée tamponnée et incubés à 37°C durant 5h pour un second enrichissement. Puis une extraction d'ADN est réalisée.

b. STEC

Au sac stomacher contenant 25g d'échantillon sont ajoutés 225mL de milieu SEB (BioRad), milieu spécifique STEC. Le sac est passé dans un broyeur-malaxeur 1 min à 230 rpm. Le sac est incubé 24h à 41.5°C puis une extraction d'ADN est réalisée.

2. Extraction d'ADN

a. Salmonella spp

Les ADN sont extraits selon le protocole Standard II du kit IQ-Check *Salmonella* II (BioRad). Les 1 mL du second enrichissement sont introduit dans un microtube et centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est enlevé et 200µL de réactif de lyse A sont ajoutés au culot. Les tubes sont agités par retournement pendant 3 min puis incubés au bain-marie à 97°C pendant 10 min. Après un passage au vortex, les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min. Enfin 50µL du surnageant, contenant l'ADN sont conservé à -20°C pour réaliser des PCR.

b. STEC

Les ADN sont extraits selon le protocole Easy I du kit IQ-Check STEC VirX (BioRad). A 100µL d'enrichissement sont ajouté 100µL du réactif de lyse A dans un microtube puis incubés à 97°C pendant 10 min au bain marie. Après un passage au vortex, les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min. 50µL du surnageant sont transférés dans un nouveau tube et congelés à -20°C.

3. PCR

Les PCR sont effectués en suivant les recommandations des kits IQ-Check. Le programme PCR pour *Salmonella* et STEC sont les même et peuvent être effectués en même temps.

Pour *Salmonella*, le mix PCR est composé de 40µL de la solution d'amplification (réactif C) et de 5µL des sondes fluorescentes (réactif B) par échantillon plus 5µL d'échantillon pour un volume final de 50µL.

Pour les STEC, le mix PCR contient 15µL de solutions d'amplification (réactif C) et 5µL de sonde fluorescente (réactif B) par échantillon avec 5µL d'échantillon pour un volume final de 25µL.

La PCR possède une phase de dénaturation initiale de 10 min à 95°C, puis de 49 cycles avec 15 sec à 95°C, 20 sec à 58°C et 30 sec à 72°C.

III. Recherche de *E.coli* sur laitues

Au 25g d'échantillons contenu dans le sac stomacher sont ajoutés 225mL de Tryptone Sel (Condalab, Pranodisa, Espagne). Le sac est passé dans un broyeur-malaxeur 1 min à 230 rpm. Des numérations de 1mL et 100µL du sac (correspondant en réalité aux dilutions 10^{-1} et 10^{-2}) sont effectuées sur milieu gélosé Rapid'*E.coli* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette). Les boites sont incubées 24h à 44°C pour obtenir les *E.coli* et les Coliformes Totaux.

IV. Analyses de l'eau d'irrigation

L'eau du bassin de réserve non couvert du site D a été prélevée à 3 endroits différents à l'aide d'un seau propre et stockée dans des bouteilles de 1L stériles. Un volume de 60mL et de 10mL d'eau est ensuite filtré sur filtre 0,45µM (Millipore) et les filtres sont déposés sur des milieux gélosé Rapid'*E.coli* avec supplément spécifique pour le contrôle de l'eau (Bio-Rad) pour la recherche de *E.coli* et sur milieux gélosé Rapid'*Salmonella* pour la recherche du pathogène. Les boites sont incubées 24h à 37°C.

Références

A

- Agrobio-Bretagne (2009) Fiches Techniques du réseau GAB/FRAB. <https://www.agrobio-bretagne.org/wp-content/uploads/2010/09/Laitue.pdf>. Accessed 9 May 2019
- Aihara E, Closson C, Matthis AL, Schumacher MA, Engevik AC, Zavros Y, Ottemann KM, Montrose MH (2014) Motility and Chemotaxis Mediate the Preferential Colonization of Gastric Injury Sites by *Helicobacter pylori*. *PLOS Pathogens* 10:e1004275
- Alcántar-Curiel MD, Ledezma-Escalante CA, Jarillo-Quijada MD, Gayosso-Vázquez C, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Cedillo-Ramírez ML, Santos-Preciado JI, Girón JA (2018) Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed Research International*
- Al-Kharousi ZS, Guizani N, Al-Sadi A, Al-Bulushi I (2018) Fresh fruit and vegetable bacteria: Diversity, antibiotic resistance and their possible contribution to gut microbiota. *Fruit and Vegetable Consumption and Health: New Research* 39–66
- Alonso A, Sánchez P, Martínez JL (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* 3:1–9
- Amel BK-N, Amine B, Amina B (2008) Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiological Research* 163:323–328
- Amézquita-López BA, Soto-Beltrán M, Lee BG, Yambao JC, Quiñones B (2018) Isolation, genotyping and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 51:425–434
- Anders N, Hansen Lars H., Sørensen Søren J. (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:2275–2289
- Anwar E, Goldberg E, Fraser A, Acosta CJ, Paul M, Leibovici L (2014) Vaccines for preventing typhoid fever (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD001261
- APABA Bio-Aveyron (2017) Fiche technique production plein champ laitue. <http://www.aveyron-bio.fr/fr/produisez-bio/documents/Fiche-technique-Laitue-Web.pdf>. Accessed 9 May 2019
- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M (1995) A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:1612–1615
- Araújo S, A.T. Silva I, Tacão M, Patinha C, Alves A, Henriques I (2017) Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. *International Journal of Food Microbiology* 257:192–200

- Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L (2018) Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology* 16:397
- Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG (1996) Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews* 18:29–51
- Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P (1993) Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology* 175:117–127
- Aubry P, Gaüzère B-A (2018) Les Salmonelloses. <http://medecinetropicale.free.fr/cours/salmonellose.pdf>. Accessed 10 May 2019
- Avery LM, Hill P, Killham K, Jones DL (2004a) *Escherichia coli* O157 survival following the surface and sub-surface application of human pathogen contaminated organic waste to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36:2101–2103
- Avery LM, Killham K, Jones DL (2005) Survival of *E. coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *Journal of Applied Microbiology* 98:814–822
- Avery SM, Moore A, Hutchison ML (2004b) Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Letters in Applied Microbiology* 38:355–359
- Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD (2018) Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *Journal of Bacteriology* 200:e00249-18

B

- Banu H, Prasad KP (2017) Role of Plasmids in Microbiology. *Journal of Aquaculture Research & Development* 08:466
- Baquero F, Martínez J-L, Cantón R (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 19:260–265
- Barak JD, Kramer LC, Hao L (2011) Colonization of Tomato Plants by *Salmonella enterica* Is Cultivar Dependent, and Type 1 Trichomes Are Preferred Colonization Sites. *Applied and Environmental Microbiology* 77:498–504
- Barak JD, Liang AS (2008) Role of Soil, Crop Debris, and a Plant Pathogen in *Salmonella enterica* Contamination of Tomato Plants. *Plos One* 3:e1657
- Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK (2002) Genomic and Functional Analyses of SXT, an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 184:4259–4269

- Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G (2014) Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 38:720–760
- Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G (2009) Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 191:2764–2775
- Benjamin L, Atwill ER, Jay-Russell M, Cooley M, Carychao D, Gorski L, Mandrell RE (2013) Occurrence of generic *Escherichia coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast. *International Journal of Food Microbiology* 165:65–76
- Berg RD (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4:430–435
- Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun YV (2015) Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiology Spectrum* 3:4
- Berne C, Ellison CK, Ducret A, Brun YV (2018) Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nature Reviews Microbiology* 16:616
- Besnard V, Federighi M, Declercq E, Jugiau F, Cappelier J-M (2002) Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Research* 33:359–370
- Besser JM (2018) *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology* 71:55–59
- Beuchat LR (2002) Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* 4:413–423
- Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2483–2488
- Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K (2004) Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Human Patients in Germany over a 3-Year Period. *Journal of Clinical Microbiology* 42:1099–1108
- Bi, S., & Sourjik, V. (2018). Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Current opinion in microbiology*, 45, 22-29
- Biskri L, Mazel D (2003) Erythromycin Esterase Gene *ere(A)* Is Located in a Functional Gene Cassette in an Unusual Class 2 Integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:3326–3331
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 13:42–51

- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J (2004) Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (*eae-ξ*). *Journal of Clinical Microbiology* 42:645–651
- Böltner D, MacMahon C, Pembroke JT, Strike P, Osborn AM (2002) R391: a Conjugative Integrating Mosaic Comprised of Phage, Plasmid, and Transposon Elements. *Journal of Bacteriology* 184:5158–5169
- Bolton DJ (2015) *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology* 48:99–108
- Borruso L, Harms K, Johnsen PJ, Nielsen KM, Brusetti L (2016) Distribution of class 1 integrons in a highly impacted catchment. *Science of The Total Environment* 566–567:1588–1594
- Botelho J, Grosso F, Peixe L (2017) Characterization of the pJB12 Plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* Reveals Tn6352, a Novel Putative Transposon Associated with Mobilization of the blaVIM-2-Harboring In58 Integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61:e02532-16
- Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW (2007) Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in Microbiology* 15:301–309
- Brandl MT (2008) Plant Lesions Promote the Rapid Multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on Postharvest Lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5285–5289
- Brandl MT, Amundson R (2008) Leaf Age as a Risk Factor in Contamination of Lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2298–2306
- Brandl MT, Mandrell RE (2002) Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the Cilantro Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3614–3621
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000) *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2465–2467
- Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M (2015) Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* 79:1–7
- Burch TR, Sadowsky MJ, LaPara TM (2014) Fate of Antibiotic Resistance Genes and Class 1 Integrons in Soil Microcosms Following the Application of Treated Residual Municipal Wastewater Solids. *Environmental Science and Technology* 48:5620–5627
- Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Blattner FR, Sofia HJ (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Research* 26:4196–4204
- Burrus V (2017) Mechanisms of stabilization of integrative and conjugative elements. *Current Opinion in Microbiology* 38:44–50

- Burrus V, Marrero J, Waldor MK (2006) The current ICE age: Biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* 55:173–183
- Bush K (2013) The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy* 19:549–559
- Bush K, Jacoby GA (2010) Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54:969–976

C

- Callejón RM, Rodríguez-Naranjo MI, Ubeda C, Hornedo-Ortega R, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM (2015) Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease* 12:32–38
- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA (2001) Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 104:901–912
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* 63:219–228
- Carroll AC, Wong A (2018) Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Canadian Journal of Microbiology* 64:293–304
- Cassels F, Wolf M (1995) Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *Journal of Industrial Microbiology* 15:214–226
- Chaban B, Hughes HV, Beeby M (2015) The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 46:91–103
- Chakrabarty AM (1976) Plasmids in *Pseudomonas*. *Annual Review of Genetics* 10:7–30
- Chakraborty S, Mizusaki H, Kenney LJ (2015) A FRET-Based DNA Biosensor Tracks OmpR-Dependent Acidification of *Salmonella* during Macrophage Infection. *PLoS Biology* 13:4
- Chambre d'Agriculture Languedoc-Roussillon (2012) La Salade de plein champs: Eléments techniques et économiques pour les zones de montagne sèche du Languedoc-Roussillon. https://occitanie.chambre-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/National/FAL_commun/publications/Occitanie/FTE_salade_2012.pdf. Accessed 9 May 2019
- Chandler M, Mahillon J (2002) Insertion Sequences Revisited. *Mobile DNA II* 305–366
- Chase-Topping ME, McKendrick IJ, Pearce MC, MacDonald P, Matthews L, Halliday J, Allison L, Fenlon D, Low JC, Gunn G, Woolhouse MEJ (2007) Risk Factors for the Presence of High-

- Level Shedders of *Escherichia coli* O157 on Scottish Farms. *Journal of Clinical Microbiology* 45:1594–1603
- Cheng Q, Paszkiet BJ, Shoemaker NB, Gardner JF, Salyers AA (2000) Integration and Excision of a *Bacteroides* Conjugative Transposon, CTnDOT. *Journal of Bacteriology* 182:4035–4043
- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB (2007) Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology & Cell Biology* 85:112–118
- Colavecchio A, Cadieux B, Lo A, Goodridge LD (2017) Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family – A Review. *Frontiers in Microbiology* 8:1108
- Collis CM, Kim M-J, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM (2002) Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines. *Journal of Bacteriology* 184:3017–3026
- Comité de l'antibiogramme de la SFM (2018) Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Recommandations 2018. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2018/12/CASFMV2_SEPTEMBRE2018.pdf. Accessed 9 May 2019
- Conrad A, Kontro M, Keinänen MM, Cadoret A, Faure P, Mansuy-Huault L, Block J-C (2003) Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38:1093–1105
- Cook KL, Bolster CH (2007) Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 103:573–583
- Cooley M, Carychao D, Crawford-Miksza L, Jay MT, Myers C, Rose C, Keys C, Farrar J, Mandrell RE (2007) Incidence and Tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a Major Produce Production Region in California. *PLOS ONE* 2:e1159
- Cooley MB, Chao D, Mandrell RE (2006) *Escherichia coli* O157:H7 Survival and Growth on Lettuce Is Altered by the Presence of Epiphytic Bacteria. *Journal of Food Protection* 69:2329–2335
- Cooley MB, Miller WG, Mandrell RE (2003) Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4915–4926
- Cools D, Merckx R, Vlassak K, Verhaegen J (2001) Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology* 17:53–62
- Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, Mendo S, Duarte A (2003) Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:2838–2843

- Cosgrove DC, Jarvis M (2012) Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science* 3:204
- Côté C, Quessy S (2005) Persistence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in Surface Soil following Application of Liquid Hog Manure for Production of Pickling Cucumbers. *Journal of Food Protection* 68:900–905
- Craig L, Volkmann N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH, Tainer JA (2006) Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions. *Molecular Cell* 23:651–662
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822-880.

D

- Dang B, Mao D, Xu Y, Luo Y (2017) Conjugative multi-resistant plasmids in Haihe River and their impacts on the abundance and spatial distribution of antibiotic resistance genes. *Water Research* 111:81–91
- Davison J (1999) Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid* 42:73–91
- DeBenedictis EP, Liu J, Keten S (2016) Adhesion mechanisms of curli subunit CsgA to abiotic surfaces. *Science Advances* 2:e1600998
- Deering AJ, Mauer LJ, Pruitt RE (2012) Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International* 45:567–575
- Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, Pradervand N, van der Meer JR (2017) The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiology Reviews* 41:512–537
- Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P (2007) Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clinical Microbiology Reviews* 20:79–114
- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 13:222–235
- Dinu L-D, Bach S (2011) Induction of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the Phyllosphere of Lettuce: a Food Safety Risk Factor. *Applied and Environmental Microbiology* 77:8295–8302
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 2:414
- Dong Y, Iniguez AL, Ahmer BMM, Triplett EW (2003) Kinetics and Strain Specificity of Rhizosphere and Endophytic Colonization by Enteric Bacteria on Seedlings of *Medicago*

- sativa and *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1783–1790
- Dönhöfer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN (2012) Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 109:16900-16905
- Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8:881–890
- Donlan RM (2000) Role of Biofilms in Antimicrobial Resistance. *ASAIO Journal* 46:S47
- Driouich A, Durand C, Vicré-Gibouin M (2007) Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* 12:14–19
- Driouich A, Follet-Gueye M-L, Vicré-Gibouin M, Hawes M (2013) Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* 16:489–495
- Driouich A, Smith C, Ropitiaux M, Chambard M, Boulogne I, Bernard S, Follet-Gueye M-L, Vicré M, Conly J (2019) Root extracellular traps versus neutrophil extracellular traps in host defence, a case of functional convergence ? *Biological Reviews* (In press)

E

- Edelstein M, Sundborger C, Hergens M-P, Ivarsson S, Dryselius R, Insulander M, Jernberg C, Hutin Y, Wallensten A (2014) Barriers to Trace-back in a Salad-associated EHEC Outbreak, Sweden, June 2013. *PLoS Currents* 6.
- Eliopoulos GM, Huovinen P (2001) Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases* 32:1608–1614
- Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *European Journal of Biochemistry* 171:45–50
- Erickson MC, Liao J-Y, Payton AS, Cook PW, Den Bakker HC, Bautista J, Pérez JCD (2018) Fate of enteric pathogens in different spinach cultivars cultivated in growth chamber and field systems. *Food Quality and Safety* 2:221–228
- Erickson MC, Liao J-Y, Payton AS, Cook PW, Ortega YR (2019) Survival and internalization of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 sprayed onto different cabbage cultivars during cultivation in growth chambers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99:3530–3537

F

- Fang FC, Fierer J (1991) Human infection with *Salmonella dublin*. *Medicine (Baltimore)* 70:198–207
- Fernández L, Hancock REW (2012) Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 25:661–681
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623–633
- Flensburg J, Sköld O (1987) Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *European Journal of Biochemistry* 162:473–476
- Flores Ribeiro A, Laroche E, Hanin G, Fournier M, Quillet L, Dupont J-P, Pawlak B (2012) Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in karstic systems: a biological indicator of the origin of fecal contamination? *FEMS Microbiology Ecology* 81:267–280
- Floss HG, Yu T-W (2005) Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chemical Reviews* 105:621–632
- Fluit AC, Schmitz F-J (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection* 10:272–288
- Foght JM, Westlake DWS (1996) Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-borne genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Biodegradation* 7:353–366
- Fonseca JM, Fallon SD, Sanchez CA, Nolte KD (2011) *Escherichia coli* survival in lettuce fields following its introduction through different irrigation systems. *Journal of Applied Microbiology* 110:893–902
- Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews* 28:79–100
- Franz E, Bruggen AHC van (2008) Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the Primary Vegetable Production Chain. *Critical Reviews in Microbiology* 34:143–161
- Franz E, Diepeningen AD van, Vos OJ de, Bruggen AHC van (2005) Effects of Cattle Feeding Regimen and Soil Management Type on the Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Manure, Manure-Amended Soil, and Lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6165–6174
- Friedlander RS, Vlamakis H, Kim P, Khan M, Kolter R, Aizenberg J (2013) Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:5624–5629

- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W-L, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H (2002) Escherichia coli Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *The Journal of Infectious Diseases* 185:74–84
- Fronzes R, Remaut H, Waksman G (2008) Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO Journal* 27:2271–2280
- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3:722–732

G

- Gao H, Zhang L, Lu Z, He C, Li Q, Na G (2017) Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments. *Environmental Pollution* 232:1–9
- Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F (2011) Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews* 35:936–956
- Gaze WH, Zhang L, Abdousslam NA, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, Brown H, Davis S, Kay P, Boxall ABA, Wellington EMH (2011) Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *The ISME Journal* 5:1253–1261
- Généreux M, Breton MJ, Fairbrother JM, Fravallo P, Côté C (2015) Persistence of Indicator and Pathogenic Microorganisms in Broccoli following Manure Spreading and Irrigation with Fecally Contaminated Water: Field Experiment. *Journal of Food Protection* 78:1776–1784
- Ghigo J-M (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412:442–445
- Gillings MR (2014) Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78:257–277
- Gillings MR (2017) Class 1 integrons as invasive species. *Current Opinion in Microbiology* 38:10–15
- Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu Y-G (2015) Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9:1269–1279
- Golberg D, Kroupitski Y, Belausov E, Pinto R, Sela S (2011) Salmonella Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology* 145:250–257
- Gothwal R, Shashidhar T (2015) Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *CLEAN – Soil, Air, Water* 43:479–489

- Griffin PM, Tauxe RV (1991) The Epidemiology of Infections Caused by Escherichia coli O157: H7, Other Enterohemorrhagic E. coli, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiologic Reviews* 13:60–98
- Gulig PA, Doyle TJ (1993) The Salmonella typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infection and Immunity* 61:504–511
- Gunasekera TS, Sørensen A, Attfield PV, Sørensen SJ, Veal DA (2002) Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1988–1993
- Gunathilaka GU, Tahlan V, Mafiz AI, Polur M, Zhang Y (2017) Phages in urban wastewater have the potential to disseminate antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 50:678–683
- Guo X, Chen J, Brackett RE, Beuchat LR (2001) Survival of Salmonellae on and in Tomato Plants from the Time of Inoculation at Flowering and Early Stages of Fruit Development through Fruit Ripening. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4760–4764
- Gyles CL (2007) Shiga toxin-producing Escherichia coli: An overview. *Journal of Animal Science* 85:E45–E62

H

- Hada HS, Sizemore RK (1981) Incidence of Plasmids in Marine Vibrio spp. Isolated from an Oil Field in the Northwestern Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 41:199–202
- Hall BG, Barlow M (2005) Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55:1050–1051
- Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW (1994) Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *Journal of Bacteriology* 176:6286–6294
- Haneda T, Ishii Y, Shimizu H, Ohshima K, Iida N, Danbara H, Okada N (2012) Salmonella type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. *Cellular Microbiology* 14:485–499
- Haniford DB, Ellis MJ (2015) Transposons Tn10 and Tn5. *Mobile DNA III* 631–645
- Hanssen A-M, Ericson Sollid JU (2006) SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46:8–20
- Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH (2002) IntI2 Integron Integrase in Tn7. *Journal of Bacteriology* 184:1712–1721

- Harris LJ, Farber JN, Beuchat LR, Parish ME, Suslow TV, Garrett EH, Busta FF (2003) Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:78–141
- Harrison E, Brockhurst MA (2012) Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends in Microbiology* 20:262–267
- Harshey RM (2003) Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annual Review of Microbiology* 57:249–273
- Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G (2003) Root Caps and Rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* 21:352–367
- Hawes MC, Smith LY (1989) Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants. *Journal of Bacteriology* 171:5668–5671
- Heaton JC, Jones K (2008) Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology* 104:613–626
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews* 36:478–503
- Hess TF, Grdzlishvili I, Sheng H, Hovde CJ (2004) Heat Inactivation of *E. coli* During Manure Composting. *Compost Science & Utilization* 12:314–322
- Heuer H, Smalla K (2007) Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research* 6:3–13
- Hirneisen KA, Sharma M, Kniel KE (2012) Human Enteric Pathogen Internalization by Root Uptake into Food Crops. *Foodborne Pathogens and Disease* 9:396–405
- Holley RA, Arrus KM, Ominski KH, Tenuta M, Blank G (2006) Salmonella Survival in Manure-Treated Soils during Simulated Seasonal Temperature Exposure. *Journal of Environmental Quality* 35:1170–1180
- Holvoet K, Sampers I, Callens B, Dewulf J, Uyttendaele M (2013) Moderate Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Lettuce, Irrigation Water, and Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79:6677–6683
- Holvoet K, Sampers I, Seynaeve M, Jacxsens L, Uyttendaele M (2015) Agricultural and Management Practices and Bacterial Contamination in Greenhouse versus Open Field Lettuce Production. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12:32–63
- Hooper DC (2002) Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *The Lancet Infectious Diseases* 2:530–538

Hori K, Matsumoto S (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* 48:424–434

Hunter PJ, Hand P, Pink D, Whipps JM, Bending GD (2010) Both Leaf Properties and Microbe-Microbe Interactions Influence Within-Species Variation in Bacterial Population Diversity and Structure in the Lettuce (*Lactuca Species*) Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 76:8117–8125

Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M (2014) Salmonella–Host Interactions – Modulation of the Host Innate Immune System. *Frontiers in Immunology* 5:481

I

Ibrahim GM, Morin PM (2018) Salmonella Serotyping Using Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology* 9:2993

Ilyas B, Tsai CN, Coombes BK (2017) Evolution of Salmonella-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:428

Institut de Veille Sanitaire (2019a) InVS TIAC. In: InVS. <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Toxi-infections-alimentaires-collectives>. Accessed 7 Jan 2019

Institut de Veille Sanitaire (2019b) InVS SHU. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Syndrome-hemolytique-et-uremique/Donnees-epidemiologiques-du-SHU-chez-l-enfant-age-de-moins-de-15-ans-en-France>. Accessed 8 Jan 2019

Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ (2006) Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Applied and Environmental Microbiology* 72:612–621

Ishii S, Sadowsky MJ (2008) *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes and Environments* 23:101–108

J

Jacoby GA (2009) AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 22:161–182

Jang H, Matthews KR (2018) Survival and interaction of *Escherichia coli* O104:H4 on *Arabidopsis thaliana* and lettuce (*Lactuca sativa*) in comparison to *E. coli* O157:H7: Influence of plant defense response and bacterial capsular polysaccharide. *Food Research International* 108:35–41

- Jean S-S, Wang J-Y, Hsueh P-R (2006) Bacteremia caused by *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis in Taiwan. *Journal of Microbiology Immunology and Infection* 39:358–365
- Jensen DA, Friedrich LM, Harris LJ, Danyluk MD, Schaffner DW (2015) Cross contamination of *Escherichia coli* O157:H7 between lettuce and wash water during home-scale washing. *Food Microbiology* 46:428–433
- Jiang X, Morgan J, Doyle MP (2002) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Manure-Amended Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2605–2609
- Jo SH, Park JM (2019) The dark side of organic vegetables: interactions of human enteropathogenic bacteria with plants. *Plant Biotechnology Reports* 13:105–110
- Johnson TJ, Nolan LK (2009) Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73:750–774
- Jones-Dias D, Manageiro V, Ferreira E, Barreiro P, Vieira L, Moura IB, Caniça M (2016) Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. *Frontiers in Microbiology* 7:1400
- Journal Officiel de l'Union européenne (2005) Règlement (CE) n o 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
- Journal Officiel de l'Union européenne (2007) Règlement (CE) n° 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
- Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 33:376–393

K

- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2:123–140
- Kapoor G, Saigal S, Elongavan A (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology* 33:300–305
- Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Viridi JS, Gulati P (2018) Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* 51:167–176

- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 8:634–644
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Cell* 91:511–520
- Klerks MM, Franz E, van Gent-Pelzer M, Zijlstra C, van Bruggen AHC (2007a) Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME Journal* 1:620–631
- Klerks MM, Gent-Pelzer M van, Franz E, Zijlstra C, Bruggen AHC van (2007b) Physiological and Molecular Responses of *Lactuca sativa* to Colonization by *Salmonella enterica* Serovar Dublin. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4905–4914
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8:423–435
- Kovačić A, Huljev Ž, Sušić E (2017) Ground water as the source of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Epidemiology and Global Health* 7:181–184
- Kozak GK, MacDONALD D, Landry L, Farber JM (2013) Foodborne Outbreaks in Canada Linked to Produce: 2001 through 2009. *Journal of Food Protection* 76:173–183
- Kroupitski Y, Golberg D, Belausov E, Pinto R, Swartzberg D, Granot D, Sela S (2009a) Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves Is Induced by Light and Involves Chemotaxis and Penetration through Open Stomata. *Applied and Environmental Microbiology* 75:6076–6086
- Kroupitski Y, Pinto R, Brandl M t., Belausov E, Sela S (2009b) Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology* 106:1876–1885
- Kumar A, Verma JP (2018) Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiological Research* 207:41–52
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *The Plant Cell* 16:3496–3507
- Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB (2017) *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology Letters* 190:42–50

L

- Labbate M, Chowdhury PR, Stokes HW (2008) A Class 1 Integron Present in a Human Commensal Has a Hybrid Transposition Module Compared to Tn402: Evidence of

- Interaction with Mobile DNA from Natural Environments. *Journal of Bacteriology* 190:5318–5327
- Lang NL, Smith SR (2007) Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *Journal of Applied Microbiology* 103:2122–2131
- Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F (2009) Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology* 68:118–130
- Laroche E, Petit F, Fournier M, Pawlak B (2010) Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology* 392:12–21
- Laroche-Ajzenberg E, Ribeiro AF, Bodilis J, Riah W, Buquet S, Chaftar N, Pawlak B (2014) Conjugative multiple-antibiotic resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from environmental waters contaminated by human faecal wastes. *Journal of Applied Microbiology* 118:399–411
- Larsson DGJ, Andreumont A, Bengtsson-Palme J, Brandt KK, de Roda Husman AM, Fagerstedt P, Fick J, Flach C-F, Gaze WH, Kuroda M, Kvint K, Laxminarayan R, Manaia CM, Nielsen KM, Plant L, Ploy M-C, Segovia C, Simonet P, Smalla K, Snape J, Topp E, van Hengel AJ, Verner-Jeffreys DW, Virta MPJ, Wellington EM, Wernersson A-S (2018) Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment International* 117:132–138
- Leclercq R (2002) Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* 34:482–492
- Lee CM, Lin TY, Lin C-C, Kohbodi GA, Bhatt A, Lee R, Jay JA (2006) Persistence of fecal indicator bacteria in Santa Monica Bay beach sediments. *Water Research* 40:2593–2602
- Lee H-W, Koh YM, Kim J, Lee J-C, Lee Y-C, Seol S-Y, Cho D-T, Kim J (2008) Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology and Infection* 14:49–54
- Levin DA (1973) The Role of Trichomes in Plant Defense. *The Quarterly Review of Biology* 48:3–15
- Li W, Atkinson GC, Thakor NS, Allas Ü, Lu C, Chan K-Y, Tenson T, Schulten K, Wilson KS, Hauryliuk V, Frank J (2013) Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications* 4:1477
- Liebert CA, Hall RM, Summers AO (1999) Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:507–522
- Lim J-A, Lee DH, Heu S (2014) The Interaction of Human Enteric Pathogens with Plants. *The Plant Pathology Journal* 30:109–116

- Liu D, Cui Y, Walcott R, Chen J (2018) Fate of *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Cells Artificially Internalized into Vegetable Seeds during Germination. *Applied and Environmental Microbiology* 84:e01888-17
- Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., ... & Hashsham, S. A. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1691-1696.
- Lopatkin AJ, Meredith HR, Srimani JK, Pfeiffer C, Durrett R, You L (2017) Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nature Communications* 8:1689
- López-Gálvez F, Gil MI, Allende A (2018) Impact of relative humidity, inoculum carrier and size, and native microbiota on *Salmonella ser. Typhimurium* survival in baby lettuce. *Food Microbiology* 70:155–161
- Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW (2009) The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology & Infection* 137:307–315

M

- Makino S-I, Kii T, Asakura H, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, Itoh K (2000) Does Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Enter the Viable but Nonculturable State in Salted Salmon Roe? *Applied and Environmental Microbiology* 66:5536–5539
- Manaia CM (2017) Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. *Trends in Microbiology* 25:173–181
- Marder EP, Garman KN, Ingram LA, Dunn JR (2014) Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Bagged Salad. *Foodborne Pathogens and Disease* 11:593–595
- Martínez-Vaz BM, Fink RC, Diez-Gonzalez F, Sadowsky MJ (2014) Enteric Pathogen-Plant Interactions: Molecular Connections Leading to Colonization and Growth and Implications for Food Safety. *Microbes and Environments* ME13139
- Mazel D (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* 4:608–620
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10:39–50

- McMurry L, Petrucci RE, Levy SB (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77:3974–3977
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* 126:969–980
- Meng F, Altier C, Martin GB (2013) Salmonella colonization activates the plant immune system and benefits from association with plant pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* 15:2418–2430
- Merlin C, Toussaint A (1999) Les éléments transposables bactériens. *médecine/sciences* 15:l
- Merritt PM, Danhorn T, Fuqua C (2007) Motility and Chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* Surface Attachment and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* 189:8005–8014
- Merz AJ, So M, Sheetz MP (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407:98
- Millan AS, Escudero JA, Gifford DR, Mazel D, MacLean RC (2016) Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature Ecology & Evolution* 1:0010
- Millan AS, MacLean RC (2017) Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiology Spectrum* 5:5
- Miller WR, Munita JM, Arias CA (2014) Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 12:1221–1236
- Minamino T, Imada K (2015) The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends in Microbiology* 23:267–274
- Mizunoe Y, Wai SN, Takade A, Yoshida S (1999) Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂-degrading compounds. *Archives of Microbiology* 172:63–67
- Moghaddam TK, Zhang J, Du G (2017) Pre-cold stress increases acid stress resistance and induces amino acid homeostasis in *Lactococcus lactis* NZ9000. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 16:1357-1363
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11:266–277
- Mokhtari A, Oryang D, Chen Y, Pouillot R, Doren JV (2018) A Mathematical Model for Pathogen Cross-Contamination Dynamics during the Postharvest Processing of Leafy Greens. *Risk Analysis* 38:1718–1737
- Morehead MS, Scarbrough C (2018) Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 45:467–484

Muela A, Seco C, Camafeita E, Arana I, Orruño M, López JA, Barcina I (2008) Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology* 64:28–36

Munita JM, Arias CA (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* 4:2

N

Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:142–201

Newitt S, MacGregor V, Robbins V, Bayliss L, Chattaway MA, Dallman T, Ready D, Aird H, Puleston R, Hawker J (2016) Two Linked Enteroinvasive *Escherichia coli* Outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. *Emerging Infectious Diseases* 22:1178–1184

Nguema-Ona E, Moore JP, Fagerström AD, Fangel JU, Willats WG, Hugo A, Vivier MA (2013) Overexpression of the grapevine PGIP1 in tobacco results in compositional changes in the leaf arabinoxyloglucan network in the absence of fungal infection. *BMC Plant Biology* 13:46

Nguema-Ona E, Vické-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, Driouich A (2014) Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in Plant Science* 5:499

Nielsen EM, Scheutz F, Torpdahl M (2006) Continuous Surveillance of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Shows That Most Infections Are Sporadic. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:81–87

Nikaido H (2003) Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593–656 . doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003

Nogales J, García JL, Díaz E (2017) Degradation of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*: A Systems Biology View. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids* 1–49

Novick RP (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews* 51:381–395

Nyberg KA, Andersson GM, Elving J (2019) Long-term survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in cowpats on pasture. *Journal of Applied Microbiology* 126:651–660

O

- O'Flaherty E, Cummins E (2017) Antibiotic resistance in surface water ecosystems: Presence in the aquatic environment, prevention strategies, and risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 23:299–322
- O'Flaherty E, Solimini A, Pantanella F, Cummins E (2019a) The potential human exposure to antibiotic resistant-*Escherichia coli* through recreational water. *Science of The Total Environment* 650:786–795
- O'Flaherty E, Solimini AG, Pantanella F, De Giusti M, Cummins E (2019b) Human exposure to antibiotic resistant-*Escherichia coli* through irrigated lettuce. *Environment International* 122:270–280
- Oh YJ, Hubauer-Brenner M, Gruber HJ, Cui Y, Traxler L, Siligan C, Park S, Hinterdorfer P (2016) Curli mediate bacterial adhesion to fibronectin via tensile multiple bonds. *Scientific Reports* 6:33909
- Oliver JD (2005a) Viable but nonculturable bacteria in food environments. *Food Borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology* 99–112
- Oliver JD (2005b) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology* 43:93–100
- Oliver JD, Dagher M, Linden K (2005) Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *Journal of Water and Health* 3:249–257
- Oliver JD, Hite F, McDougald D, Andon NL, Simpson LM (1995) Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2624–2630
- Omisakin F, MacRae M, Ogden ID, Strachan NJC (2003) Concentration and Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces at Slaughter. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2444–2447
- Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, Pickup RW, Saunders JR (2000) Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology* 146:2267–2275
- Otzen D, Nielsen PH (2008) We find them here, we find them there: Functional bacterial amyloid. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:910–927

P

- Pachepsky Y, Shelton D, Dorner S, Whelan G (2016) Can *E. coli* or thermotolerant coliform concentrations predict pathogen presence or prevalence in irrigation waters? *Critical Reviews in Microbiology* 42:384–393
- Pagès J-M, James CE, Winterhalter M (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6:893–903
- Palmer J, Flint S, Brooks J (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34:577–588
- Papagiannitsis CC, Dolejska M, Izdebski R, Giakkoupi P, Skálová A, Chudějová K, Dobiasova H, Vatopoulos AC, Derde LPG, Bonten MJM, Gniadkowski M, Hrabák J (2016) Characterisation of *IncA/C2* plasmids carrying an *In416*-like integron with the *bla*_{VIM-19} gene from *Klebsiella pneumoniae* ST383 of Greek origin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 47:158–162
- Parkinson JS, Hazelbauer GL, Falke JJ (2015) Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in Microbiology* 23:257–266
- Paton JC, Paton AW (1998) Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 11:450–479
- Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP (2015) Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology* 23:171–178
- Petrova OE, Sauer K (2016) Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology* 30:67–78
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11:789–799
- Piddock LJV (2006) Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 19:382–402
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P (2006) Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell* 124:715–727
- Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vicré-Gibouin M (2013) Deciphering the Responses of Root Border-Like Cells of *Arabidopsis* and Flax to Pathogen-Derived Elicitors. *Plant Physiology* 163:1584–1597
- Ploy M-C, Gassama A, Chainier D, Denis F (2005) Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 20:343–352

- Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P (2016) Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *The Lancet Infectious Diseases* 16:281
- Poole K (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:20–51
- Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30:285–293
- Proia L, Anzil A, Subirats J, Borrego C, Farrè M, Llorca M, Balcázar JL, Servais P (2018) Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. *Science of The Total Environment* 628–629:453–466
- Pruimboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE, Cornick NA, Moon HW (2000) Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:10325–10329

Q

- Qamar FN, Azmatullah A, Kazi AM, Khan E, Zaidi AKM (2014) A three-year review of antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A in Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries* 8:981–986
- Quilliam RS, Williams AP, Jones DL (2012) Lettuce Cultivar Mediates Both Phyllosphere and Rhizosphere Activity of *Escherichia coli* O157:H7. *Plos One* 7:e33842

R

- Radosavljević V, Finke EJ, Belojević G (2016) Analysis of *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany in 2011 Using Differentiation Method for Unusual Epidemiological Events. *Central European Journal of Public Health* 24:9–15
- Ramirez MS, Tolmasky ME (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* 13:151–171
- Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, Prashanth K (2008) Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medical Microbiology* 26:333
- Reynolds PE (1989) Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 8:943–950

- Reznikoff WS (2008) Transposon Tn5. *Annual Review of Genetics* 42:269–286
- Rivers B, Steck TR (2001) Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. *Urological Research* 29:60–66
- Roberson EB, Firestone MK (1992) Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1284–1291
- Roberts AP, Mullany P (2009) A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends in Microbiology* 17:251–258
- Rodríguez I, Martín MC, Mendoza MC, Rodicio MR (2006) Class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*: structure and association with transposons and plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58:1124–1132
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual Á (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy* 17:149–182
- Roe MT, Vega E, Pillai SD (2003) Antimicrobial Resistance Markers of Class 1 and Class 2 Integron-bearing *Escherichia coli* from Irrigation Water and Sediments. *Emerging Infectious Diseases* 9:822–826
- Rosser SJ, Young H-K (1999) Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:11–18
- Rowe-Magnus DA, Mazel D (2002) The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology* 292:115–125
- Roy D, Panchal S, Rosa BA, Melotto M (2013) *Escherichia coli* O157:H7 Induces Stronger Plant Immunity than *Salmonella enterica* Typhimurium SL1344. *Phytopathology* 103:326–332
- Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J (2018) Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73:1121–1137

S

- Sandberg KD, LaPara TM (2016) The fate of antibiotic resistance genes and class 1 integrons following the application of swine and dairy manure to soils. *FEMS Microbiology Ecology* 92:2
- Sandvig K, van Deurs B (1996) Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiological Reviews* 76:949–966

- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA (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
- Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S (2016) Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7:56–66
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61:263–289
- Schlüter A, Szczepanowski R, Pühler A, Top EM (2007) Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiology Reviews* 31:449–477
- Sears CL, Kaper JB (1996) Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiology Reviews* 60:167–215
- Sengupta M, Austin S (2011) Prevalence and Significance of Plasmid Maintenance Functions in the Virulence Plasmids of Pathogenic Bacteria. *Infection and Immunity* 79:2502–2509
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux J-P (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* 5:274
- Sharma M, Millner PD, Hashem F, Camp M, Whyte C, Graham L, Cotton CP (2016) Survival and Persistence of Nonpathogenic *Escherichia coli* and Attenuated *Escherichia coli* O157:H7 in Soils Amended with Animal Manure in a Greenhouse Environment. *Journal of Food Protection* 79:913–921
- Shirron N, Yaron S (2011) Active Suppression of Early Immune Response in Tobacco by the Human Pathogen *Salmonella Typhimurium*. *Plos One* 6:e18855
- Sidhu JPS, Jagals P, Smith A, Toze S (2017) Comparative prevalence of *Escherichia coli* carrying virulence genes and class 1 and 2 integrons in sub-tropical and cool temperate freshwater. *Environmental Science and Pollution Research* 24:18263–18272
- Signoretto C, Lleò M del M, Canepari P (2002) Modification of the Peptidoglycan of *Escherichia coli* in the Viable But Nonculturable State. *Current Microbiology* 44:125–131
- Siguier P, Filée J, Chandler M (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current Opinion in Microbiology* 9:526–531
- Siguier P, Gourgbeyre E, Chandler M (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 38:865–891
- Sinreich M, Pronk M, Kozel R (2014) Microbiological monitoring and classification of karst springs. *Environmental Earth Sciences* 71:563–572
- Skillman LC, Sutherland IW, Jones MV (1998) The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of Applied Microbiology* 85:13S-18S

- Solar G del, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R (1998) Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:434–464
- Solar G del, Hernández-Arriaga AM, Gomis-Rüth FX, Coll M, Espinosa M (2002) A Genetically Economical Family of Plasmid-Encoded Transcriptional Repressors Involved in Control of Plasmid Copy Number. *Journal of Bacteriology* 184:4943–4951
- Sperandio V, Nguyen Y (2012) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:90
- Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C (2012) Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology* 3:119
- Stalder T, Barraud O, Jové T, Casellas M, Gaschet M, Dagot C, Ploy M-C (2014) Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *The ISME Journal* 8:768–777
- Stange C, Sidhu JPS, Tiehm A, Toze S (2016) Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 219:823–831
- Stecher B, Hapfelmeier S, Müller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt W-D (2004) Flagella and Chemotaxis Are Required for Efficient Induction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. *Infection and Immunity* 72:4138–4150
- Steinauer K, Chatzinotas A, Eisenhauer N (2016) Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecology and Evolution* 6:7387–7396
- Sticklen MB (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics* 9:433–443
- Strachan NJC, Fenlon DR, Ogden ID (2001) Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Letters* 203:69–73
- Strawn LK, Fortes ED, Bihn EA, Nightingale KK, Gröhn YT, Worobo RW, Wiedmann M, Bergholz PW (2013) Landscape and Meteorological Factors Affecting Prevalence of Three Food-Borne Pathogens in Fruit and Vegetable Farms. *Applied and Environmental Microbiology* 79:588–600
- Sun F, Chen J, Zhong L, Zhang X, Wang R, Guo Q, Dong Y (2008) Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology Ecology* 64:37–44
- Sundström L, Roy PH, Sköld O (1991) Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *Journal of Bacteriology* 173:3025–3028

T

- Teunis P, Takumi K, Shinagawa K (2004) Dose Response for Infection by *Escherichia coli* O157:H7 from Outbreak Data. *Risk Analysis* 24:401–407
- Thiennimitr P, Winter SE, Bäumler AJ (2012) *Salmonella*, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology* 15:108–114
- Thomas CM (2000) Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiology* 37:485–491
- Thomas CM, Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3:711–721
- Thomas W (2008) Catch Bonds in Adhesion. *Annual Review of Biomedical Engineering* 10:39–57
- Tobe T, Hayashi T, Han C-G, Schoolnik GK, Ohtsubo E, Sasakawa C (1999) Complete DNA Sequence and Structural Analysis of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence Factor Plasmid. *Infection and Immunity* 67:5455–5462
- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR (2006) ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiology and Molecular Biology Review* 70:296–316
- Tyler HL, Triplett EW (2008) Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 46:53–73

U

- Uyttendaele M, Jaykus L-A, Amoah P, Chiodini A, Cunliffe D, Jacxsens L, Holvoet K, Korsten L, Lau M, McClure P, Medema G, Sampers I, Jasti PR (2015) Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14:336–356

V

- Van der Linden I, Cottyn B, Uyttendaele M, Vlaemyneck G, Maes M, Heyndrickx M (2013) Long-term survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on butterhead lettuce seeds, and their subsequent survival and growth on the seedlings. *International Journal of Food Microbiology* 161:214–219

- Van Loosdrecht MCM, Picioreanu C, Heijnen JJ (1997) A more unifying hypothesis for biofilm structures. *FEMS Microbiology Ecology* 24:181–183
- Van Melderen L (2010) Toxin–antitoxin systems: why so many, what for? *Current Opinion in Microbiology* 13:781–785
- van Overbeek LS, van Doorn J, Wichers JH, van Amerongen A, van Roermund HJW, Willemsen PTJ (2014) The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5:104
- Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A, Houdt RV (2017) The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology* 43:709–730
- Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A (2005) Root Border-Like Cells of *Arabidopsis*. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *Plant Physiology* 138:998–1008
- von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolffs PFG (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology* 7:173
- Vorwerk S, Somerville S, Somerville C (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* 9:203–209

W

- Wagi S, Ahmed A (2017) Phyllospheric plant growth promoting bacteria. *Journal of Bacteriology & Mycology* 5:1–2
- Walsh C (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406:775–781
- Wang G, Zhao T, Doyle MP (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2567–2570
- Warriner K, Namvar A (2010) The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. *Current Opinion in Biotechnology* 21:131–136
- Weller DL, Kovac J, Kent DJ, Roof S, Tokman JI, Mudrak E, Kowalczyk B, Oryang D, Aceituno A, Wiedmann M (2017) *Escherichia coli* transfer from simulated wildlife feces to lettuce during foliar irrigation: A field study in the Northeastern United States. *Food Microbiology* 68:24–33

- Williams TR, Marco ML (2014) Phyllosphere Microbiota Composition and Microbial Community Transplantation on Lettuce Plants Grown Indoors. *mBio* 5:e01564-14
- Wozniak RAF, Waldor MK (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology* 8:552–563
- Wright KM, Chapman S, McGeachy K, Humphris S, Campbell E, Toth IK, Holden NJ (2013) The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: quantification and internal localization in roots. *Phytopathology* 103:333–340
- Wright KM, Crozier L, Marshall J, Merget B, Holmes A, Holden NJ (2017) Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. *Microbial Biotechnology* 10:555–569

X

- Xu A, Buchanan RL, Micallef SA (2016) Impact of mulches and growing season on indicator bacteria survival during lettuce cultivation. *International Journal of Food Microbiology* 224:28–39

Y

- Yao J, Allen C (2007) The Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Needs Aerotaxis for Normal Biofilm Formation and Interactions with Its Tomato Host. *Journal of Bacteriology* 189:6415–6424
- Yao J, Allen C (2006) Chemotaxis Is Required for Virulence and Competitive Fitness of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 188:3697–3708
- Yilmaz Ç, Özcengiz G (2017) Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* 133:43–62
- Young H-K, Qumsieh MJ, McIntosh ML (1994) Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 34:715–725
- Yu X, Lund SP, Scott RA, Greenwald JW, Records AH, Nettleton D, Lindow SE, Gross DC, Beattie GA (2013) Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:E425–E434

Z

- Zeng W, Melotto M, He SY (2010) Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current Opinion in Biotechnology* 21:599–603
- Zhang K, Griffiths G, Repnik U, Hornef M (2018a) Seeing is understanding: Salmonella's way to penetrate the intestinal epithelium. *International Journal of Medical Microbiology* 308:97–106
- Zhang R, Zhang R, Yu K, Wang Y, Huang X, Pei J, Wei C, Pan Z, Qin Z, Zhang G (2018b) Occurrence, sources and transport of antibiotics in the surface water of coral reef regions in the South China Sea: Potential risk to coral growth. *Environmental Pollution* 232:450–457
- Zhao X, Norris SJ, Liu J (2014) Molecular Architecture of the Bacterial Flagellar Motor in Cells. *Biochemistry* 53:4323–4333
- Zhu B, Chen Q, Chen S, Zhu Y-G (2017) Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced? *Environment International* 98:152–159
- Zhu Y, Li H, Long C, Hu L, Xu H, Liu L, Chen S, Wang D-C, Shao F (2007) Structural Insights into the Enzymatic Mechanism of the Pathogenic MAPK Phosphothreonine Lyase. *Molecular Cell* 28:899–913
- Zogaj X, Nimitz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 39:1452–1463

Annexe

Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from faecal wastes in the environment and contaminated surface water

Mathilde Camiade^{1,2,3}, Josselin Bodilis³, Nawel Chaftar², Wassila Riah-Anglet², Johan Gardères³, Sylvaine Buquet⁴ and Barbara Pawlak¹

1 Laboratory Glyco-MEV EA4358, University of Rouen, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

2 Equipe AGHYLE, Institut Polytechnique UniLaSalle, Rouen Campus, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

3 Laboratory LMSM EA4312, University of Rouen, Rouen Campus, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

4 Laboratory ECODIV EA1293 / IRSTEA, University of Rouen-Normandy, 76821 Mont Saint Aignan cedex France

ABSTRACT

Antibiotic misuse has caused enrichment of intestinal microbiota with antibiotic-resistant bacteria. Thus, faecal rejects in the environment could impact the environmental resistome, suspected to be a genes reservoir involved in construct and spread of multi-resistant bacteria. The *Pseudomonas* genus, ubiquitous, largely represented in environment and including pathogen species, is known to carry antibiotic resistances. The aim of this work was to list and identify the *Pseudomonas* species present in different faecal discharges in the environment, of animal or human origin, and to determine their antibiotic resistance pattern. Upon 2 sampling campaigns performed on 12 points, we collected and identified 316 *Pseudomonas* isolates and established their resistance phenotype to 25 antibiotics. We detected 40 different species and were able to propose a specific antibiotic resistance pattern for 14 of them. These profiles present from 2 to 9 resistances, depending on the species. None of them show resistances to aminoglycosides, tetracyclins or polymixins among the 8 families of antibiotics tested. Four species carry a very weak number of resistances with none to β -lactams. These results imply that the *Pseudomonas* resistome associated to an environment, first depends on the *Pseudomonas* populations structure in the ecosystem. By analysing all the resistance profiles, few horizontal transfers coming from *Enterobacteria* could be suspected, but no plasmid transfer have been highlighted by conjugation assays. However, here too, transfer efficiency could depend on *Pseudomonas* species involved. Finally, class 1 and class 2 integrons were sought in the strains that may have received resistance genes from *Enterobacteria*.

INTRODUCTION

The environment has been shown to participate in the alarming development and spread of bacterial antibiotic resistances described in the last twenty years (von Wintersdorff *et al.*, 2016; Manaia, 2017; Larsson *et al.*, 2018; Morehead and Scarbrough, 2018). The main route involves faecal contamination of aquatic ecosystems, with water being a very efficient dissemination vector (Laroche *et al.*, 2010; Flores Ribeiro *et al.*, 2012; Pruden, 2014; Manaia *et al.*, 2018). Indeed, as a consequence of common and excessive antibiotic use, numerous multi-resistant enteric bacteria are released in the environment *via* faecal discharges originating from human (wastewater treatment plants, WWTP, and septic systems) or animal (field runoff). Notably, it is now well documented that *Enterobacteria* as *Escherichia coli* bear frequently genetic elements widely involved in antibiotic resistance and its spreading, *i.e.* plasmids, transposons and integrons (Bennett, 2008; Partridge, 2011; Stalder *et al.*, 2012; Laroche-Ajzenberg *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2017; Lekunberri *et al.*, 2017;). Antibiotic resistances released in environment (free resistance genes or bacteria-borne) can then directly return to human intestinal microbiote *via* fresh fruits and vegetables contaminated by irrigation water (Barak and Schroeder, 2012, Jung *et al.*, 2014; Van Overbeek *et al.*, 2014) or even *via* drinking water in case of failure of water treatment (Flores Ribeiro *et al.*, 2012 ; 2014). In addition, strong enrichment of natural ecosystems in antibiotic resistances threatens to transform environmental matrices in a reservoir from which antibiotic multi-resistant bacterial pathogens can emerge and reach hospitals. Indeed, at least three processes seem to be involved in the expansion of the environmental resistome after faecal contamination (Manaia, 2017):

i) Survival of antibiotic-resistant enteric bacteria in the environment. The majority of gut *Enterobacteria* do not survive for a long time out of the gastrointestinal tract, even if a little minority could develop adaptation strategies (Van Overbeek *et al.*, 2014). However, some other gut bacteria are able to survive in soils, as *Clostridium* for example (Leclercq *et al.*, 2016). Thus, enteric bacteria could participate by themselves to the environmental resistome.

ii) Dissemination of the resistance genes coming from enteric bacteria in the environmental bacterial community. Antibiotic-resistant faecal bacteria die and lyse in the receiving ecosystem, more or less rapidly (1 to 4 weeks (Leclercq *et al.*, 2016)). Resistance genes can transfer to environmental bacteria by conjugation or transduction while the donor bacterium

is still alive, or by transformation when genes are released in the natural ecosystem after lysis (von Wintersdorff *et al.*, 2016).

iii) Growth of environmental antibiotic-resistant bacteria living in the contaminated ecosystem, because of nutrients brought by faecal discharges. This indirect effect on the natural resistome is increasingly taken into account in literature (Udikovic-Kolic *et al.*, 2014; Leclercq *et al.*, 2016; Manaia, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

Pseudomonas is widely involved in these phenomena, because it is a ubiquitous genus, largely present in environmental ecosystems (soil, water, sediments, rhizosphere, plants...) and a major ecological actor (Spiers *et al.*, 2000, Philippot *et al.*, 2013). Bacteria belonging to this genus are known to harbour numerous antibiotic resistances, (especially to the β -lactam antibiotic class) (Flores Ribeiro *et al.*, 2014) and thus, they have full participation in the environmental resistome. They don't reside in the gut, but, as Gram-negative γ -proteobacteria, they are able to acquire genetic information from *Enterobacteria* by horizontal transfers, especially conjugative antibiotic resistance plasmids (Laroche-Ajzenberg *et al.*, 2014), and so could become environmental receptacles of transferable resistance genes coming from intestinal bacteria. In addition, as chemoorganoheterotrophic bacteria, it would not be unreasonable to expect they are able to use faecal material as nutrients (Manaia *et al.*, 2018). Indeed, some authors have clearly shown that faecal contamination (manure) brings nutrients which allow *Pseudomonas* growth (Udikovic-Kolic *et al.*, 2014; Leclercq *et al.*, 2016).

Among the *Pseudomonas* genus, *Pseudomonas aeruginosa* has focused the most of attention because this human pathogen species is widely involved in nosocomial diseases and is difficult to treat when strains are multidrug-resistant which is the case for more than 10% of the *P. aeruginosa* strains isolated from patients in most European countries (Azam and Khan, 2019). This bacteria has developed different resistance strategies: many mechanisms are intrinsic (present in all bacteria of the species) and based on efflux pumps, low permeability of outer membrane or antibiotic-inactivating enzymes encoded by chromosomal genes, allowing it to exhibit resistances to many antibiotic classes such as β -lactams, aminoglycosides, phenicols, cyclins, macrolides or quinolones (Li *et al.*, 2015; Chatterjee *et al.*, 2016 ; Azam and Khan, 2019). Level of resistance can be regulated according to different external factors or stress, from which presence of antibiotic, resulting in increase of efflux

pumps expression or decrease in membrane permeability for instance (Riou *et al.*, 2016; Azam and Khan, 2019). In addition, some bacteria of the population can acquire resistance(s) by horizontal transfer or mutation(s) (Azam and Khan, 2019). Thus, the antibiotic resistance profile of a *P. aeruginosa* strain may vary according to its history and its meetings with others bacteria. Environmental *P. aeruginosa* isolates can even present no resistance to tested antibiotics, probably in case of low expression of intrinsic mechanisms and lack of acquired resistances (Flores Ribeiro *et al.*, 2014; Grosso-Becerra *et al.*, 2014; Pappa *et al.*, 2016; Kittinger *et al.*, 2016).

Knowledge about antibiotic resistances and diversity of the *Pseudomonas* species *non-aeruginosa*, notably in environments impacted by faecal discharges, is by contrast rather weak. A few studies have nevertheless addressed this question as those of Devarajan *et al.* (2017) in sediments impacted by hospital or WWTP effluents in Africa and Switzerland, Kittinger *et al.* (2016) in the River Danube or Spindler *et al.* (2012) in hospital effluents in Brazil. However, contamination origin (human, animal, hospitals), selective growth media used, antibiotics tested (nature and number) or isolates number were very different from one study to another and, at this time, results are sometimes difficult to compare as discussed further. More data are needed, because, according to the model proposed by Manaia (2017), the *Pseudomonas* genus gathers i) species mainly environmental that are probably very efficient as carriers inside the natural environment antibiotic resistome, and ii) pathogen ones, ubiquitous, that are excellent vectors towards humans. Of course, their phylogenetic proximity greatly encourages genetic exchanges between them and, not surprisingly, can result in the emergence of multi-resistant pathogenic *Pseudomonas* strains.

In the present study, in order to describe the resistome of *Pseudomonas* spp in contact with faecal releases, we have collected 316 *Pseudomonas* isolates upon two campaigns conducted on 12 sampling points distributing on five sites contaminated by human or cattle faecal wastes. For each isolate, we have determined species by sequencing the 16S rRNA gene and tested resistance to 25 antibiotics, usually used to fight against pathogenic strains of *Enterobacteria* or *Pseudomonas* in veterinary and human medicine. Investigations of class 1 and class 2 integrons and mating assays were also performed.

MATERIALS AND METHODS

Study sites

The study area is located on a chalk Plateau in Normandie, on the north side of the Seine estuary, (France). Samples were collected from five sites, fairly close to each other (within a distance of 15 km): two WWTP (a classic WWTP and a lagoon-based WWTP) and three farms (cattle breeding). For each site, several sampling points were studied: i) WWTP: raw waters, partially treated waters and final WWTP effluents rejected in environment were sampled, ii) farms: slurry pit, manure or cow-dungs were collected. Two sampling campaigns were achieved, the first, on 1 December 2011(C1) and the second, on 10 May 2012 (C2).

Pseudomonas isolation

From water samples, Pseudomonads (*Pseudomonas* and related genera) were selected using membrane filtration (0.45 µm HABG047 Merck Millipore, Molsheim, France) on a selective medium for *Pseudomonas* (CFC; AES Chemunex, Bruz, France), complemented with a selective supplement (*Pseudomonas* CFC supplement; AES Chemunex, Bruz, France) and incubated for 48 h at 28 °C. CFC supplement contains cetrimide (antiseptic), fucidine and the antibiotic cefalotin (50 µg/mL).

For solid samples, 25g were added to 225ml of Tryptone Salt diluent (AES Chemunex, Bruz, France) and homogenized by using a stomacher for 1min. The primary dilution of the sample was thus obtained, then serial dilutions were performed in Tryptone Salt diluent. Adequate dilutions were plated on CFC agar, complemented with CFC supplement, as indicated above, and Petri dishes were incubated for 48 h at 28 °C.

For each sample, 50 colonies were randomly picked from the selective CFC medium and purified on an identical medium. All the isolates were then stored at -80 °C with the cryo-bead system (AES laboratory, Bruz, France).

Identification of the *Pseudomonas* isolates

The CFC medium is not totally specific for *Pseudomonas*. Thus, in order to confirm the isolates genus, we amplified the *oprI* gene, encoding a major porin (lipoprotein) found in almost all

the *Pseudomonas spp*, by using the PS1 / PS2 primer set that allows the amplification of a DNA fragment of 249 bp (De Vos *et al.*, 1997). *Pseudomonas* isolates (*oprI*+) were then identified at the species level by amplifying and sequencing the 16S rRNA gene, using the 27F/533R primer set that allows the amplification of a DNA fragment of about 526bp (27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG and 533R: TTA CCG CGG CTG CTG GCA C) (Crampon *et al.*, 2017).

DNA was extracted by heat shock: A cell suspension was performed in 200 µL of distilled water and incubated 10 min at 94 °C. After centrifugation (3 min at 10 000 rpm) to separate cell debris, 2 or 5 µL of the supernatant was used for PCR.

PCR reactions were achieved in a final volume of 50 µL, the mix containing 200 µM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂, 0.025 unit of Go Taq Flexi and the appropriate tampon (Promega, Lyon, France). Respectively 0.30 µM of primers were added for *oprI* gene and 0.20 µM for 16S rRNA gene.

All the PCR reactions were carried out in a Perkin Elmer thermocycler (Gene Amp PCR system 6700) and started with a denaturation step of 5 min at 94 °C and ended with a final elongation step of 7 minutes at 72 °C. The amplification programmes were: For the *oprI* gene, 27 cycles of 1 min at 94 °C, 40 s at 57 °C and 1 min at 72 °C, and for the 16S rRNA gene, 30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C. The PCR products were analysed by electrophoresis using a 1% agarose gel in Tris-acetate-EDTA buffer. The 16S rRNA amplicons were sequenced by GATC Biotech society (Constance, Germany).

Affiliations to the species of *Pseudomonas* were conducted from the 16S RNA partial gene by using both Blast with the NCBI 16S RNA sequences database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the RDP seqmatch tool (<https://rdp.cme.msu.edu/>). Taxonomic affiliations were confirmed by 16S rRNA phylogeny using the *Pseudomonas* type strains sequences (data not shown). For a given isolate, we assigned an identification at the species level when both no conflict between the different approaches was observed and %ID with the type strain sequence was greater than 98%. Otherwise, we considered that the isolate was only "related" to the species of the nearest type strain.

In order to better assess the evolutionary relationship between our isolates (*i.e.* between the different species of *Pseudomonas*), an unrooted phylogenetic tree was carried out based on NJ analysis (JC correction) of four concatenated housekeeping genes (*gyrB* gene, 798 bp; *rpoB*

gene, 642 bp; *rpoD* gene, 564bp; and 16S rRNA gene, 1182 bp) from 87 *Pseudomonas* type strains (Mulet *et al.*, 2010; Bodilis *et al.* 2011).

Antibiotic resistance testing

Antibiotic resistance of *Pseudomonas* isolates was determined by the agar diffusion method (Bonnet *et al.*, 2010) using two sets of 16 antibiotic disks (I2A, Pérols, France). The two sets tested correspond to the officially recommended drugs for use in veterinary and human medicine against infections caused by Gram-negative bacilli: **i)** for *Pseudomonas aeruginosa*: Ticarcillin (TIC, 75 µg), Ticarcillin+Clavulanic acid (TIM, 75+10 µg), Piperacillin (PRL, 75 µg), Imipenem (IPM, 30 µg), Aztreonam (AZT, 30 µg), Ceftazidim (CAZ, 30 µg), Cefsulodin (CFS, 30 µg), Tobramycin (TOB, 10 µg), Gentamycin (GEN, 10 µg), Amikacin (AK, 30 µg), Netilmicin (NET, 30 µg), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT, 75+1,25 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Levofloxacin (LEV, 5 µg), Colistin (CT, 50 µg), Fosfomycin (FF, 50 µg) and **ii)** for *E. coli*: Amoxicillin (AMX, 25 µg), Amoxicilline+Clavulanic acid (AMC, 20+10 µg), Ticarcillin (TIC, 75 µg), Ticarcillin+Clavulanic acid (TIM, 75+10 µg), Imipenem (IPM, 30 µg), Cefalotin (CEF, 30 µg), Ceftazidim (CAZ, 30 µg), Cefotaxim (CTX, 30 µg), Gentamycin (GEN, 10 µg), Kanamycin (KAN, 30 µg), Streptomycin (STR, 10 µg), Chloramphenicol (CHL, 30 µg), Tetracycline (TET, 30 µg), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT, 75+1,25 µg), Nalidixic acid (NAL, 30 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg). Inoculations were carried out by Inoclick system (I2A, Pérols, France). After 24 h-48 h at 28 °C, the *Pseudomonas* isolates were classified as sensitive, intermediate or resistant using SIRSCAN Micro (I2A, Pérols, France) and according to French national guidelines (Bonnet *et al.*, 2010). *E. coli* CIP 7624 (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* CIP 76110 (ATCC 27853) were used as controls. The data were converted into a binary code (resistant or nonresistant, the latter corresponding to sensitive and intermediate phenotypes). Seven antibiotics being common to both sets, 25 different molecules were finally used to establish resistance phenotype of isolates.

Mating

Mating experiments were performed on solid medium: 100 μL of exponentially-growing donor strains (*Pseudomonas* isolates) and 100 μL of recipient strains in steady state (*E. coli* strain W3101 resistant to rifampicin (Kopecko *et al.*, 1976)) were placed on a 0.45 μm filter HA047 (Millipore, France), previously deposited on a LB agar plate, then incubated overnight at 30 °C. Filters were collected and agitated with 5 mL of LB broth for 1.5 h at 30 °C to resuspend bacteria. Transconjugants were selected for dual resistances on antibiotic-supplemented LB agar. Selective antibiotics were chosen according to the resistance of the recipient strain W3101 Rif^R on the one hand (rifampicin 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and to the resistance pattern of the *Pseudomonas* isolates studied on the other hand (tetracycline 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, kanamycin 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or streptomycin 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As control, parent strains were tested separately on the selective media in each experiment.

PCR amplification of integrase genes

DNA was extracted by heat shock, as described above. The *intI1* and *intI2* genes, encoding the class 1 and class 2 integrases respectively, were detected on an PCR Perkin Elmer thermocycler (Gene Amp PCR system 6700) using specific primer pairs: *intI1.F/intI1.R* allowing the amplification of a DNA fragment of 280 bp (Bass *et al.*, 1999) and *intI2.F/intI2.R* allowing the amplification of a DNA fragment of 790 bp (Mazel *et al.*, 2000).

All PCR reactions were performed in a final volume of 25 μL and were prepared as follows: 0.5 U of Taq polymerase (Go Taq Flexi) and the appropriate tampon (Promega, Lyon, France), 1,5 mM (*intI2* gene) or 2 mM (*intI1* gene) of MgCl_2 , 200 μM of each dNTP (Eurogentec, Belgium) and 0.2 μM of the forward and reverse primers. For amplification of *intI1*, 0,1 mg/mL of BSA was added. The amplification programme was carried out in a Perkin Elmer thermocycler (Gene Amp PCR system 6700) as follows: For amplification of *intI1*: 10 min at 94 °C, then 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1min at 55°C, 1 min at 72°C, and a final extension of 7 min at 72 °C. For amplification of *intI2*: 10 min at 94 °C, then 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 64 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension of 7 min at 72°C. The PCR products were analysed by electrophoresis using a 1% agarose gel in Tris-acetate-EDTA buffer.

Table 1. Distribution of *Pseudomonas* isolates according to campaigns and sampling points**RW:** Raw waters; **PTW:** Partially treated waters; **FEf:** Final WWTP effluents; **SP:** Slurry pit;

Campaigns	N° of <i>Pseudomonas</i> isolates	Distribution according sampling sites and campaigns (%)											
		Classic WWTP			Lagoon-based WWTP			Farm 1			Farm 2		Farm 3
		RW (a)	PTW (b)	FEf (c)	RW (d)	PTW (e)	FEf (f)	SP (g)	D (fresh) (h)	M (stalls) (i)	M (field) (j)	D (field) (k)	M (field) (l)
C1 (01.12.2011)	170	0,6	5,3	5,9	3,5	0,6	14,7	12,4	0,0	2,3	32,9	21,8	-
C2 (10.05.2012)	146	0,7	0,7	30,1	2,7	4,1	6,2	22,6	0,0	0,0	20,5	1,4	11,0

D: cow-dung; **M:** manure.

Faecal reject rather originating from humans are given in bold.

Highest percentages are shaded.

-: Not analysed

RESULTS

Isolates distribution according to the campaign and the sampling point

To observe the contribution of the *Pseudomonas* genus to the environmental resistome in ecosystems contaminated by faecal wastes and to study potential gene transfer from gut microbiota, we collected 316 *Pseudomonas* isolates from five sites with 12 sampling points, over two independent campaigns (on 1 December 2011 and 10 May 2012) (Table 1). As expected, most of the isolates were obtained from faecal matrix which were in close contact with the environment (slurry pit, manure or cow-dung collected from field, final WWTP effluents) rather than in raw faeces (raw waters of WWTP, partially treated waters, fresh cow-dung or manure collected in cow stalls). No obvious impact of season can be noticed. Number of recovered isolates in each campaign is very close (170 and 146), making comparisons easier.

***Pseudomonas* species distribution according to the campaign and the sampling point**

Molecular identification of the 316 isolates was performed by sequencing the 16S ribosomal RNA gene of each strain (see Materials and Methods section). For most isolates, an affiliation at the species level has been obtained. However, some isolates were too distant from species type strains and have therefore only been assigned as related to a given *Pseudomonas* species. These isolates potentially belong to new species not yet characterized. As seen on Table 2 and Figure 1, 40 different species (known or potentially new) of *Pseudomonas* were overall identified, 29 per campaign from which 18 were common to both campaigns. Among these 18 species, the two most represented are *P. veronii* and *P. peli* (respectively 17,7% and 11,7% of all isolates). 22 species were only detected on one or the other campaign (11 species each), for many because of a low number of representatives. However, we can notice that *P. oleovorans-related* and *P. antarctica* were isolated only during the campaign C1 (1 December 2011) despite a notable number of isolates (respectively 42 and 8). Similarly, *P. guineae* and *P. marginalis* (respectively 18 and 10 isolates) were only encountered during the campaign C2 (10 May 2012). Regarding the 15 most represented species, the isolates of each of them were collected along 1 or 2 campaign(s) and/or from several sampling sites (2 to 7) (Table 2). Thus, we are quite sure that each species doesn't just display identical clones of only one strain, but actually include different independent strains. There is however an exception with *P. marginalis* which was detected only on May 2012 (C2),

Table 2. Distribution of *Pseudomonas* species according to campaigns and sampling points

<i>Pseudomonas</i> species	N° of isolates (C1 ^a + C2 ^b)	% of isolates in C1+C2	Isolates were collected in :		
			N° of campaigns	N° of sampling points	Sampling points (see Table 1)
<i>P. veronii</i>	56 (20 ^a + 36 ^b)	17,7	2	6	c, e, f, g, j, k
<i>P. oleovorans-related</i>	42 ^a	13,3	1 (C1)	2	j, k
<i>P. peli</i>	37 (13 ^a + 24 ^b)	11,7	2	8	b, c, e, f, g, j, k, l
<i>P. guineae</i>	18 ^b	5,7	1 (C2)	4	a, g, j, l
<i>P. fragi</i>	16 (15 ^a + 1 ^b)	5,1	2	5	c, f, g, j, k
<i>P. cedrina</i>	16 (13 ^a + 3 ^b)	5,1	2	5	e, f, g, j, k
<i>P. migulae</i>	11 (9 ^a + 2 ^b)	3,5	2	4	c, f, g, k
<i>P. asplenii</i>	10 (5 ^a + 5 ^b)	3,2	2	7	a, b, d, e, f, g, j
<i>P. marginalis</i>	10 ^b	3,2	1 (C2)	1	c
<i>P. psychrophila</i>	10 (5 ^a + 5 ^b)	3,2	2	3	c, g, k
<i>P. deceptionensis</i>	9 (2 ^a + 7 ^b)	2,8	2	4	c, f, g, k
<i>P. antarctica</i>	8 ^a	2,5	1 (C1)	3	d, g, k
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	8 (6 ^a + 2 ^b)	2,5	2	4	b, c, i, j
<i>P. parafulva-related</i>	7 (1 ^a + 6 ^b)	2,2	2	3	i, j, k
<i>P. taiwanensis</i>	7 (4 ^a + 3 ^b)	2,2	2	6	c, b, f, g, j, k
<i>P. japonica</i>	4 (3 ^a + 1 ^b)	1,3	2	3	c, d, j
<i>P. vancouverensis</i>	4 ^b	1,3	1 (C2)	1	g
<i>P. jessenii</i>	3 (2 ^a + 1 ^b)	0,9	2	3	b, f, g
<i>P. panacis</i>	3 (1 ^a + 2 ^b)	0,9	2	2	f, k
<i>P. plecoglossicida</i>	3 (2 ^a + 1 ^b)	0,9	2	3	d, e, j
<i>P. poae</i>	3 ^a	0,9	1 (C1)	3	g, i, k
<i>P. alcaligenes</i>	2 ^b	0,6	1 (C2)	2	d, e
<i>P. baetica</i>	2 ^a	0,6	1 (C1)	1	g
<i>P. chlororaphis</i>	2 ^b	0,6	1 (C2)	1	g
<i>P. fluorescens</i>	2 ^a	0,6	1 (C1)	2	j, k
<i>P. fulva-related</i>	2 (1 ^a + 1 ^b)	0,6	2	1	j
<i>P. koreensis</i>	2 (1 ^a + 1 ^b)	0,6	2	2	f, g
<i>P. libanensis</i>	2 (1 ^a + 1 ^b)	0,6	2	1	g
<i>P. lurida</i>	2 ^a	0,6	1 (C1)	2	f, g
<i>P. marginalis-related</i>	2 ^b	0,6	1 (C2)	1	g
<i>P. oryzihabitans</i>	2 ^a	0,6	1 (C1)	2	d, k
<i>P. punonensis</i>	2 ^a	0,6	1 (C1)	1	c
<i>P. alcaliphila</i>	1 ^a	0,3	1 (C1)	1	j
<i>P. amygdali</i>	1 ^b	0,3	1 (C2)	1	j
<i>P. lutea-related</i>	1 ^b	0,3	1 (C2)	1	g
<i>P. mandelii</i>	1 ^a	0,3	1 (C1)	1	j
<i>P. migulae-related</i>	1 ^b	0,3	1 (C2)	1	c
<i>P. monteilii</i>	1 ^b	0,3	1 (C2)	1	j
<i>P. moraviensis-related</i>	1 ^b	0,3	1 (C2)	1	g
<i>P. rhizosphaerae</i>	1 ^a	0,3	1 (C1)	1	g
<i>P. umsongensis</i>	1 ^b	0,3	1 (C2)	1	g
TOTAL	316	100,0			

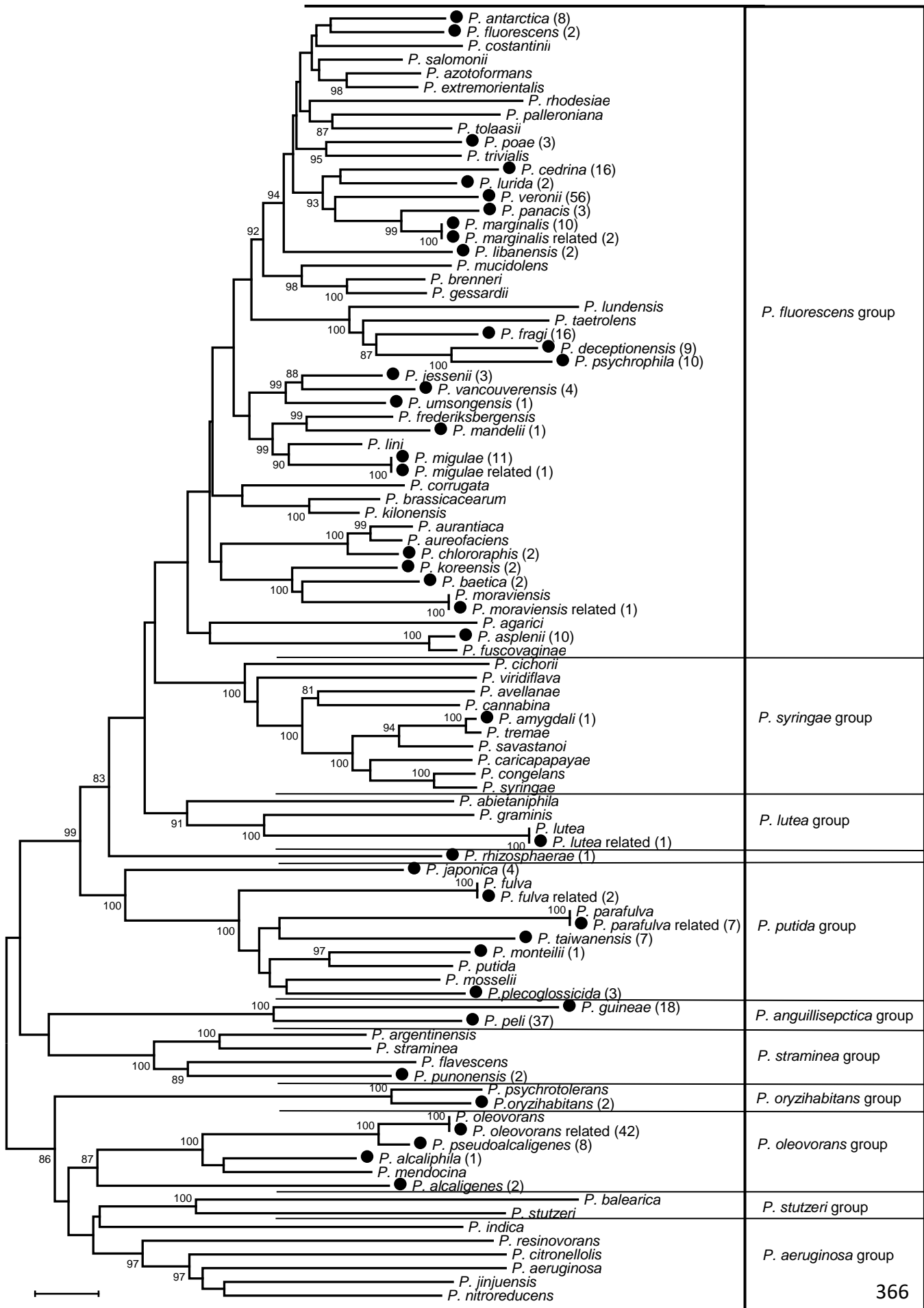
in final effluents of the classic WWTP. We will have to take it into account. Finally, while the species identified in this study are rather representative of the whole *Pseudomonas* genus, it must be mentioned that only 2 isolates of *P. fluorescens* were detected (campaign C1) and no *P. aeruginosa* or related species have been collected (Figure 1).

Antibiotic resistance patterns

We chose 25 antibiotics commonly used in human and/or veterinary medicine to treat infections caused by *Enterobacteriaceae* or by *Pseudomonas aeruginosa* and we determined antibiotic resistance pattern of the 316 *Pseudomonas* isolates. Testing such a number of drugs, corresponding to 11 antibiotic families or subfamilies, allowed us to obtain a rather large overview of isolates resistance phenotype. Moreover, we wanted to be able to detect a potential horizontal transfer of resistance plasmids from enteric bacteria towards the *Pseudomonas* genus. Indeed, a large number of *E. coli* strains present in human faecal contaminations, harbour plasmids, often conjugative, carrying resistances to β -lactams, aminoglycosides, tetracycline and/or sulfonamides (Laroche-Ajzenberg *et al.*, 2014).

Table 3 summarizes the results. Only one resistance, to cefalotin (CEF), is common to the 316 isolates. This result was however expected, because the selective medium CFC, used to select *Pseudomonas* isolates from our samples, contains cefalotin (50 $\mu\text{g/ml}$). Except this resistance, if we take the whole panel of isolates into account and consider the genus level, major resistances are to cefotaxime (CTX - 75,6%), amoxicillin (AMX - 74,7%), amoxicillin+clavulanic acid (AMC - 72,8%), and fosfomicin (FF - 73,4%). On the contrary, less than 3% of isolates present resistance to piperacillin (PIP), imipenem (IPM), ceftazidime (CAZ), kanamycin (KAN), tobramycin (TOB), netilmicin (NET), tetracycline (TET), ciprofloxacin (CIP) or colistin (CT). Finally, no isolate harbours resistance to gentamicin (GEN), amikacin (ANK) or levofloxacin (LEV). So, among 25 antibiotics tested, only these three molecules (two aminoglycosides and one quinolone) lead to a susceptible phenotype for all the 316 isolates.

However, results are very different when species is considered. In Table 3, we can see antibiotic resistance patterns obtained for 15 species for which we collected at least 7 isolates (up to 56), coming from several sampling points and/or periods (Table 2). It is clear that the resistance level is very different from one to another species. Resistances to AMX and AMC (aminopenicillin with or without penicillinase inhibitor), TIC and TIM (carboxypenicillin with or without penicillinase inhibitor) and CTX (third-generation



cephalosporin) are very high ($\geq 80\%$) in 10 species (*P. veronii*, *P. fragi*, *P. cedrina*, *P. marginalis*, *P. migulae*, *P. psychrophila*, *P. asplenii*, *P. deceptionensis*, *P. antarctica* and *P. taiwanensis*). Furthermore, these 10 species all carry a very high average number of resistances per isolate (between 9,1 and 11,1 resistances per isolate) (Table 3). *P. oleovorans-related* stands apart of this group, because most of the isolates are sensitive to TIC and TIM, although they are resistant to AMX and AMC. Yet the resistances to amoxicillin and to ticarcilline are the most often linked (Paterson, 2006). Resistance patterns of these 11 species vary mainly according to fosfomicin (FF), chloramphenicol (CHL), trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT), aztreonam (AZT), cefsulodin (CFS) and nalidixic acid (NAL). We must however remain careful with the phenotype of *P. marginalis*. Indeed, as raised before, the 10 isolates, collected at the same time, on the same sampling point, could be clones of a unique bacterium and, so, we have excluded this species for the further analysis.

The last four species present a very unexpected phenotype (*P. peli*, *P. guineae*, *P. pseudoalcaligenes* and *P. parafulva-related*) (Table 3). Indeed, they carry very few resistances and, in particular, show a very weak resistance, if any, to β -lactams. This result is striking, because resistance to β -lactams are most often referred as a natural resistance in the *Pseudomonas* genus. It can be noticed that these four species present resistant isolates to streptomycin (STR), although we detected very few resistances to aminoglycosides among the 316 isolates.

Taken together, these results allowed us to assign to 14 *Pseudomonas* species detected in this study a major antibiotic resistance pattern. For this purpose, we selected the antibiotics to which the isolates of the species present a resistance percentage equal or superior to 90% and thus, we propose distinctives profiles (Table 4). First of all, this confirms that studying resistance at the *Pseudomonas* genus level is not appropriate (just the resistance to cefalotin appears). At the species level, two groups emerge:

Figure 1. Unrooted phylogenetic tree based on Neighbor Joining analysis (JC correction) of four concatenated housekeeping genes (*gyrB* gene, *rpoB* gene, *rpoD* gene and 16S rRNA gene) from 87 *Pseudomonas* type strains, according to Bodilis et al., (2011). Bootstrap values of more than 80% (from 1000 replicates) are indicated at the nodes. The bar indicates sequence divergence. Numbers in brackets correspond to the isolates identified for each *Pseudomonas* species.

Table 3. Antibiotic resistance patterns of the 15 major species of *Pseudomonas* isolated during the two sampling periods

		% of resistance to 25 antibiotics																										
		β-lactams								Aminoglycosides						Pheni-cols	Tetra-cycline	Sulfo-na-mides	Quinolones			Poly-mixin	Fosfo-nic acid					
Species	N° of isolates	Penicillins					Monobactams	Carbapenems	Cephalosporins				GEN	KAN	STR				ANK	TOB	NET			CHL	TET	SXT	NAL	CIP
	Average N° of R / isolate	AMX	AMC	TIC	TIM	PIP	AZT	IPM	CEF	CAZ	CTX	CFS																
All isolates (40 species)	316	7,8	74,7	72,8	63,0	62,0	0,6	43,7	1,9	100,0	2,5	75,6	39,6	0,0	0,3	15,2	0,0	0,6	0,6	61,1	1,3	49,4	44,6	0,3	0,0	0,6	73,4	
15 major species :	265 :																											
<i>P. veronii</i>	56	10,4	98,2	98,2	98,2	98,2	1,8	96,4	1,8	100,0	5,4	98,2	39,3	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	98,2	0,0	55,4	98,2	1,8	0,0	0,0	0,0	48,2
<i>P. oleovorans-related</i>	42	6,1	100,0	100,0	2,4	2,4	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	64,3	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	21,4	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>P. peli</i>	37	2,7	13,5	10,8	5,4	2,7	0,0	2,7	0,0	100,0	0,0	13,5	8,1	0,0	0,0	5,4	0,0	0,0	0,0	5,4	0,0	2,7	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	94,6
<i>P. guineae</i>	18	2,4	5,6	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>P. fragi</i>	16	10,6	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	12,5	0,0	100,0	0,0	93,8	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	62,5	0,0	0,0	0,0	0,0	87,5
<i>P. cedrina</i>	16	10,1	93,8	93,8	93,8	93,8	0,0	93,8	0,0	100,0	6,3	93,8	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	93,8	0,0	93,8	68,8	0,0	0,0	0,0	0,0	31,3
<i>P. migulae</i>	11	10	81,8	81,8	100,0	100,0	0,0	54,5	0,0	100,0	0,0	100,0	45,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	54,5	0,0	0,0	0,0	0,0	81,8
<i>P. asplenii</i>	10	9,9	80,0	80,0	90,0	90,0	0,0	40,0	0,0	100,0	0,0	80,0	60,0	0,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	90,0	0,0	90,0	70,0	0,0	0,0	0,0	0,0	90,0
<i>P. marginalis</i>	10	10	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>P. psychrophila</i>	10	9,9	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	30,0	0,0	100,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	0,0	100,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	80,0
<i>P. deceptionensis</i>	9	9,1	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	88,9	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7	0,0	88,9	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. antarctica</i>	8	9,3	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	12,5	0,0	100,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	87,5	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	8	3,4	37,5	0,0	25,0	12,5	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>P. parafulva-related</i>	7	3,1	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	14,3	28,6	0,0	0,0	42,9	0,0	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>P. taiwanensis</i>	7	11,1	85,7	85,7	100,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	14,3	100,0	71,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	85,7	71,4	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Shaded boxes: major resistance pattern for each species

Antibiotics usually used to test *Enterobacteriaceae*: (underlined)

Amoxicillin (AMX) - Amoxicillin+Clavulanic acid (AMC) - Cefalotin (CEF) - Cefotaxim (CTX) - Kanamycin (KAN) - Streptomycin (STR) - Chloramphenicol (CHL) - Tetracycline (TET) - Nalidixic acid (NAL)

Antibiotics usually used to test *P. aeruginosa*: (in italic)

Piperacillin (PIP) - Aztreonam (AZT) - Cefsulodin (CFS) - Amikacin (ANK) - Tobramycin (TOB) - Netilmicin (NET) - Levofloxacin (LEV) - Colistin (CT) - Fosfomycin (FF)

Antibiotics common to both sets: (in bold)

Ticarcillin (TIC) - Ticarcillin+Clavulanic acid (TIM) - Imipenem (IPM) - Ceftazidim (CAZ) - Gentamycin (GEN) - Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT) - Ciprofloxacin (CIP)

i) 10 species are highly multi-resistant and present a major pattern varying between 5 to 9 resistances. These resistances are mainly directed towards β -lactams (AMX, AMC, TIC, TIM, CEF, CTX, and also AZT for three species and CFS for four species). Resistance to chloramphenicol (CHL) or to trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT) often complete the phenotype (6/10 for each). Resistance to fosfomicin (FF) appears in three patterns (*P. taiwanensis*, *P. asplenii* and *P. oleovorans-related*), but this resistance is relatively often encountered in the 14 species (Table 3). It must be noticed that *P. veronii* is the only species which harbours almost systematically resistance to nalidixic acid (NAL) (98,2% - 55 isolates/56).

ii) Four species present a major pattern with only two resistances, from which one is imposed by the CFC medium (cefalotin). The second resistance is to fosfomicin (FF). These species, *P. peli*, *P. guineae*, *P. pseudoalcaligenes* and *P. parafulva-related*, already cited above because of their very weak resistance to β -lactams, present indeed a large majority of susceptible phenotypes to the 23 other antibiotics tested (Tables 3 and 4).

Finally, comparison of the antibiotic resistance profile of close species reveals contrasting results (Figure 1 and Table 4). While the *P. pili* and *P. guineae* species (*P. anguilliseptica* group) are both particularly susceptible to antibiotics with only two resistances, the *P. psychrophila* and *P. deceptionensis* species (*P. fluorescens* group), as well as *P. oleovorans-related* and *P. pseudoalcaligenes* (*P. oleovorans* group) present different antibiotic resistance profiles.

Research of conjugative plasmids and class 1 and 2 integrons

Many *E. coli* strains originating from human faecal contamination bear conjugative resistance plasmids. These plasmids harbour genes conferring resistances to β -lactams (as amoxicillin, ticarcillin or cefalotin), to aminoglycosides (as streptomycin, kanamycin or gentamicin), chloramphenicol, tetracycline or sulfonamides (Laroche-Ajzenberg, *et al.*, 2014). We tried to detect these plasmids in the 316 *Pseudomonas* isolates of this study by examining their resistance phenotype, then by performing mating experiments. Given the high occurrence of resistances to β -lactams in isolates, we cannot use them as indicator. Resistances to chloramphenicol and sulfonamides are very present too. However, as mentioned above, just few isolates present resistances to kanamycin (1/316) and/or

Table 4. Major antibiotic resistance pattern of 14 *Pseudomonas* species

Species	N° of isolates	Major antibiotic resistance pattern (Percentages of resistant isolates to each antibiotic ≥ 90%)	Size of the pattern	% of isolates carrying the pattern
All isolates (40 species)	316	<u>CEF</u>	1 R	100 (316/316)
14 species :	255 :			
<i>P. veronii</i>	56	<u>AMX-AMC-TIC-TIM-AZT-CEF-CTX-CHL-NAL</u>	9 R	96,4 (54/56)
<i>P. fragi</i>	16	<u>AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-CTX-CFS-CHL-SXT</u>	9 R	93,8 (15/16)
<i>P. cedrina</i>	16	<u>AMX-AMC-TIC-TIM-AZT-CEF-CTX-CHL-SXT</u>	9 R	93,8 (15/16)
<i>P. psychrophila</i>	10	<u>AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-CTX-CFS-SXT</u>	8 R	100 (10/10)
<i>P. antarctica</i>	8	<u>AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-CTX-CFS-SXT</u>	8 R	100 (8/8)
<i>P. taiwanensis</i>	7	TIC-TIM-AZT-CEF-CTX-CHL-FF	7 R	100 (7/7)
<i>P. migulae</i>	11	TIC-TIM-CEF-CTX-CHL-SXT	6 R	100 (11/11)
<i>P. deceptionensis</i>	9	<u>AMX-AMC-TIC-TIM-CEF-CFS</u>	6 R	100 (9/9)
<i>P. asplenii</i>	10	TIC-TIM-CEF-CHL-SXT-FF	6 R	90 (9/10)
<i>P. oleovorans-related</i>	42	<u>AMX-AMC-CEF-CTX-FF</u>	5 R	100 (42/42)
<i>P. peli</i>	37	<u>CEF-FF</u>	2 R	94,6 (35/37)
<i>P. guineae</i>	18	<u>CEF-FF</u>	2 R	100 (18/18)
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	8	<u>CEF-FF</u>	2 R	100 (8/8)
<i>P. parafulva-related</i>	7	<u>CEF-FF</u>	2 R	100 (7/7)

Antibiotics usually used to test *Enterobacteriaceae*: (underlined)

Amoxicillin (AMX) - Amoxicillin+Clavulanic acid (AMC) - Cefalotin (CEF) - Cefotaxim (CTX) - Kanamycin (KAN) - Streptomycin (STR) - Chloramphenicol (CHL) - Tetracycline (TET) - Nalidixic acid (NAL)

Antibiotics usually used to test *P. aeruginosa*: (in italic)

Piperacillin (PIP) - Aztreonam (AZT) - Cefsulodin (CFS) - Amikacin (ANK) - Tobramycin (TOB) - Netilmicin (NET) - Levofloxacin (LEV) - Colistin (CT) - Fosfomycin (FF)

Antibiotics common to both sets: (in bold)

Ticarcillin (TIC) - Ticarcillin+Clavulanic acid (TIM) - Imipenem (IPM) - Ceftazidim (CAZ) - Gentamycin (GEN) - Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT) - Ciprofloxacin (CIP)

tetracycline (4/316) (Tables 3 and 5). These four latter strains are specially of interest, belong to uncommon species, and bear many resistances (from 11 to 16) (Table 5). To test if the resistances to kanamycin or tetracycline are carried by a conjugative plasmid, eventually coming from *E. coli*, mating experiments were achieved between these four *Pseudomonas* strains and a laboratory *E. coli* strain (W3011 Rif^R). No transconjugant was obtained however and no transfer could be highlighted ($F_{\text{conjugaison}} < 2 \cdot 10^{-8}$). Streptomycin resistance is more frequently found among the 316 isolates (48/316), but stays unusual (Table 3). No conjugative transfer of streptomycin resistance could also be detected in W3101 Rif^R when we used different mix of the 48 isolates resistant to streptomycin as donor population.

Targeting *int11* and *int12* genes, we have sought by PCR the presence of class 1 and class 2 integrons in the 48 isolates resistant to streptomycin. Indeed, these two classes of genetic structures bear most often an *aadA* gene conferring resistance to streptomycin/spectinomycin (Laroche *et al.*, 2009). We have extended this investigation to the four strains resistant to tetracycline and/or kanamycin and we detected the *int11* gene for one strain which belongs to the *P. libanensis* species and harbours 13 antibiotic resistances, including kanamycin and tetracycline resistances (Table 5). Overall, class 1 integrons were detected in 13,5% of the strains (7/52) and no class 2 integron could be highlighted. Thus, resistance phenotype of the tested strains seems weakly explained by presence of integrons. However, occurrence of class 1 integrons could be underestimated, because the *int11* gene sequence is not as conserved in environmental strains as in clinical strains (Stalder *et al.*, 2012). Therefore, the primers used might have had difficulties to hybridize.

DISCUSSION

Environmental resistome is a reservoir of resistance genetic elements from which pathogen bacteria could draw antibiotic resistance genes by horizontal transfer and develop multi-resistance phenotypes. It is now largely agreed that studies describing the resistome in various environments are needed to evaluate risk and efficiency of this phenomenon (von Wintersdorff *et al.*, 2016). In the present work, we were interested in faecal waste streams entering the environment, because they form an interface between enteric bacteria, in the front line faced to antibiotic selection pressure, and *Pseudomonas*, an ubiquitous genus which gathers environmental bacteria and pathogen bacteria.

Table 5. Resistance pattern of *Pseudomonas* isolates Kan^R and/or Tet^R and presence of integrase genes

Isolate	Campaign and sampling site (see Table 1)	<i>Pseudomonas</i> species	Resistance pattern	N° of resistances	<i>int1</i>	<i>int2</i>
CFC 1831	C2 g	<i>P. libanensis</i>	<u>KAN</u> - <u>TET</u> - <u>AMX</u> - <u>AMC</u> - TIC - TIM - AZT - <u>CEF</u> - <u>CTX</u> - CFS - <u>CHL</u> - SXT - <u>NAL</u>	13	1	0
CFC 810	C1 g	<i>P. rhizosphaerae</i>	<u>TET</u> - <u>AMX</u> - <u>AMC</u> - TIC - TIM - AZT - IPM - <u>CEF</u> - <u>CTX</u> - CFS - TOB - NET - <u>CHL</u> - SXT - <u>NAL</u> - FF	16	0	0
CFC 692	C1 f	<i>P. lurida</i>	<u>TET</u> - <u>AMX</u> - <u>AMC</u> - TIC - TIM - AZT - IPM - <u>CEF</u> - <u>CTX</u> - <u>CHL</u> - SXT - <u>NAL</u> - FF	13	0	0
CFC 658	C1 f	<i>P. koreensis</i>	<u>TET</u> - <u>AMX</u> - <u>AMC</u> - TIC - TIM - AZT - <u>CEF</u> - <u>CTX</u> - CFS - <u>CHL</u> - SXT	11	0	0

Antibiotics usually used to test *Enterobacteriaceae*: (underlined)

Amoxicillin (AMX) - Amoxicillin+Clavulanic acid (AMC) - Cefalotin (CEF) - Cefotaxim (CTX) - Kanamycin (KAN) - Streptomycin (STR) - Chloramphenicol (CHL) - Tetracycline (TET) - Nalidixic acid (NAL)

Antibiotics usually used to test *P. aeruginosa*: (in italic)

Piperacillin (PIP) - Aztreonam (AZT) - Cefsulodin (CFS) - Amikacin (ANK) - Tobramycin (TOB) - Netilmicin (NET) - Levofloxacin (LEV) - Colistin (CT) - Fosfomycin (FF)

Antibiotics common to both sets: (in bold)

Ticarcillin (TIC) - Ticarcillin+Clavulanic acid (TIM) - Imipenem (IPM) - Ceftazidim (CAZ) - Gentamycin (GEN) - Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT) - Ciprofloxacin (CIP)

For this purpose, we performed the identification of 316 *Pseudomonas* isolates collected during two independent sampling campaigns (December 2011 and May 2012), on 12 different sampling points in direct contact with faecal wastes originating from humans or animals.

Overall, 40 different *Pseudomonas* species were isolated (29 species per sampling campaign, 18 of which are common to both). Only very few isolates come from the raw faecal matrices, perhaps because of a microbial competition too high or unfavourable physico-chemical conditions. If considering the 15 major species ($n \geq 7$ isolates), season (spring or winter) does not seem to modify deeply the species representation: 11 species among 15 (73%) were recovered during the two campaigns. The two major collected species are *P. veronii* and *P. peli*. Four species are only found in one or other sampling campaign: *P. oleovorans* and *P. antartica* on December 2011, and *P. guineae* and *P. marginalis* on May 2012. Nevertheless, *Pseudomonas* populations that are initially present in environment and able to colonise area contaminated by faecal wastes, appear relatively homogeneous in our investigation areas.

Only few other studies were carried out to describe the populations structure of cultivable *Pseudomonas non-aeruginosa* in environment (*i.e.* identity and number of species) and sampling sites are very different: sediments receiving hospital and communal effluents, and coming from three countries (Switzerland, India and Democratic Republic of the Congo) (Devarajan *et al.*, 2017), water samples from the River Danube (Kittinger *et al.*, 2016) or untreated hospital effluents in Brazil (Spindler *et al.*, 2012). When compared with these works, our results highlight a large diversity in the environmental faecal matrices we studied (40 different species, each representing from 0,3 to 17,7% of the population). Indeed, in sediments, Devarajan *et al.* (2017) described only 11 species (141 isolates) with two major species, *P. putida* (42,2%) and *P. aeruginosa* (39,3%), then appears in third position *P. plecoglossicida* (8,9%), and the latter eight species are represented for only less than 3% of the identified *Pseudomonas* isolates. In our study, no *P. aeruginosa* was identified, but an explanation could be that our samples were not impacted by hospital effluents. Kittinger *et al.* (2016) have collected along the River Danube 520 *Pseudomonas* isolates, which are distributed essentially between *P. putida* (66%) and *P. fluorescens* (27,1%). Identity of the 6,9% remaining members is not specified in the paper, except 2 isolates that belong to the *P. aeruginosa* species (also poorly represented in Danube, around 0,4%). Nevertheless, it is

mentioned that the other isolated species represented less than 1% each. In the third study, Spindler *et al.* (2012) obtained 124 isolates from hospital effluents, split into eight different species, from which *P. pseudoalcaligenes* ($\approx 51\%$), *P. aeruginosa* ($\approx 20\%$), *P. mendocina* ($\approx 7\%$), *P. putida* ($\approx 5\%$), *P. fluorescens* ($\approx 4\%$), and the latter three species are represented for only less than 3%.

Thus, structure of detected *Pseudomonas* populations strongly varies according to the studies, probably because the environmental conditions are not the same (especially environmental samples nature), but also strategical and experimental choices have to be taken into account. Indeed, methods to select and characterise isolates are different from one study to another (selection media used, bacterial identification methods and size of isolates panels are not always comparable).

We have determined resistance pattern of the 316 isolates obtained in this study by testing 25 antibiotics used in veterinary and/or human medicine to fight Gram-negative bacilli, especially *Enterobacteria* or *P. aeruginosa*. All the isolates are resistant to cefalotin, but this antibiotic is present in the CFC medium we used, at a selective concentration. This is a very good example of the importance of the culture medium choice. Using such selective media is absolutely necessary to discriminate between bacteria of interest and the others environmental flora. But, in so doing, we direct results in a certain way. We can see that no other resistance than to cefalotin is so general. However, among the 316 isolates, high are resistances to amoxicillin and ticarcillin (penicillins), associated or not with clavulanic acid, to cefotaxime (third-generation cephalosporin), to chloramphenicol, to trimethoprim-sulfamethoxazol (sulfonamides) and to fosfomycin. By contrast, resistances to piperacillin (penicillin), to imipenem, to ceftazidim (third-generation cephalosporin), to aminoglycosides (except streptomycin), tetracycline, ciprofloxacin and levofloxacin (quinolones), and colistin, are close to zero. No isolate is susceptible to the 24 antibiotics other than cefalotin.

The main result is that the resistance pattern depends on species of isolates. Thus, we are able to propose a pattern followed by 90 to 100% of the isolates of 14 major *Pseudomonas* species of our study. This typical resistance phenotype varies from 9 resistances in *P. veronii*, *P. fragi*, and *P. cedrina*, to only two resistances in *P. peli*, *P. guineae*, *P. alcaligenes* and *P. parafulva-related*. Resistances are overwhelmingly directed against some β -lactams (amoxicillin, ticarcillin, cefotaxim), then we can observe resistances to sulfonamides (6

patterns/14), chloramphenicol (5 patterns/14) and fosfomycin (5 patterns/14). Resistance to aztreonam (monobactam) and cefsulodin (third-generation cephalosporin) complete sometimes the signatures. Finally, we note that *P. veronii* is the only species to bear resistance to nalidixic acid in its majority resistances and that *P. oleovorans* is sensitive to ticarcillin although resistant to amoxicillin.

Thus, major resistance profiles defined here could cover until 5 antibiotic families or sub-families, but, interestingly, four species among 14 don't present resistances to β -lactams (except to cefalotin) in their majority. Therefore, contrary to the generally accepted idea, resistance to β -lactams, especially to penicillins, would not be a natural resistance of the *Pseudomonas* genus (*i.e.* common to all bacteria of the genus). Of course, we must not forget that resistance mechanisms developed by *Pseudomonas* spp, according to works on *P. aeruginosa*, are in particular based on regulated systems, as efflux pumps or permeability envelop control, whose efficiency depending on the microenvironment in which lives the bacteria (Li *et al.*, 2015). Further investigations on the presence and/or expression conditions of these regulation mechanisms, especially in the four species cited above, would be necessary and very interesting.

All these results show that each *Pseudomonas* species present a resistance signature, which implies that *Pseudomonas* genus is not homogeneous in this regard. To study *Pseudomonas* resistome in an ecosystem, it is therefore necessary to establish first the populations structure.

In the three studies previously cited, the authors determined antibiotic resistances of the *Pseudomonas* isolates collected, but number and nature of chosen antibiotics are different from ours, as well as isolates number, that makes comparison more complex. For their study in sediments receiving hospital and communal effluents, Devarajan *et al.* (2017) used 16 molecules (12 β -lactams, one aminoglycoside, two quinolones and one sulfonamide). Overall (all species and all sampling site taken into account), results are comparable with ours concerning penicillins, cefotaxime and sulfonamides (*i.e.* high resistance percentages), but they found much more resistances to piperacillin, ceftazidime, aztreonam, imipenem and streptomycin. 9 isolates among 141 were even resistant to the 16 antibiotics tested. These results are given at the genus level and no distinction between detected species (essentially *P. putida* and *P. aeruginosa*) was made. In *P. aeruginosa* isolates, overexpression of some

efflux pumps was highlighted, but no down regulation of the *oprD* gene (involved in envelop permeability).

Kittinger *et al.* (2016) used 10 antibiotics to test 520 isolates picked up from the Danube River (five β -lactams, three aminoglycosides and two quinolones). Surprisingly, resistance to meropenem (carbapenem) is the highest (30,4%) (note that amoxicillin, ticarcillin or ampicillin have not been tested), then comes resistance to piperacilline/tazobactam (10,6%). The others are less than 5%. It must be emphasized that 62,5% of the 520 isolates were susceptible to the all 10 molecules tested (including the two isolates of *P. aeruginosa* collected) and that only 16 isolates (3,1%) present multi-resistances, from three to five resistances. These multidrug resistant (MDR) bacteria belong to the *putida* or *fluorescens* species (8 isolates of each), major species of this study (respectively 66% and 27,1%). These results show a rather low level of antibiotic resistance associated with *Pseudomonas* spp circulating in the Danube River. This could be related to the populations structure, their origin, or to lower selection pressure or stress in this environment. The choice of tested antibiotics is also to consider.

Spindler *et al.* (2012) used 11 antibiotics (only β -lactams) to test 124 isolates collected from hospital effluents. The highest resistance (more exactly “reduced susceptibility as defined by the authors) is to ticarcillin (around 80%) and the lowest to meropenem ($\leq 5\%$). 50% of the isolates are MDR. Overexpression of efflux pumps seems to be involved in resistances to imipenem and ceftazidime in some isolates of *P. pseudoalcaligenes*, *P. aeruginosa* and *P. oryzihabitans*.

As seen above, mainly resistances to β -lactams, quinolones and sulfonamides are examined in studies regarding *Pseudomonas* spp in the environment, with results sometimes difficult to synthesize.

Evolution of the resistome is also related to the ability of resistances to transfer from one bacterium to another. By their nature, our samples promote co-localisation between *Pseudomonas* and *Enterobacteria*, both being Gram-negative bacteria and able to exchange genes by horizontal transfers, especially by conjugation. We were interested in detecting such transfers among *Pseudomonas* isolates of our study. Many *Enterobacteria*, notably *E. coli*, harbour conjugative resistance plasmids (Luczkiewicz *et al.*, 2010) bearing resistances to many β -lactams (especially amoxicillin, ticarcillin, cefalotin), to aminoglycosides, chloramphenicol, tetracycline and/or sulfonamides (Laroche-Ajzenberg *et al.*, 2014). But many of these

resistances are very frequently encountered in our isolates panel and most of them are probably independently of a plasmid(s) presence. So, they cannot be used as beacon to detect possible plasmids coming from *Enterobacteria*. By contrast, resistances to kanamycin and tetracycline are very rare in isolates of this study (4 isolates among 316, *i.e.* 1,3%). Moreover, we identified 48 isolates carrying resistance to streptomycin (15,2% of our panel). However, we were not able to highlight the conjugative transfer of one of these three resistances towards a laboratory *E. coli* strain. Nevertheless, these resistance phenotypes are atypical in *Pseudomonas* spp and, despite our unsuccessful transfer attempts, could be plasmid-borne anyway. Indeed, mating frequency could depend on the species of the *Pseudomonas* donor. Thus, Devarajan *et al.* (2017) succeed in transferring β -lactams resistances to a laboratory *E. coli* strain by conjugation, but with very low frequencies and only from four *Pseudomonas* species among 11 (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fulva* and *P. plecoglossicida*). Moreover, the authors observed that transfer depends on temperature (better at 30°C, temperature we used). Thus, the four Kan^R and/or Tet^R isolates of the present study, belonging to the species *P. libanensis* (Kan^RTet^R), *P. koreensis* (Tet^R), *P. lurida* (Tet^R), *P. rhizosphaerae* (Tet^R), are perhaps not able to conjugate with *E. coli* with a sufficient efficiency to be detected in laboratory conditions. If these resistances are actually plasmid-borne, other explanations could be conjugation regulation or integration of the plasmid in the chromosome, further reducing transfer capacity by mating.

Then, we looked for class 1 and class 2 integrons in these 52 strains of a special interest. Integrons are genetic elements able to capture, then express resistance gene cassettes. They are neither transferable (from one cell to another), nor mobile (from one genetic locus to another within a cell), but are often found on transposons and/or plasmids. In this way, they are able to participate efficiently to the dissemination of antibiotic resistances in bacterial communities. The majority of the variable regions of the class 1 integrons confers resistance to streptomycin/spectinomycin (*aadA* gene) and, often, to trimethoprim (*dfr* gene). For their part, most of class 2 integrons bear three cassettes (*dfr1*, *sat1* and *aadA1*) allowing resistance to trimethoprim, streptothricin and streptomycin/spectinomycin, respectively (Laroche *et al.*, 2009; Stalder *et al.*, 2012). Among the 48 streptomycin-resistant isolates, 12,5% carry the *int1* gene, potentially explicating Str^R phenotype in some isolates, but none *int2* gene was detected. Among all their isolates (not only in the streptomycin-resistant isolates),

Deravajan *et al.* (2017) reported comparable occurrences in Lake Geneva (sediments receiving WWTP effluents), but much higher in the isolates from India (sediments receiving untreated hospital effluents) (34% for the *int11* gene and 14% for the *int12* gene). These results highlight the importance of wastewater treatment, especially when effluents are originating from hospitals (Stalder *et al.*, 2014). Surprisingly, in the isolates collected from Democratic Republic of the Congo (sediments receiving untreated hospital effluents), the authors detected class 2 integrons (13%), but no class 1 integron.

Finally, among the four isolates resistant to tetracycline and/or kanamycin, one of them bears the *int11* gene, despite the lack of streptomycin resistance, suggesting that variable region of this integron does not carry the gene cassette *aadA*. Presence of class 1 integron in this strain strengthens however the belief that it harbours resistance genetic support(s) not frequently found in *Pseudomonas* spp.

CONCLUSION

The *Pseudomonas* genus contribution to the environmental resistome is large, but variable according studies and environments where it comes from. We were able to assign to each major studied 14 species a typical resistance pattern which could be very different from one species to another. Thus, variability of antibiotic resistances set related to *Pseudomonas* spp will depend on populations assembly and so, on the quality of ecological niche (occupancy level, available nutrients, physicochemical factors, toxins,...). Moreover, *Pseudomonas* is very sensitive to its microenvironment and, in case of colonisation, interacts with it by many physiological regulations, that notably could impact antibiotic resistances expression. Thus, the *Pseudomonas* resistome probably depends not only on the identity of operating species, but also on the nature of their microenvironment. Regarding transfer ability of this resistome, its occurrence seems not very high, but given the very general breakdown of this genus and the size of its population, even rare phenomena become alarming. It seems therefore not reasonable to supply environmental *Pseudomonas* with antibiotic resistance genes coming from human activities. In this context, we certainly need more informations on *Pseudomonas* diversity in environment as well as ecological conditions that promote their populations assembly and, thus, allow them to contribute to the environmental resistome evolution.

REFERENCES

- Azam M.W. and Khan A.U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. [*Drug Discovery Today*](#) **24**: 350-359.
- Bass L., Liebert C.A., Lee M.D., Summers A.O., White D.G., Thayer S.G. and Maurer J.J. (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 2925-2929.
- Barak J.D. and Schroeder B.K. (2012). Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. [*Annual Review of Phytopathology*](#) **50**: 241-266.
- Bennett P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* **153**: S347–S357.
- Bodilis J., Nsigue Meilo S., Cornelis P., De Vos P. and Barray S. (2011). A long-branch attraction artifact reveals an adaptive radiation in *Pseudomonas*. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2723-2726.
- Bonnet R., Cavallo J.D., Chardon H., Chidiac C., Courvalin P., Dabernat H., Drugeon H., Dubreuil L. and Guery B. (2010). *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*. Recommendations.
- Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L., Kumar V. A., Mohan C. G. and Biswas R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology* **306**: 48–58.
- Crampon M., Cébron A., Portet-Koltalo F., Uroz S., Le Derf F. and Bodilis J. (2017). Low effect of phenanthrene bioaccessibility on its biodegradation in diffusely contaminated soil. *Environmental Pollution* **225**: 663-673.
- Dang B., Mao D., Xu Y. and Luo Y. (2017). Conjugative multi-resistant plasmids in Haihe River and their impacts on the abundance and spatial distribution of antibiotic resistance genes. *Water Research* **111**: 81-91.
- De Vos D., Lim A., Pirnay J.-P., Struelens M., Vandenvelde C., Duinslaeger L., Vanderkelen A. and Cornelis P. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based

- on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 1295-1299.
- Devarajan N., Köhler T., Sivalingam P., van Delden C., Mulaji C.K., Mpiana P.T., Ibelings B.W. and Poté J. (2017). Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions. *Water Research* **115**: 256-265.
- Flores Ribeiro A., 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 Microbiology Ecology* **81**: 267-280.
- Flores Ribeiro A., Bodilis J., Alonso L., Buquet S., Feuilloley M., Dupont J.-P. and Pawlak B. (2014). Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. *Science of the Total Environment* **490**: 370–378.
- Grosso-Becerra M.-V., Santos-Medellín C., González-Valdez A., Méndez J.-L., Delgado G., Morales-Espinosa R., Servín-González L., Alcaraz L.-D. and Soberón-Chávez G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* **15**: 318-331.
- Jung Y., Jang H. and Matthews K.R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*, **7**: 517–527.
- Kittinger C., Lipp M., Baumert R., Folli B., Koraimann G., Toplitsch D., Liebmann A., Grisold A.J., Farnleitner A.H., Kirschner A. and GernotZarfel G. (2016). Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1-8.
- Kopecko D.J., Brevet J. and Cohen S.N. (1976). Involvement of multiple translocating DNA segments and recombinational hot-spots in the structural evolution of bacterial plasmids. *Journal of molecular biology* **108**: 333-360.
- 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 Microbiology Ecology* **68**: 118-130
- Laroche E., Petit F., Fournier M. and Pawlak B. (2010). Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology* **392**: 12-21.

- Laroche-Ajzenberg E., Flores Ribeiro A., Bodilis J., Riah W., Buquet S., Chaftar N. and Pawlak B. (2014). Conjugative multiple-antibiotic resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from environmental waters contaminated by human faecal wastes. *Journal of Applied Microbiology* **118**: 399-411.
- Larsson D.G.J., Andremont A., Bengtsson-Palme J., Koefoed Brandt K., de Roda Husman A.M., Fagerstedt P., Fick J., Flach C.-F., Gaze W.H., Kuroda M., Kvint K., Laxminarayan R., Manaia C.M., Nielsen K.M., Plant L., Ploy M.-C., Segovia C., Simonet P., Smalla K., Snape J., Topp E., van Hengel A.J., Verner-Jeffreys D.W., Virta M.P.J., Wellington E.M. and Wernersson A.-S. (2018). Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment International* **117**: 132-138.
- Leclercq S.O, Wang C., Sui Z., Wu H., Zhu B., Deng Y. and Feng J. (2016). A multiplayer game: species of Clostridium, Acinetobacter, and Pseudomonas are responsible for the persistence of antibiotic resistance genes in manure-treated soils. *Environmental Microbiology* **18**: 3494-3508.
- Lekunberri I., Villagrasa M., Balcázar J.L. and M Borrego C. (2017). Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges. *Science of the Total Environment* **601-602**: 206-209.
- Li X.-Z., Plesiat P. and Nikaido H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **28**: 337-418.
- Luczkiewicz A., Jankowska K., Fudala-Ksiazek S. and Olanczuk-Neyman, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal waste water treatment plant. *Water Research* **44**: 5089–5097.
- Manaia C.M. (2017). Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. *Trends in Microbiology* **25**: 173-181.
- Manaia C.M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovides I.C., Zammit I., Kampouris I., Vaz-Moreira I. and Nunes O.C. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International* **115**: 312-324.

- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1568-1574.
- Morehead M.S. and Scarbrough C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care: Clinics in Office Practice* **45**: 467-484.
- Mulet M., Lalucat J. and Garcia-Valdes E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*. **12**:1513–1530.
- Pappa O., Vantarakis A., Galanis A., Vantarakis G. and Mavridou A. (2016). Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* **92**: 1-8.
- Partridge S.R. (2011). Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **35**: 820-855.
- Paterson D.L. (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine* **119**: S20-S28.
- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P. and van der Putten W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. **11**: 789-799.
- Pruden A. (2014). Balancing Water Sustainability and Public Health Goals in the Face of Growing Concerns about Antibiotic Resistance. *Environmental Science and Technology* **48**: 5-14.
- Riou M., Avrain L., Carbonnelle S., El Garch F., Pirnay J.-P., De Vos D., Plésiat P., Tulkens P.M. and Van Bambeke F. (2016). Increase of efflux-mediated resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic treatment in patients suffering from nosocomial pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **47**: 77-83.
- Spiers A.J., Buckling A. and Rainey P.B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**: 2345-2350.
- Spindler A., Müner Otton L., Fuentesfria D.B. and Corcaõ G. (2012). Beta-lactams resistance and presence of class 1 integron in *Pseudomonas* spp. isolated from untreated hospital effluents in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* **102**: 73–81.
- Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C. and Ploy M.C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* **3**: 119-132.

- Stalder T., Barraud O., Jove 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. *The ISME Journal* **8**: 768-777.
- Udikovic-Kolic N., Wichmann F., Broderick N.A. and Handelsman J. (2014). Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 15202–15207.
- Van Overbeek L.S., van Doorn J., Wichers J.H., van Amerongen A., van Roermund H.J.W. and Willemsen P.T.J. (2014). The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Frontiers in Microbiology* **5**: 1-17.
- Von Wintersdorff C.J.H., Penders J., van Niekerk J.M., Mills N.D., Majumder S., van Alphen L.B., Savelkoul P.H.M. and Wolffs P.F.G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1-10.
- Zhang Y.-J., Hu H.-W., Gou M., Wang J.-T., Chen D. and He J.-Z. (2017). Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics. *Environmental Pollution* **231**: 1621-1632.

Persistence de bactéries entériques antibiorésistantes ou pathogènes sur des végétaux de consommation humaine (modèle : la laitue)

Résumé : Depuis quelques années, des Toxi-Infections Alimentaires Collectives causées par la contamination de produits frais, comme les laitues, par des bactéries pathogènes entériques (*Salmonella*, *Escherichia coli* productrice de shigatoxines -ou STEC-) apparaissent de plus en plus nombreuses. La présence de ces bactéries dans cet environnement inhabituel est un risque sanitaire émergent majeur, d'autant plus que les bactéries entériques, pathogènes ou non, présentent fréquemment des résistances aux antibiotiques. Afin d'étudier la persistance des bactéries antibiorésistantes ou pathogènes sur des laitues, la caractérisation de plasmides de résistance portés par des souches de *E. coli* issues d'environnements aquatiques contaminés a été réalisé pour, par la suite, étudier leur implication potentielle dans l'adhésion des souches-hôtes sur différentes variétés de laitues. L'étude de la survie et de l'adhésion de souches de *E. coli* environnementales et de laboratoire, transformées avec les plasmides d'intérêt, sur de jeunes plants de laitues a permis de mettre en évidence trois points : 1) plus le temps de contact entre bactéries et feuilles augmente et moins la survie bactérienne est importante ; 2) il existe une différence de survie et d'adhésion selon les variétés de laitues étudiées ; 3) il existe une différence de survie et d'adhésion entre les souches de laboratoire et les souches environnementales, ces dernières étant en meilleur état métabolique et montrant une adhésion plus importante durant les 11-12 jours d'expérimentation. Après ces constatations de persistance des *E. coli* antibiorésistantes en conditions contrôlées, des études en champs sur 4 exploitations maraîchères normandes, possédant des itinéraires techniques différents, ont été réalisées. La recherche de pathogènes entériques, *Salmonella* et STEC, a été effectuée sur les laitues et une recherche de *E. coli*, témoin de contamination fécale, a été réalisée sur les laitues ainsi que dans l'eau d'irrigation d'un des sites. Les résultats révèlent une qualité microbiologique satisfaisante des parcelles étudiées (selon l'arrêté européen N°2073/2005) bien que des *E. coli* aient été régulièrement retrouvées au niveau des laitues, dont certaines antibiorésistantes. L'analyse de l'eau d'irrigation a montré la présence continue de *E. coli*, dont des souches présentant des profils d'antibiorésistance communs à ceux retrouvés sur les laitues, montrant que l'eau d'irrigation est l'une des sources critiques de contamination des végétaux en champs.

Mots clés : Bactéries entériques, *E. coli*, *Salmonella*, laitues, antibio-résistance, TIAC, survie bactérienne

Persistence of antibiotic-resistant or pathogenic enteric bacteria on plants for human consumption (model: lettuce)

Abstract : In recent years, foodborne diseases caused by fresh products contaminated, such as lettuce, with enteric pathogenic bacteria (*Salmonella*, Shigatoxin-producing *Escherichia coli*-or STEC-) increasingly. The presence of these bacteria in this unusual environment is a major emerging health risk, especially since enteric bacteria, whether pathogenic or not, are frequently resistant to antibiotics. To study the persistence of antibiotic-resistant or pathogenic bacteria on lettuce, the characterization of resistance plasmids carried by *E. coli* strains from contaminated aquatic environments was carried out in order to study their potential involvement in adhesion of host strains on different varieties of lettuce. The study of the survival and adhesion of environmental and laboratory *E. coli* strains, transformed with the plasmids of interest, on young lettuce plants allowed to highlight three points: 1) more time contact between bacteria and leaves increases and less bacterial survival is important; 2) there is a difference in survival and adhesion depending on the varieties of lettuce studied; 3) there is a difference in survival and adhesion between laboratory strains and environmental strains, the latter being in better metabolic state and showing greater adhesion during the 11-12 days of experimentation. After the persistence of antibiotic-resistant *E. coli* strains under controlled conditions, field studies on 4 Normandy vegetable farms, with different technical itineraries, were carried out. The search for enteric pathogens, *Salmonella* and STEC, was carried out on lettuce and a search for *E. coli*, a control of fecal contamination, was realized on the lettuce as well as in the irrigation water of one of the sites. The results reveal a satisfactory microbiological quality of the agricultural plots studied (according to the European decree N ° 2073/2005) although *E. coli* strains were regularly found at the lettuce level, including some antibiotic resistant. Analysis of the irrigation water showed the continued presence of *E. coli* strains, including strains with common antimicrobial resistance profiles to those found on lettuce, showing that irrigation water is one of the critical sources of plant contamination in the field.

Key words : enteric bacteria, *E. coli*, *Salmonella*, lettuce, antimicrobial resistance, foodborne, bacteria survival

