



HAL
open science

Les intégrons comme marqueurs de pollution anthropique dans l'environnement

Lucie Laval

► **To cite this version:**

Lucie Laval. Les intégrons comme marqueurs de pollution anthropique dans l'environnement. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0083 . tel-04080991

HAL Id: tel-04080991

<https://theses.hal.science/tel-04080991v1>

Submitted on 25 Apr 2023

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.



Université de Limoges
ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)
UMR Inserm 1092 RESINFIT

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Santé publique, épidémiologie, environnement et sociétés

Présentée et soutenue par
Lucie LAVAL

Le 14 décembre 2022

Les intégrons comme marqueurs de pollution anthropique dans l'environnement

Thèse dirigée par le Docteur Olivier BARRAUD

JURY :

Président du jury

M. Christophe DAGOT, PR, UMR Inserm 1092, Université de Limoges

Rapporteurs

M. Didier HOCQUET, PU-PH, UMR CNRS 6249, Université Franche-Comté

M. Jean-Yves MADEC, DR, Unité AVB du laboratoire de Lyon ANSES, Lyon

Examineurs

M. Sébastien LECLERCQ, CR, UMR INRAE 1282, Université de Tours

Mme. Sophie COURTOIS, Responsable du département Microbiologie & Capteur,
CIRSEE, SUEZ-SA Le Pecq

M. Olivier BARRAUD, MCU-PH, UMR Inserm 1092, Université de Limoges

Invités

M. Pierre PARNEIX, PH, Responsable du CPIAS Nouvelle-Aquitaine, CHU Bordeaux



A mes parents.

« Le succès n'est pas la clé du bonheur. Le bonheur est la clé du succès. Si vous aimez ce que vous faites, vous réussirez. »
Albert Schweitzer

Remerciements

Je tiens à remercier Mr le Professeur **Christophe Dagot** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et d'avoir participer à ce travail de thèse. Je remercie Mr le Professeur **Didier Hocquet** et Mr le Docteur **Jean-Yves Madec** d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et mon manuscrit en tant que rapporteurs. Je remercie Mr le Docteur **Sébastien Leclercq** et Mme la Docteure **Sophie Courtoix** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant qu'examineurs. Je remercie tout spécialement le Docteur **Pierre Parneix** pour son aide dans le recrutement des centres de soins de la région Nouvelle-Aquitaine et d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Enfin je remercie le Docteur **Olivier Barraud** d'avoir encadré ce travail de thèse.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	6
Droits d'auteurs	8
Table des illustrations	13
Table des tableaux	15
Acronymes	17
Préambule	21
Introduction	25
Partie I. Dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques	27
I.1. Les séquences d'insertion (IS) et les transposons	27
I.2. Les îlots génomiques	29
I.3. Les plasmides	30
I.4. Les intégrons	31
I.4.1. Les intégrons de résistance (IR)	32
I.4.1.1. La région conservée 5'CS	33
I.4.1.1.1. L'intégrase <i>IntI</i>	33
I.4.1.1.2. Le site de recombinaison spécifique <i>attI</i>	34
I.4.1.1.3. Le promoteur des cassettes <i>Pc</i>	35
I.4.1.2. La région variable	37
I.4.1.2.1. Les cassettes	37
I.4.1.2.1.1. Structure des cassettes	37
I.4.1.2.1.2. Fonction des cassettes	38
I.4.1.2.2. Le site <i>attC</i>	39
I.4.1.3. Le mouvement des cassettes	40
I.4.1.3.1. L'intégration par recombinaison <i>attI/attC</i>	41
I.4.1.3.2. L'excision par recombinaison <i>attC/attC</i>	42
I.4.1.4. La régulation et l'expression des cassettes	43
I.4.1.4.1. Régulation de l'expression de l'intégrase <i>IntI</i>	43
I.4.1.4.2. Expression des cassettes	44
I.4.1.4.2.1. Variant du promoteur <i>Pc</i>	44
I.4.1.4.2.2. La position des cassettes	44
I.4.1.5. Les différentes classes d'intégrons de résistance	45
I.4.1.5.1. Les intégrons de résistance de classe 1 (IR1)	45
I.4.1.5.2. Les intégrons de résistance de classe 2 (IR2)	46
I.4.1.5.3. Les intégrons de résistance de classe 3 (IR3)	47
I.4.1.5.4. Les intégrons de résistance de classe 4, 5 et 6 (IR4, IR5 et IR6)	49
I.4.2. Les intégrons sédentaires chromosomiques	49
Partie II. Antibiorésistance et environnement	51
II.1. Méthodes d'analyses de l'antibiorésistance dans l'environnement	51
II.2. La pollution anthropique	52
II.2.1. Les effluents anthropiques et l'antibiorésistance	52
II.2.1.1. Les effluents hospitaliers	53
II.2.1.2. Les effluents d'abattoirs	56
II.2.1.3. Les effluents industriels (cas des usines productrices d'antibiotiques)	59
II.2.1.4. Les effluents urbains	60

II.2.2. Devenir et traitement des eaux dans les stations d'épuration (STEU)	61
II.2.3. Marqueurs de la pollution anthropique.....	64
II.3. Les intégrons dans l'environnement : cas des effluents	66
II.3.1. Les intégrons de résistance dans les effluents hospitaliers.....	69
II.3.2. Les intégrons de résistance dans les effluents d'abattoirs	72
Partie III. Intégrons et animaux (cas des <i>Aeromonas</i> dans la pisciculture)	75
III.1. L'aquaculture	75
III.2. Les <i>Aeromonas</i>	76
III.2.1. Intégrons de classe 1 chez <i>Aeromonas</i>	80
III.2.2. Intégrons de classe 2 chez <i>Aeromonas</i>	80
III.2.3. Intégrons de classe 3 chez <i>Aeromonas</i>	81
Synthèse et objectifs du travail de thèse	84
Partie I. Analyse des cassettes d'intégrons dans les effluents : projets CALYPSO et ROSETA	86
I.1. CALYPSO.....	86
I.2. CALYPSO Nouvelle-Aquitaine	173
I.3. ROSETA.....	213
I.3.1. Matériels et méthodes	213
I.3.1.1. Participants au projet ROSETA.....	213
I.3.1.2. Campagne de prélèvements	214
I.3.1.2.1. Prélèvements	215
I.3.1.2.2. Filtration	215
I.3.1.3. Biologie moléculaire	215
I.3.1.3.1. Recherche des cassettes d'intégrons	215
I.3.1.3.2. Analyse du microbiote	216
I.3.2. Résultats	217
I.3.2.1. Analyse des cassettes des effluents d'abattoirs	217
I.3.2.1.1. Analyse des cassettes associées aux intégrons de classe 1	217
I.3.2.1.2. Analyse des cassettes associées aux intégrons de classe 2	219
I.3.2.1.3. Analyse des cassettes associées aux intégrons de classe 3	220
I.3.2.2. Microbiote des effluents abattoirs.....	222
I.4. Comparaison entre les effluents de centres de soins et d'abattoirs	224
I.4.1. Comparaison des cassettes d'intégrons	224
I.4.1.1. Analyse des « cassetomes » d'abattoirs et de centres de soins pour les intégrons de classe 1	224
I.4.1.2. Analyse des « cassetomes » d'abattoirs et de centres de soins pour les intégrons de classe 2.....	225
I.4.1.3. Analyse des « cassetomes » d'abattoirs et de centres de soins pour les intégrons de classe 3.....	227
I.4.2. Comparaison des microbiotes des effluents d'abattoirs et de centres de soins...229	
Partie II. Analyse des intégrons chez des <i>Aeromonas</i> isolés de poissons : projet ARMANI232	
II.1. ARMANI.....	232
II.2. <i>Case report</i>	259
Discussion.....	264
Conclusion et perspectives.....	279
Références bibliographiques	282

Table des illustrations

Figure 1 Cibles des antibiotiques (A) et mécanismes de résistance (B) (d'après Pazda et al., 2019).....	21
Figure 2 Représentation schématique du concept "One Health"	22
Figure 3 Nombre de morts attribuables à l'antibiorésistance chaque année (O'Neill, 2016).....	25
Figure 4: Système de "poupées Russes" des éléments génétiques mobiles.....	27
Figure 5 Séquences d'insertion et transposons composites.....	28
Figure 6 Structure d'un intégron	32
Figure 7 Structure du site de recombinaison spécifique <i>attI1</i> (Escudero et al., 2015) ..	35
Figure 8 Structure du site de recombinaison spécifique <i>attC</i> (Escudero et al., 2015)....	40
Figure 9 Mécanisme d'insertion et d'excision des cassettes.....	42
Figure 10 Abondance du résistome dans les effluents non traités et traités et des rivières en amont et aval de STEU au cours du temps (2012-2015) (Buelow et al., 2020)	53
Figure 11 Distribution des gènes de carbapénémases détectées dans des bactéries isolées d'effluents hospitaliers versus d'effluents agricoles (Müller et al., 2018)	54
Figure 12 Abondance relative normalisée de différentes classes de gènes de résistance aux antibiotiques, de métaux lourds, d'éléments génétiques mobiles et d'intégrons dans différents types d'effluents (Buelow et al., 2020)	56
Figure 13 Exposition des élevages de volailles et de porcins aux quinolones et fluoroquinolones (Anses-ANMV, 2019).....	58
Figure 14 Abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les eaux usées à l'entrée et la sortie de STEU municipales (Hiller et al., 2019)....	61
Figure 15 Voies de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques selon différentes sources environnementales	62
Figure 16 Abondance des mécanismes de résistances aux antibiotiques associés aux intégrons de classe 1 retrouvés dans douze effluents de STEU urbaines (Gatica et al., 2016).....	67
Figure 17 Proportion des différents gènes de résistance aux antibiotiques des cassettes des intégrons de classe 1 issus de prélèvements de STEU municipales (An et al., 2022).....	68
Figure 18 Abondance relative des intégrons de classe 1 dans différentes matrices environnementales (thèse de Thibault Stalder, 2012).....	69
Figure 19 Abondances de <i>intI1</i> dans les effluents municipaux et d'abattoirs porcins (Wang et al., 2018).	73
Figure 20 Production mondiale d'animaux marins et d'algues de 1990 à 2018 (The State of World Fisheries and Aquaculture, FAO, 2020)	75

Figure 21 Poissons infectés par <i>Aeromonas hydrophila</i> (Bannai, 2013)	77
Figure 22 Sources potentielles de contamination chez l'Homme par des souches d'<i>Aeromonas</i> (Janda and Abbott, 2010)	78
Figure 23 Image d'une sangsue utilisée en hirudothérapie (Herlin <i>et al.</i>, 2017)	79
Figure 24 Structure de l'intégron de classe 3 In3-7 (Simo Tchuinte <i>et al.</i>, 2016).....	81
Figure 25 Principales cassettes des intégrons de classe 1 présentes dans les effluents d'abattoirs	218
Figure 26 Principales cassettes des intégrons de classe 2 présentes dans les effluents d'abattoirs	219
Figure 27 Principales cassettes des intégrons de classe 3 présentes dans les effluents d'abattoirs	221
Figure 28 Microbiote des effluents d'abattoirs.....	223
Figure 29 Analyse PCoA des « cassetomes » des intégrons de classe 1	225
Figure 30 Analyse PCoA des « cassetomes » des intégrons de classe 2.....	227
Figure 31 Analyse PCoA des « cassetomes » des intégrons de classe 3.....	228
Figure 32 Analyse PCoA des microbiotes des effluents hospitaliers et d'abattoirs....	230

Table des tableaux

Tableau 1 Similitudes (bleu) et identité (rose) des séquences protéiques des intégrases des IR (d'après Collis <i>et al.</i>, 2002)	34
Tableau 2 Principaux variants de Pc des IR1 (d'après Jové <i>et al.</i>, 2010).....	36
Tableau 3 Participants au projet ROSETA.....	214

Acronymes

3'CS	Segment conservé 3'
5'CS	Segment conservé 5'
aa	Acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN sb	ADN simple brin
ADNt	ADN total
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomique
ATB	Antibiotique
BAM	Binary Alignment Map
BGN	Bactéries à Gram négatif
BGP	Bactéries à Gram positif
BISCEm	Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement
BMR	Bactérie multirésistante
C3G	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération
CG	Cassette de gène
CH	Centre hospitalier
CHU	Centre hospitalier universitaire
CMI	Concentration minimale inhibitrice
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
db	Double brin
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
dGTP	Didésoxyguanosine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid

dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
EHPAD	Établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes
GC	Gene cassette
gcu	Gene cassette of unknown function
GRA	Gènes de résistance aux antibiotiques
ICE	Eléments intégratifs conjugatifs
IME	Eléments intégratifs mobilisables
IR1	Intégron de résistance de classe 1
IR2	Intégron de résistance de classe 2
IR3	Intégron de résistance de classe 3
IR4	Intégron de résistance de classe 4
IR5	Intégron de résistance de classe 5
IR6	Intégron de résistance de classe 6
IS	Séquence inversée
ISC	Intégron sédentaire chromosomique
ISP	Ion sphere particule
NGS	Next generation sequencing
nt	Nucléotide
ORF	Opening reading frame
OTU	Unité taxonomique opérationnelle
pb	Paire de bases
PCoA	Principal coordinates analysis
PCR	Polymerase chain reaction
ppi	Préparation pour injection
RESAPATH	Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales

sb	Simple brin
SI	Super intégron
SSR	Soins de suite et de réadaptation
TTV	Torque Teno Virus
UV	Ultra-violet

Préambule

Selon l'OMS, les antibiotiques (ATB) sont des médicaments utilisés pour traiter et prévenir les infections bactériennes. A l'origine, ce sont des substances naturellement produites par des micro-organismes d'origine environnementale comme par exemple des champignons du genre *Penicilium* ou certaines bactéries du genre *Streptomyces*. Aujourd'hui, en plus des antibiotiques d'origine naturelle, on retrouve des antibiotiques synthétiques ou semi-synthétiques. Ces molécules ont la capacité d'inhiber la croissance de bactéries (effet bactériostatique) voire de les tuer (effet bactéricide). Il existe plusieurs mécanismes d'actions qui ont pour but d'inhiber les voies métaboliques majeures des bactéries. Les principales cibles des antibiotiques sont : la synthèse de la paroi (β -lactamines, glycopeptides); la synthèse des protéines (aminosides, macrolides, tétracyclines); la réplication et la synthèse de l'ADN (quinolones, sulfamides) (**Figure 1A**). Les antibiotiques sont regroupés en différentes familles en fonction des cibles, des mécanismes d'actions ou de leur nature chimique. On retrouve une vingtaine de familles différentes dont les plus utilisés sont : les β -lactamines, les aminoglycosides, les quinolones, les tétracyclines, les sulfamides, les macrolides...

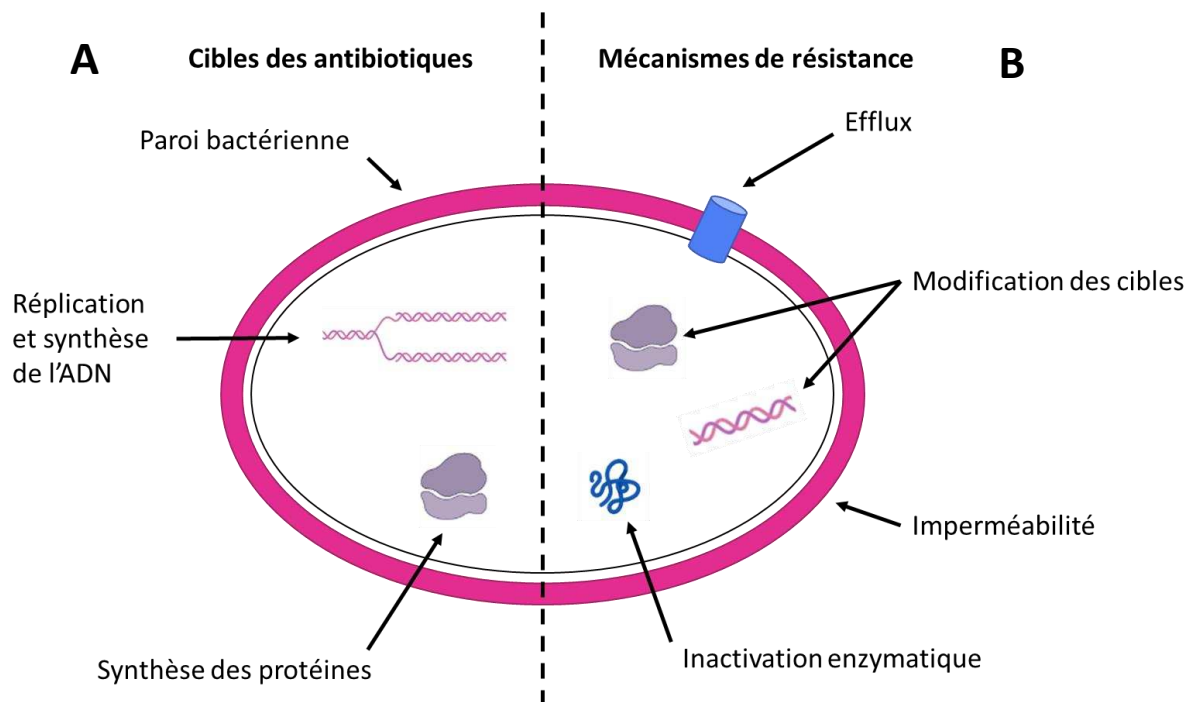


Figure 1 Cibles des antibiotiques (A) et mécanismes de résistance (B) (d'après Pazda et al., 2019)

La découverte des antibiotiques en 1928 par Alexander Fleming a été une vraie révolution dans le domaine médical car ils sont apparus comme des « molécules miracles » protégeant des épidémies, soignant des infections mortelles (notamment lors de la seconde guerre mondiale) et augmentant l'espérance de vie. Jusque dans les années 70, de nombreuses molécules antibiotiques ont fait leur apparition sur le marché et ont considérablement augmenté l'arsenal thérapeutique. Mais après seulement quelques années d'utilisation, le « miracle » antibiotique a été confronté à ses limites avec l'apparition et la propagation de résistances des bactéries face à ces molécules. En effet c'est en 1940, que la première enzyme capable de dégrader un antibiotique a été découverte (Abraham and Chain, 1988). Depuis de nombreux gènes de résistance ont été découverts et d'autres seront probablement prochainement décrits. De nos jours il devient de plus en plus difficile de trouver de nouveaux antibiotiques. En effet, après la découverte de la molécule antibiotique, il faut en moyenne une quinzaine d'années avant sa mise sur le marché et une fois effective, apparaissent rapidement des résistances vis-à-vis de cet antibiotique.

Le concept « *One Health* » a pour but de prendre les problématiques qui nous entourent de façon beaucoup plus globale et de mettre un accent sur l'importance de travailler ensemble (humain, animal et environnement) (**Figure 2**).

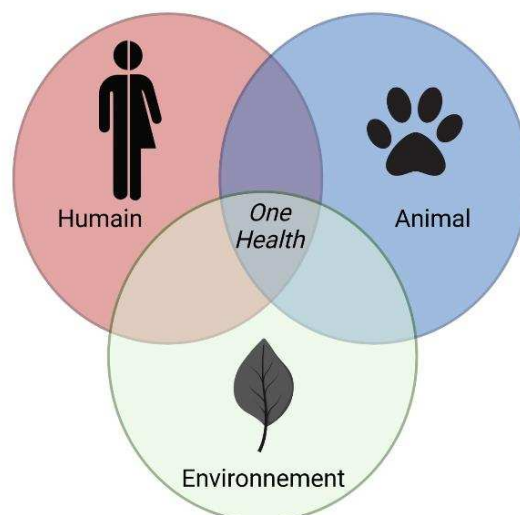


Figure 2 Représentation schématique du concept "One Health"

L'antibiorésistance est un problème de santé publique qui rentre dans l'approche « *One Health* » car elle touche non seulement l'Homme mais aussi les animaux et l'environnement (Aslam et al., 2021; McEwen and Collignon, 2018; Sikkema and Koopmans, 2016). L'augmentation incessante de ces résistances nécessite une surveillance globale et il est important d'évaluer les risques qui y sont associés. Dès 2015, l'OMS a alerté sur cette augmentation de la résistance en la présentant comme une menace pour l'humanité, déclenchant alors un plan d'action global (OMS, 2015). En juin 2017, la Commission Européenne en fait part dans son plan d'action pour lutter contre l'antibiorésistance (*Résistance aux antimicrobiens*, 2017). La France a également présenté en novembre 2016 son plan d'action national en 40 points dont (i) l'analyse de la résistance bactérienne dans l'environnement et (ii) l'action régionale sur l'antibiorésistance en santé humaine, animale et environnementale. Parmi les 13 mesures de la feuille de route interministérielle pour la maîtrise de l'antibiorésistance, sont notamment indiquées les nécessités de « structurer et coordonner les efforts de recherche, de développement et d'innovation sur l'antibiorésistance et ses conséquences », et de « développer de nouveaux indicateurs et outils de surveillance par une meilleure exploitation des bases de données ».

C'est dans ce contexte que se situe ce travail de doctorat avec l'objectif de positionner les intégrons comme des indicateurs de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement via 2 modèles d'études : (i) les effluents avec le projet CALYPSO Nouvelle-Aquitaine qui s'intéresse aux cassettes d'intégrons présentes dans les effluents hospitaliers et le projet ROSETA pour les cassettes d'intégrons présentes dans les effluents d'abattoirs ainsi que (ii) le projet ARMANI qui s'intéresse aux intégrons isolés de souches d'*Aeromonas* retrouvées chez des poissons.

Introduction

Les bactéries résistantes aux antibiotiques sont à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique. Des disparités existent entre les continents, l'Afrique et l'Asie du Sud-Est étant les plus touchés, mais il est attribué à la résistance aux antimicrobiens environ 1,27 millions de décès par an dans le monde et cela augmente d'années en années (Murray et al., 2022). Si rien est fait pour lutter contre la résistance, les prédictions les plus pessimistes attribuent à la résistance aux antimicrobiens près de 10 millions de décès par an dans le monde en 2050, ce qui dépasserait le nombre de décès causés par l'ensemble des cancers (O'Neill, 2016) (**Figure 3**). Cette forte augmentation de la résistance est due en grande partie à l'utilisation abusive et infondée d'antibiotiques tant en médecine humaine que dans les filières de production animale.

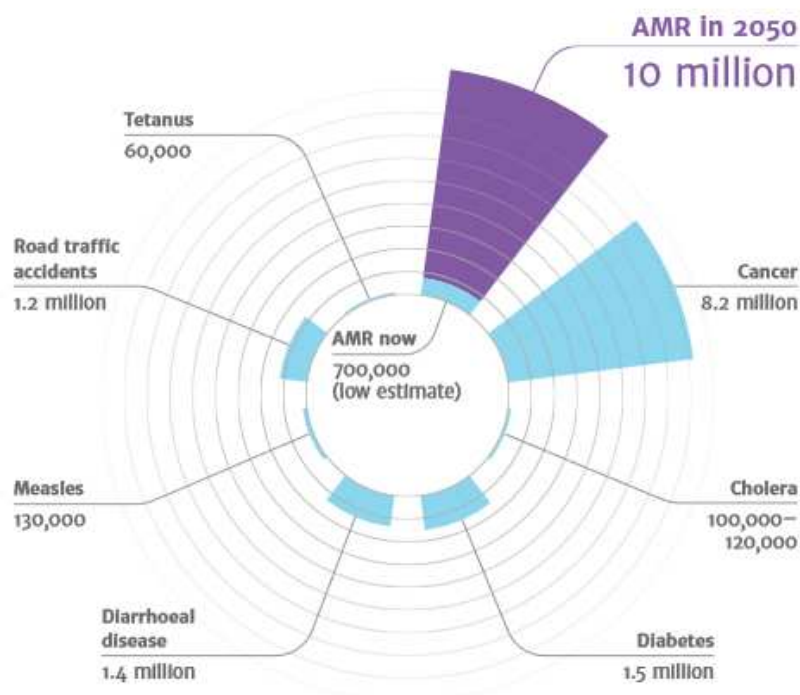


Figure 3 Nombre de morts attribuables à l'antibiorésistance chaque année (O'Neill, 2016)

Estimation du nombre de morts attribués à différentes maladies et à la résistance aux antimicrobiens en 2016 (en bleu) et prédiction du nombre de morts qui sera attribué à la résistance aux antimicrobiens en 2050 (en violet).

D'un point de vue mécanistique, chez les bactéries il existe plusieurs mécanismes de résistances aux antibiotiques (**Figure 1B**):

- Les mécanismes de modification de la cible : l'interaction antibiotique/cible est inhibée, ce qui empêche l'antibiotique d'agir (quinolones, rifampicine, vancomycine, pénicillines, macrolides...).
- Les mécanismes d'efflux : dans ce cas-là, il y a un rejet de la molécule hors de la cellule bactérienne (quinolones, aminoglycosides, cyclines, β -lactamines, macrolides...).
- Les mécanismes d'imperméabilité : la pénétration de la molécule au sein de la bactérie est bloquée (β -lactamines, cyclines, glycopeptides...).
- Les mécanismes d'inactivation enzymatique : l'antibiotique est inactivé par modification chimique (β -lactamines, aminoglycosides, macrolides...).

L'acquisition de la résistance des bactéries aux antibiotiques est liée à deux phénomènes : les mutations et les transferts de gènes horizontaux.

Les mutations se produisent de manière aléatoire sur le génome bactérien au cours de sa réplication puis elles seront transmises à la descendance. La plupart des mutations sont des mutations dites silencieuses qui ne provoquent pas de modifications de la protéine codée par le gène muté. Toutefois, il arrive que ces mutations modifient certaines propriétés physico-chimiques de la protéine. Quand cela se produit par exemple sur un gène codant une cible d'antibiotique, des résistances peuvent apparaître chez la bactérie. Ces mutations spontanées peuvent être sélectionnées suite à une pression de sélection exercée par les antibiotiques.

Les transferts horizontaux de gènes regroupent les mécanismes d'échanges d'ADN entre bactéries. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être ainsi transférés d'une bactérie à une autre bactérie grâce à ces mécanismes. Le mécanisme de transfert horizontal est le principal acteur de la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être portés par différents supports moléculaires, ces derniers seront détaillés dans la partie suivante (Partie I).

Partie I. Dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques

Les bactéries possèdent naturellement ou acquièrent des gènes de résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance acquis peuvent se trouver sur différents supports génétiques (chromosomique ou plasmidique) et peuvent être mobilisés au sein du génome bactérien d'un même clone ou entre deux bactéries différentes. Cette acquisition de gènes est possible grâce à différents éléments génétiques mobiles (EGM) qui sont des fragments d'ADN dits mobiles c'est-à-dire capables d'être transférés d'un génome bactérien à un autre ou au sein d'un même génome. Ces différents EGM peuvent s'intégrer les uns dans les autres comme les poupées russes (**Figure 4**). Par exemple, un gène de résistance à un antibiotique peut se trouver sous forme de cassette de gène au sein d'un intégron, qui est lui-même intégré au sein d'un transposon qui est également porté par un plasmide et/ou un îlot génomique. Ces deux dernières structures sont capables de disséminer par transfert de gènes horizontal.

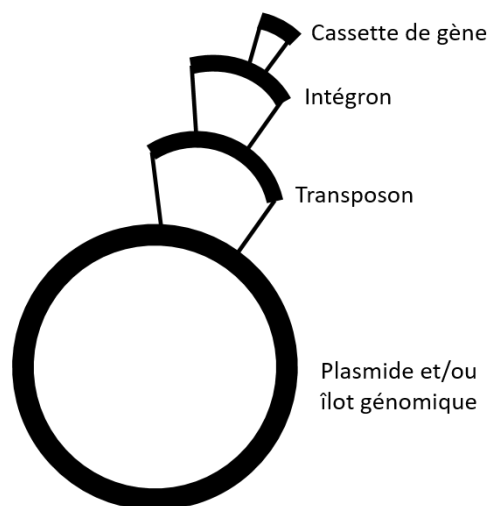


Figure 4: Système de "poupées Russes" des éléments génétiques mobiles

I.1. Les séquences d'insertion (IS) et les transposons

Au sein de la cellule bactérienne, les séquences d'insertion et les transposons sont les principaux éléments mobiles intra-cellulaires.

Les IS sont de petits éléments mobiles d'environ 1 kilobases flanqués de part et d'autre de séquences inversées répétées (Partridge et al., 2018) (**Figure 5A**). Cette séquence d'insertion héberge un gène qui code une transposase qui va reconnaître de manière spécifique les séquences inversées répétées, ce qui va permettre l'excision de l'IS et entraîner son déplacement vers un autre endroit sur le génome (chromosome vers chromosome ou chromosome vers plasmide ou plasmide vers chromosome...) (Siguier et al., 2014). Si deux IS entourent un ou plusieurs gènes, ces derniers seront mobilisés avec ces IS lors du déplacement, on parle alors de transposons composites (**Figure 5B**). De ce fait des gènes de résistance et même des intégrons portant eux même des gènes de résistance aux antibiotiques dans leur région variable peuvent alors être mobilisés. C'est le cas de l'IS *1294b* avec le gène de la β -lactamase *bla_{CMY-2}* (Yassine et al., 2015) ou l'IS *Apl1* avec le gène *mcr1* qui confère une résistance à la colistine (Petrillo et al., 2016). Ils participent ainsi à la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

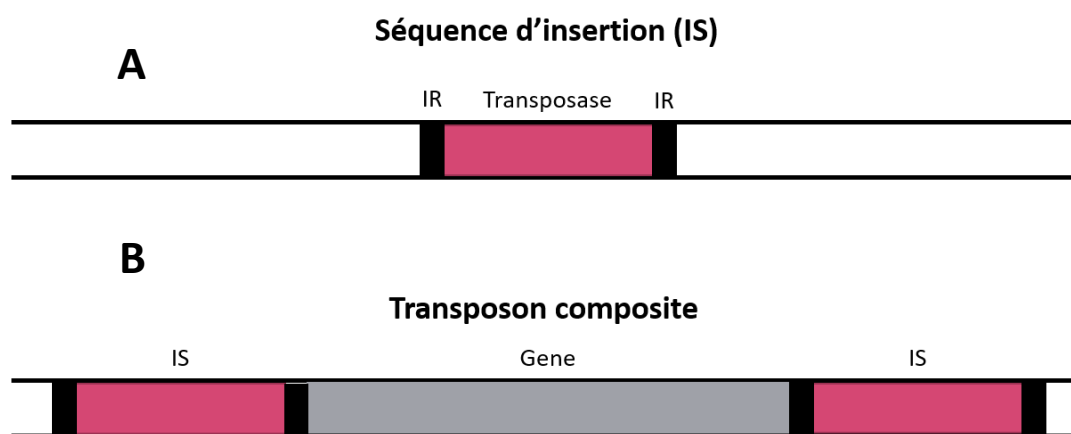


Figure 5 Séquences d'insertion et transposons composites

A : représentation d'une séquence d'insertion (IS). Les IS hébergent un gène qui code une transposase ; ce gène est encadré par deux séquences inversées répétées. IR : séquences inversées répétées.

B : représentation des transposons composites. Ils sont constitués de deux copies d'IS encadrant une séquence d'ADN.

Certains IS peuvent fournir des promoteurs à des gènes de résistance s'ils sont insérés proches de ces gènes. C'est le cas pour *Acinetobacter baumannii* où des promoteurs du gène

de résistance aux carbapénèmes *bla_{OXA-58}* sont fournis par des IS de la famille des IS6 (AI-

Hassan et al., 2015). Ainsi les IS jouent un rôle majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

Les transposons dits non-composites (ou simplement transposons) sont d'autres EGM flanqués de séquences inversées répétées capables de transposition au sein du génome bactérien. Leur différence par rapport aux IS réside dans le fait que ces transposons n'hébergent pas uniquement le gène de la transposase mais aussi d'autres gènes qui peuvent être notamment des gènes de résistance aux antibiotiques. On retrouve plusieurs transposons, notamment les transposons de classe II de la famille des Tn3 qui vont mobiliser des gènes de résistance aux β -lactamines (Partridge and Hall, 2005) ou les transposons de la famille Tn9 qui mobilisent des gènes de résistance au chloramphénicol (Partridge, 2011).

I.2. Les îlots génomiques

Il existe deux principaux types d'îlots génomiques : les ICEs (éléments intégratifs conjugatifs) et les IMEs (éléments intégratifs mobilisables).

Les ICEs sont des EGM capables de s'exciser du chromosome en un élément intermédiaire circulaire et qui se transfère de façon autonome par conjugaison (Burrus and Waldor, 2004). Ceci est possible car cet EGM possède tous les gènes nécessaires à ce transfert comme les plasmides. Mais contrairement à ces derniers, les ICEs sont incapables de réplication autonome et donc de se maintenir à long terme sous forme circulaire extra-chromosomique (Burrus et al., 2002).

Les ICEs sont des vecteurs de gènes de résistance aux antibiotiques et le plus caractérisé est l'îlot SXT. Cet élément a été décrit en premier chez *Vibrio cholerae* O139 en Inde (Waldor et al., 1996) mais il a été démontré que SXT était apparenté à l'élément R391 qui provient d'une souche de *Providencia rettgeri* d'Afrique du Sud (Beaber et al., 2002; Böltner et al., 2002). Cet îlot est activement impliqué dans la dissémination des gènes de résistance au chloramphénicol, au triméthoprime, au sulfaméthoxazole et à la streptomycine (Whittle et al., 2002). En outre, il a été montré que l'élément SXT/R391 (appelé aussi ICEPmiJpn1) retrouvé

chez *P. mirabilis* est porteur d'un gène de résistance *bla_{CMY-2}* (Harada et al., 2010) qui confère à la bactérie une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G).

Les IMEs sont des îlots génomiques semblables aux ICEs à la différence près qu'ils ne possèdent pas l'ensemble des gènes nécessaires au transfert conjugatif, ils ont donc besoin d'un plasmide conjugatif dit « *helper* » qui leur fournit toute la machinerie nécessaire à leur transfert (Bellanger et al., 2014; Burrus et al., 2002). Parmi les IMEs, on retrouve *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) qui est un îlot génomique découvert en premier chez les bactéries du genre *Salmonella*. SGI1 nécessite la présence d'un plasmide du groupe d'incompatibilité IncA/C (Doublet et al., 2005). Cet îlot a la particularité de posséder un intégron In104 qui est un intégron de classe 1 complexe (Levings et al., 2005). C'est sur cet intégron que sont portés tous les gènes de résistance aux antibiotiques de l'îlot génomique.

Il existe plus d'une trentaine de variants de cet IME dont SGI1-V chez *P. mirabilis* qui a un grand intérêt puisque c'est le premier variant présentant une résistance aux C3G car possédant le gène *bla_{VEB-6}* qui code une BLSE (β-lactamases à spectre élargi) (Siebor and Neuwirth, 2011). En 2014, un nouvel îlot génomique de multirésistance a été découvert chez *Proteus mirabilis* appelé *Proteus* Genomic Island 1 (PGI1) (Siebor and Neuwirth, 2014). Il possède des caractéristiques très semblables à SGI1. Un variant de PGI1 appelé PGI1-PmPEL et possédant le gène *bla_{VEB-6}* ainsi que le gène *bla_{NDM-1}* conférant, respectivement, une résistance aux C3G et aux carbapénèmes (antibiotiques de la famille des β-lactamines, d'importance critique pour la médecine humaine) a été retrouvé dans un échantillon d'urine (Girlich et al., 2015).

I.3. Les plasmides

Les plasmides sont des fragments d'ADN extra-chromosomiques le plus souvent sous forme circulaire et capables de répllication autonome. Cette répllication s'effectue à partir d'une origine de répllication appelée *ori* grâce à une protéine Rep. Cette dernière permet de classer les plasmides en différents groupes d'incompatibilités (IncA/C, IncF ou IncQ par exemple). Un

groupe d'incompatibilité regroupe un ensemble de plasmides qui ne peuvent pas coexister au sein de la même bactérie (Novick, 1987). Certains groupes d'incompatibilité s'expriment de façon stable dans la majeure partie des BGN (bactéries à Gram négatif) et des BGP (bactéries à Gram positif) (IncA/C, IncP et IncQ) alors que d'autres sont plus restreints au niveau de la bactérie hôte (IncF et IncI1).

La conjugaison est le mode de transmission le plus utilisé des plasmides, cependant certains plasmides sont dits non conjugatifs, ils ne sont pas transférables d'une cellule bactérienne à une autre.

Les plasmides peuvent porter d'autres EGM non conjugatifs comme les IS, les transposons ou les intégrons c'est pourquoi ils sont considérés comme les vecteurs majeurs de l'antibiorésistance. Les plasmides IncA/C, qui sont largement présents au sein des entérobactérales (Carattoli, 2009), sont connus pour diffuser des gènes de résistance aux β -lactamines tels que *bla*_{CMY-2} (Lindsey et al., 2009). Les gènes de β -lactamases *bla*_{CTX-M} sont majoritairement portés et donc disséminés par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité (IncF, IncI1, IncA/C, IncHI...) chez les entérobactérales (Dahmen et al., 2012).

I.4. Les intégrons

Les intégrons sont des éléments génétiques bactériens capables d'exciser, de capturer et d'exprimer des gènes, notamment des gènes de résistance aux antibiotiques, sous forme de cassettes. Localisés sur des plasmides et/ou des transposons et/ou des îlots génomiques, ils sont des acteurs majeurs de la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Il existe deux types d'intégrons, les intégrons sédentaires chromosomiques (ISC) et les intégrons dits de résistance (IR).

I.4.1. Les intégrons de résistance (IR)

Les intégrons de résistance (IR) sont des acteurs majeurs de la résistance aux antibiotiques. Ce sont des éléments génétiques permettant la capture, l'expression et l'excision de gènes, notamment de gènes de résistance aux antibiotiques, sous la forme de cassettes de gènes (CG) (Stokes and Hall, 1989). Les intégrons seuls ne sont pas mobiles mais ils sont localisés sur des structures mobiles comme les transposons ou les plasmides. Les intégrons sont composés d'une structure constante et d'une région variable (**Figure 6**).

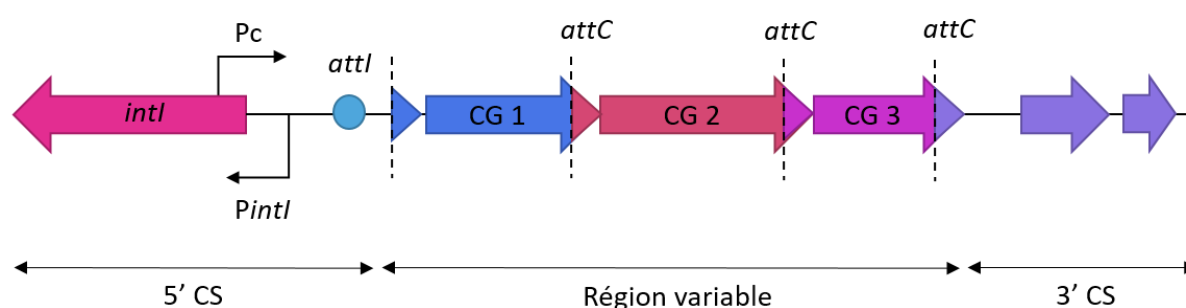


Figure 6 Structure d'un intégron

Représentation de l'organisation fonctionnelle d'un intégron de résistance. Un IR est composé d'une région constante nommée 5'CS, d'une région variable et d'une région constante nommée 3'CS. La région 5'CS contient le gène *intI* qui code une intégrase IntI et qui héberge le promoteur des cassettes Pc, un site de recombinaison *attI* et le promoteur du gène de l'intégrase *PintI*. La région variable peut contenir entre 0 et 10 cassettes de gène.

CG : cassette de gène

Les IR sont principalement retrouvés chez les bactéries à Gram négatif (BGN). Ils ont été montrés comme impliqués dans la dissémination de l'antibiorésistance au sein des entérobactéries (Kaushik et al., 2018). Les IR ont été retrouvés dans tous les genres qui composent cette famille. Mais ils ont également été décrits chez d'autres BGN comme les bactéries du genre *Aeromonas* (Deng et al., 2016), *Pseudomonas* (Moradian Kouchaksaraei et al., 2012), *Acinetobacter* (Liu et al., 2014), *Vibrio* (Rapa and Labbate, 2013) ou encore *Campylobacter* (Lee et al., 2002).

Cependant, certains IR ont été décrits chez des bactéries à Gram positif (BGP). Ils ont été trouvés pour la première fois dans une souche de *Mycobacterium fortuitum* en 1990 (Martin et

al., 1990). Depuis, ils ont été décrits dans des souches de *Corynebacterium* (Barraud et al., 2011; Nandi et al., 2004; Nesvera et al., 1998), de *Staphylococcus aureus* (Marathe et al., 2015; Xu et al., 2011, 2008), d'*Enterococcus* (Clark et al., 1999) et de *Streptococcus* (Shi et al., 2006) par exemple.

I.4.1.1. La région conservée 5'CS

I.4.1.1.1. L'intégrase IntI

L'intégrase IntI est une protéine appartenant à la famille des tyrosine recombinases spécifiques de site (Y-recombinases) (Nunes-Düby et al., 1998). Cette enzyme joue un rôle clé dans l'activité d'un intégron. Elle catalyse soit l'insertion de nouvelles CG préférentiellement par recombinaison entre le site *attI* et le site *attC*, soit l'excision des CG avec une recombinaison préférentiellement entre deux sites *attC*. L'activité de l'intégrase sera détaillée dans la partie **I.4.1.3 Le mouvement des cassettes page 40**.

La séquence en acides aminés de la protéine IntI détermine les différentes classes d'intégrons, actuellement cinq classes d'IR ont été décrites (Mazel, 2006). Les classes 1 à 3 sont prédominantes et les plus étudiées. Les intégrases des IR présentent des similitudes dans leur séquence protéique (Collis et al., 2002b) (**Tableau 1**).

Le promoteur du gène de l'intégrase, *P_{int}*, assure la transcription du gène *intl* dans le sens inverse de la transcription des cassettes présentes dans la région variable.

Tableau 1 Similitudes (bleu) et identité (rose) des séquences protéiques des intégrases des IR (d'après Collis *et al.*, 2002)

% d'identité/similarité de la séquence protéique

Intégrase	Intl1	Intl2	Intl3	Intl4	Intl5
Intl1	-	46	59	45	44
Intl2	63	-	47	49	48
Intl3	72	60	-	45	45
Intl4	64	62	62	-	94
Intl5	62	62	63	96	-

I.4.1.1.2. Le site de recombinaison spécifique *attI*

C'est un site primordial pour les intégrons car c'est le site qui est reconnu par l'intégrase pour venir intégrer et/ou exciser des cassettes. Il est composé au minimum de 63 pb et sa séquence varie en fonction de la classe d'intégron (Hall and Collis, 1998). On retrouve deux sites de fixation de l'intégrase appelés L et R. La boîte R contient un motif conservé de 7 pb GTTRRRY (G : pyrimidine, R : purine) dont le triplet 5'-GTT-3' est très conservé (la recombinaison des cassettes a toujours lieu entre G et TT). La boîte L est quant à elle plus variable. Ensemble, ces boîtes représentent le « site cœur » ou « site simple » de liaison avec Intl (Collis and Hall, 2004). En amont des boîtes L et R, on retrouve également deux autres sites de fixation de l'intégrase. Ces régions appelées DR1 (site de fixation fort) et DR2 (site de fixation faible) semblent non essentielles à l'activité de recombinaison mais augmentent son efficacité en maintenant la recombinase Intl à la bonne distance durant l'étape de recombinaison (Gravel *et al.*, 1998) (**Figure 7**). L'insertion des cassettes se faisant préférentiellement par recombinaison avec le site *attI*, les cassettes nouvellement intégrées se retrouvent donc les plus proches de *attI* et donc du promoteur Pc, permettant ainsi une expression maximale du gène qu'elles hébergent.

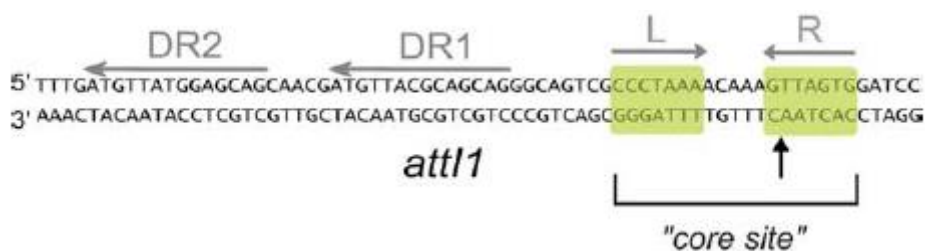


Figure 7 Structure du site de recombinaison spécifique *attI1* (Escudero et al., 2015)

Représentation de la structure du site de recombinaison spécifique *attI1*. Il est constitué d'une boîte L et d'une boîte R. La recombinaison a lieu au niveau du triplet hautement conservé 5'-GTT-3' qui se trouve au sein de la boîte R (marqué par une flèche noire). En amont se trouvent les boîtes DR1 et DR2 qui vont également se lier à l'intégrase IntI1 pour augmenter l'efficacité de l'enzyme.

Chaque intégrase a une forte spécificité avec son site *attI* correspondant à sa classe d'intégron. Les intégrases restent cependant capables de se fixer et de recombiner avec les sites *attI* d'autres classes mais avec une efficacité plus faible. Il a été montré que l'intégrase IntI1 est dans la capacité de reconnaître aussi les sites de recombinaison *attI2* et *attI3* pour réaliser une étape d'intégration d'une cassette de gène au sein du réseau de cassettes d'un intégron de classe 2 ou 3 (Collis et al., 2002a).

I.4.1.1.3. Le promoteur des cassettes Pc

Les cassettes présentes dans la région variable des intégrons ne possèdent généralement pas de promoteur propre. Leur expression est réalisée à partir du promoteur Pc, présent au sein du gène *intI* pour les intégrons de classe 1 et 3 et au sein du site *attI2* pour les intégrons de classe 2 (Collis and Hall, 1995; Jové et al., 2017). Cependant, de rares cassettes possèdent leur propre promoteur comme c'est le cas par exemple pour *cmIA1* (Bissonnette et al., 1991), *ere(A)* (Biskri and Mazel, 2003), et *qac* (Naas et al., 2001).

Les Pc, comme la majorité des promoteurs décrits chez *Escherichia coli*, sont composés de deux éléments fonctionnels appelés boîte « -35 » et boîte « -10 » espacés par une séquence de taille variable allant de 15 à 21 nt (Shultzaberger et al., 2007). Pour les intégrons de classe 1, treize variants différents du promoteur Pc ont été décrits en se basant sur les séquences

des boîtes « -35 » et « -10 » et sur la présence d'un motif « -10 étendu » qui est un motif TGN qui augmente l'efficacité de la transcription et qui est localisé en amont de la boîte « -10 » (Burr et al., 2000; Jové et al., 2010).

On retrouve principalement cinq variants (PcW ; PcH1 ; PcW_{TGN-10} ; PcH2 et PcS) qui possèdent chacun une force différente. Cette force a été déterminée expérimentalement et reflète leur degré d'identité avec la séquence consensus reconnue par le facteur de transcription σ^{70} de *E. coli*. En effet plus la séquence du Pc est proche de la séquence TTGACA-N₁₇-TATAAT, plus le niveau d'expression des cassettes de gènes est fort. Ainsi nous avons par ordre croissant de force le PcW, le PcH1, le PcW_{TGN-10}, le PcH2 et enfin le PcS (Jové et al., 2010) (**Tableau 2**).

Tableau 2 Principaux variants de Pc des IR1 (d'après Jové et al., 2010)

Variant de Pc	Séquence nucléotidique		Fréquence	Force relative
	« -35 »	« -10 »		
PcS	TTGACA - N ₁₄ - TCNT AAACT		24,30%	25
PcH2	TTGACA - N ₁₄ - TCNT AAGCT		4,40%	20
PcW _{TGN-10}	TGGACA - N ₁₄ - T <u>G</u> NT AAGCT		16,80%	18
PcH1	TGGACA - N ₁₄ - TCNT AAACT		28%	6
PcW	TGGACA - N ₁₄ - TCNT AAGCT		16,50%	1

Les substitutions présentes dans les boîtes « -35 » et « -10 » par rapport à la séquence du facteur de transcription σ^{70} sont représentés en gras. La fréquence des différents Pc a été obtenue suite à une analyse *in silico*. La force des variants de Pc est rapportée à celle du PcW (Pc le plus faible). PcS (Pc Strong) ; PcW (Pc Weak) ; PcW_{TGN-10} (Pc Weak avec une région TGN dans la boîte -10) ; PcH1 (Pc Hybride 1) et PcH2 (Pc Hybride 2).

De plus le niveau d'expression des cassettes varie également en fonction de la place de la cassette au sein du réseau de cassettes. Plus la cassette est proche du promoteur Pc plus le

gène hébergé par la cassette sera exprimé et inversement, plus la cassette est éloignée, moins son gène sera exprimé (Collis and Hall, 1995).

I.4.1.2. La région variable

La région variable est généralement constituée par une ou plusieurs CG, chacune étant l'association d'un gène et d'un site de recombinaison spécifique *attC*. Il existe également des intégrons vides ne contenant aucune cassette de gène.

I.4.1.2.1. Les cassettes

I.4.1.2.1.1. Structure des cassettes

Les cassettes constituent la partie variable et mobile d'un intégron. Elles possèdent une organisation commune, ce sont des éléments mobiles non réplicatifs de taille variable (de 191 à 3080 pb) (Jové et al., 2022), regroupés en unités individuelles avec des fonctions indépendantes. Elles présentent généralement un seul cadre ouvert de lecture (ORF) dépourvu de promoteur et un site de recombinaison spécifique *attC* (Recchia and Hall, 1995). Les cassettes sont des structures avec une forme circulaire non répliquative quand la cassette est libre ou avec une forme linéaire double brin quand la cassette est intégrée au sein du réseau de cassettes (Collis and Hall, 1992).

Le nombre de CG contenu dans un réseau de cassettes d'un IR peut varier, on retrouve en moyenne deux ou trois cassettes (Partridge et al., 2009). En 2013, un intégron de classe 1 avec un réseau de dix CG provenant d'une souche clinique de *Delftia tsuruhatensis* (GenBank : KC170993) a été décrit. Un intégron de résistance peut également ne posséder aucune cassette, l'intégron est dit vide (Bissonnette and Roy, 1992). Le nombre limité de cassettes au sein d'un intégron de résistance pourrait s'expliquer par le coût biologique. En effet une étude au sein de notre laboratoire a montré que le coût biologique d'un intégron

augmente de manière significative en fonction du nombre de cassettes présentes dans le réseau (Lacotte et al., 2017).

Une base de donnée appelée INTEGRALL répertorie l'ensemble des réseaux de cassettes connues et déposées librement sur GenBank pour les intégrons de classe 1, 2 et 3 ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>?; Moura et al., 2009).

I.4.1.2.1.2. Fonction des cassettes

Il y a plus d'une dizaine d'années, Sally Partridge et son équipe ont répertorié l'ensemble des CG disponibles en ligne dont 132 confèrent une résistance aux antibiotiques (Partridge et al., 2009). A l'heure actuelle, à l'aide de la base de donnée INTEGRALL, ce sont 535 CG qui sont répertoriées avec 36% d'entre elles qui hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques, et quasi la moitié (48%) qui hébergent un gène de fonction inconnue ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>?).

Les résistances apportées *via* ces CG touchent la plupart des familles d'antibiotiques : β -lactamines, aminoglycosides, chloramphénicol, triméthoprim, rifampicine, érythromycine, lincosamides, fosfomycine, quinolones et sulfamides (Jové et al., 2022). Certaines CG, appelés *qac*, confèrent une résistance aux ammoniums quaternaires. Ces derniers sont des molécules dérivées de l'ammoniac présentes notamment dans les détergents de surface et les désinfectants. Comme dit précédemment, une grande partie des CG ont une fonction inconnue, elles portent alors le nom de *gcu* (*gene cassette of unknown function*) (Jové et al., 2022; Xu et al., 2007).

Plus récemment, au sein de notre laboratoire, une étude a porté sur l'analyse qualitative du contenu en CG des intégrons issus d'effluents d'hôpitaux, d'abattoirs, de ville et de rivières. Elle a permis d'identifier 593 nouvelles cassettes jamais décrites auparavant augmentant ainsi la liste de cassettes connues à 1019 (I.1 CALYPSO page 86) (Jové et al., 2022).

I.4.1.2.2. Le site *attC*

En aval du gène présent dans une cassette, se trouve un site de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase et qui est spécifique à chaque cassette. De ce fait, les séquences des sites *attC* des cassettes d'IR ont une faible identité entre elles mais on retrouve une région palindromique conservée qui contient deux séquences inversées répétées appelées R''-L'' et L'-R' espacées par une région de taille variable. Ainsi les sites *attC* ont une taille qui varie entre 57 et 141 pb (Stokes et al., 1997).

Les sites R'' et R' sont deux régions habituellement inverses l'une de l'autre, appelés respectivement « site core » de séquence 5'-RYYAAC-3' et « site core inverse » de séquence 5'-GTTRRRY-3'. Malgré la forte diversité des séquences du site *attC*, on retrouve une conservation au niveau des triplets 5'-AAC-3' et 5-GTT-3' localisés respectivement dans la boîte R'' et R' (Stokes et al., 1997) (**Figure 8A**). Ils sont par ailleurs également présents au sein du site *attI*.

Du fait de la présence des séquences inversées répétées, un appariement se crée sur le brin anti-sens entre les régions R'' et R' ce qui induit la formation d'une structure secondaire en « tige-boucle » (**Figure 8B**).

C'est cette structure qui sera reconnue par l'intégrase (Francia et al., 1999; Johansson et al., 2004) et induira la recombinaison (Bouvier et al., 2005). Il y a alors dans ce cas reconnaissance d'une structure secondaire et non d'une structure primaire. Lors de l'étape de recombinaison, l'intégrase va se fixer sur les deux brins du site *attI* et sur le brin inférieur du site *attC* au niveau de la structure en « tige-boucle » (Escudero et al., 2015).

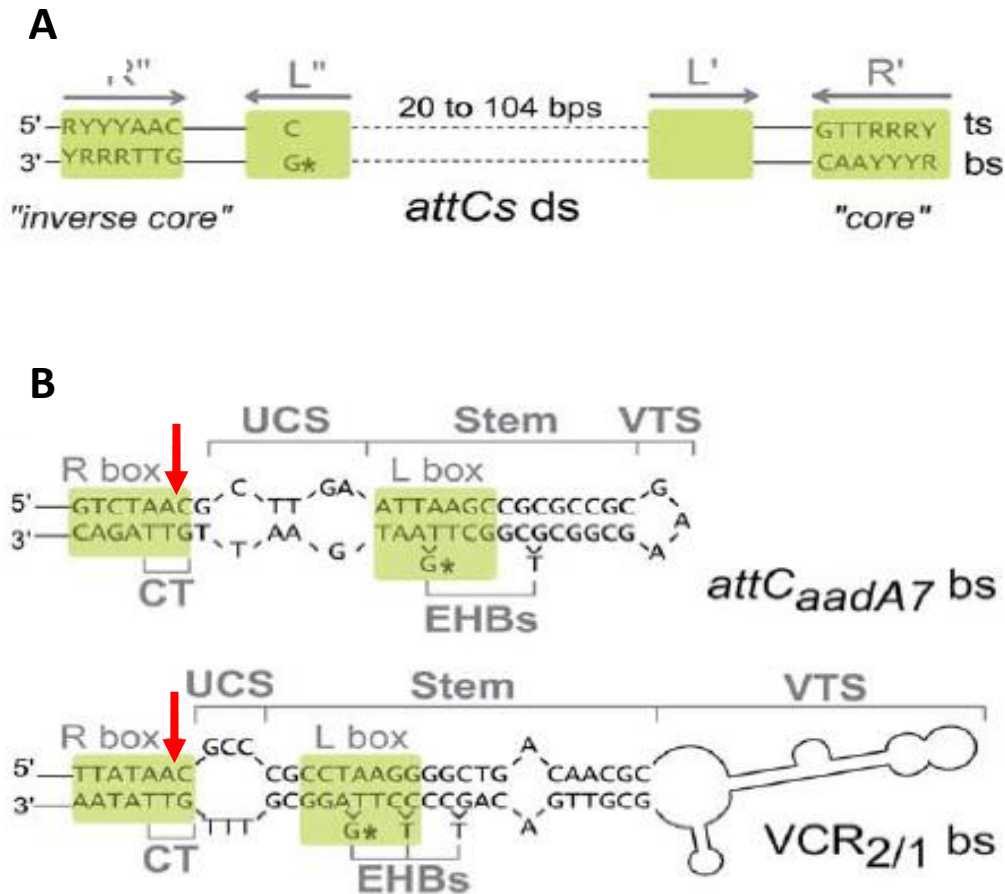


Figure 8 Structure du site de recombinaison spécifique *attC* (Escudero *et al.*, 2015)

A : Représentation de la structure du site de recombinaison spécifique *attC* ds. Le site est constitué de deux régions inversées répétées imparfaites R''L'' et R'L' séparées par une région de taille et de séquence variable. ts (top strand) : brin supérieur et bs : (bottom strand) : brin inférieur.

B : Exemples de structuration du site *attCaadA7* et *attCVCR_{2/1}*. Les boîtes L (L box) et R (R box) sont formées suite à un appariement des deux régions R''L'' et R'L' du brin du bas. Formation d'une structure tige-boucle reconnue et recombinée par l'intégrase IntI. Le point de recombinaison est marqué par une flèche rouge.

I.4.1.3. Le mouvement des cassettes

On retrouve deux mécanismes de recombinaison des cassettes qui sont tous deux catalysés par l'intégrase IntI et font intervenir les sites *attI* et *attC* :

- La recombinaison *attI/attC* : intégration préférentielle d'une cassette de gène.
- La recombinaison *attC/attC* : excision préférentielle d'une cassette de gène.

I.4.1.3.1. L'intégration par recombinaison *attI/attC*

L'intégration d'une cassette est faite de manière préférentielle par recombinaison entre un site *attI* et un site *attC*. Les cassettes libres, sous forme circulaire, sont toujours intégrées sous forme monobrin dans le sens 5'-3' et le plus proche possible du promoteur *P_c*, c'est-à-dire en première position dans le réseau de cassettes (Hall et al., 1991) (**Figure 9A**). L'intégrase va reconnaître et se fixer simultanément sur la séquence double brin du site *attI* et sur la séquence simple brin du brin inférieur du site *attC* de la cassette libre. Habituellement une recombinaison d'ADN se fait entre deux séquences d'ADN double brin, ici nous avons donc une recombinaison dite atypique due à la recombinaison double brin / simple brin. L'enzyme va par la suite catalyser un clivage entre le C et le deuxième A du motif 5'-CAA-3' de la boîte R du site *attC* puis un échange de séquences entre les deux sites. Il y a alors formation d'une jonction de Holliday atypique sous forme monobrin. Il a été démontré que la résolution de cette jonction de Holliday atypique fait intervenir une étape de réplication de l'ADN (Loot et al., 2012). Les cassettes de gène intégrés étant sous forme double brin, il faut donc une dernière étape d'élongation pour obtenir un double brin (Escudero et al., 2015). Cette intégration induit également la formation de sites *attI* et *attC* chimériques puisqu'une partie des bases formant les sites *attI* sont les bases originelles alors que la fin du site *attI* est constituée de bases issues de la cassette nouvellement intégrée. Cela vaut également pour le site *attC* de la cassette qui partage désormais ces bases avec une cassette précédemment intégrée (Escudero et al., 2015).

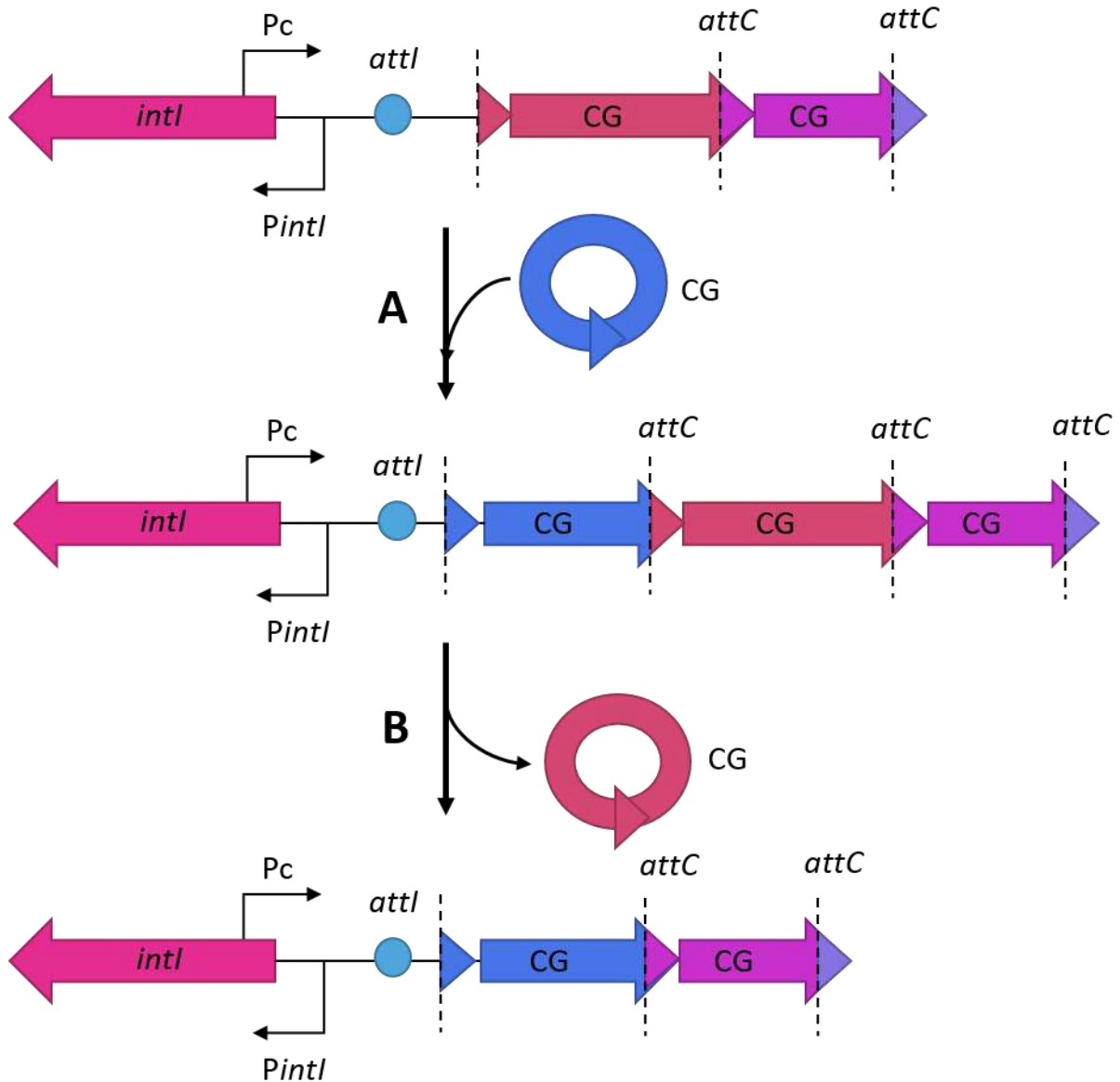


Figure 9 Mécanisme d'insertion et d'excision des cassettes

A : Mécanisme d'intégration des cassettes sous forme circulaire induite par une recombinaison entre le site *attI* et le site *attC*. L'intégration d'une cassette se fait ainsi préférentiellement en première position du réseau de cassettes.

B : Mécanisme d'excision des cassettes induite par une recombinaison entre deux sites *attC* libérant une cassette sous forme circulaire.

1.4.1.3.2. L'excision par recombinaison *attC/attC*

Le mécanisme de libération d'une ou plusieurs cassettes en dehors du réseau de cassettes sous forme de cassettes libres circulaire s'appelle l'excision (**Figure 9B**). Cette étape est également réalisée par l'intégrase lorsque celle-ci se fixe sur deux sites *attC* (l'un en amont de la cassette et l'autre en aval). L'excision est basée sur le même principe que

précédemment, il y a un clivage puis échange de brin qui conduit à nouveau à la formation d'une jonction de Holliday puis réplication supposée (Escudero et al., 2015).

La cassette libérée lors de l'excision pourra être intégrée en première position du même réseau de cassettes ou d'un autre réseau de cassettes si la bactérie héberge un autre intégron ; si ce n'est pas le cas, cette dernière sera perdue par la bactérie lors de l'étape de division cellulaire.

I.4.1.4. La régulation et l'expression des cassettes

I.4.1.4.1. Régulation de l'expression de l'intégrase *IntI*

L'expression de l'intégrase et le réarrangement des cassettes par cette dernière constituent un coût biologique aux bactéries. C'est pourquoi il est important pour les bactéries d'avoir une régulation de ce système (Harms et al., 2013). Une étude au sein de notre laboratoire a montré que l'expression du gène *intl* est régulée par la réponse SOS. L'alignement des séquences des régions promotrices du gène de l'intégrase de classe 1, 2, 3, 4 et 5 a permis de détecter la présence d'un site de fixation de la protéine LexA au sein de cette région (Guerin et al., 2009). La protéine LexA est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS des bactéries et est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN formés suite à différents stress tels que la présence d'antibiotiques (Erill et al., 2007). Naturellement, la protéine LexA va réprimer l'expression du gène de l'intégrase en se fixant sur son site spécifique situé au sein du promoteur *P_{int}*. Dès lors qu'il y a une lésion à l'ADN et apparition d'ADN simple brin (sb), la protéine RecA va se fixer à cet ADN et former un filament nucléoprotéique qui va ensuite être recruté par la protéine LexA et former un complexe LexA/filament nucléotidique. Ce complexe va entraîner le clivage de la protéine LexA et enlever la répression qu'exerce la protéine LexA sur le promoteur *P_{int}* en temps normal. Le promoteur *P_{int}* va alors pouvoir être fonctionnel et induire la transcription du gène de l'intégrase, intégrase qui va par la suite réaliser des mécanismes d'excision et d'intégration et ainsi permettre aux bactéries de réarranger leurs réseaux de cassettes.

Il a été montré *in vitro* que sous la pression de sélection exercée par le chloramphénicol, l'intégrase de classe 1 catalyse l'excision de cassettes de gène en amont de la cassette *catB9* (cassette impliquée dans la résistance au chloramphénicol) et de ce fait rapproche cette dernière du promoteur Pc pour augmenter son expression (Barraud and Ploy, 2015). A l'heure actuelle une seule étude a montré cela *in vivo*. Suite à une pression de sélection due à un traitement au métronidazole, Hocquet *et al.* ont décrit un réarrangement de cassettes chez une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée d'un patient souffrant d'infection pulmonaire (Hocquet et al., 2012).

I.4.1.4.2. Expression des cassettes

Comme dit précédemment, la majorité des cassettes décrites à ce jour sont dépourvues de promoteur propre et leur expression est dépendante du promoteur Pc. Le niveau d'expression des gènes peut varier en fonction du variant du promoteur Pc et de la position de la cassette au sein de la région variable.

I.4.1.4.2.1. Variant du promoteur Pc

Il a été démontré que la séquence du promoteur Pc joue sur l'expression des gènes présents dans les cassettes. Plus le variant du Pc est fort, plus l'expression des gènes est forte et inversement. Chez les intégrons, la séquence du promoteur influe sur la séquence en acides aminés de l'intégrase et sa capacité de recombinaison (**Tableau 2**).

I.4.1.4.2.2. La position des cassettes

Il a été montré que la position d'une cassette au sein du réseau des cassettes a une influence sur l'expression du gène qu'elle héberge. Plus la cassette est proche du promoteur Pc, plus elle sera exprimée et inversement (Collis and Hall, 1995). Ainsi lorsqu'une cassette se retrouve en dernière position ou très éloignée du promoteur Pc, son expression est très faible voire nulle. Mais il a été démontré qu'en cas de besoin, la bactérie peut réarranger le

réseau de cassettes de son intégron pour rapprocher une cassette très éloignée près du Pc afin que la cassette ait une expression plus forte (Barraud and Ploy, 2015).

I.4.1.5. Les différentes classes d'intégrons de résistance

Les intégrons de résistance sont classés en plusieurs classes en fonction de la séquence nucléotidique du gène de l'intégrase. A l'heure actuelle, cinq classes d'IR ont été décrit parmi lesquelles les trois premières sont les principales.

I.4.1.5.1. Les intégrons de résistance de classe 1 (IR1)

Les IR1 sont à l'heure actuelle les intégrons les plus étudiés. Ils sont majoritairement décrits en clinique et plus spécifiquement chez des souches de bactéries à Gram négatif même si quelques fois des IR1 ont été trouvés chez des bactéries à Gram positif. On retrouve des IR1 partout dans le monde, sur tous les continents y compris en Antarctique où ils ont été détectés pour la première fois dans des souches d'*Escherichia coli* en 2016 (Power et al., 2016).

Ils sont le plus souvent portés par des plasmides ou des transposons de la famille Tn3 (Tn21 ou Tn1969) (Hall, 1997). Le gène de l'intégrase *intI1* code une protéine de 337 aa. La séquence en aval de la région variable, appelée région 3'CS, est très souvent conservée. Elle est composée de trois gènes : *qacEΔ1* (confère une résistance aux ammoniums quaternaires), *sul1* (confère une résistance aux sulfamides) et *orf5* (fonction inconnue) (Recchia and Hall, 1995).

Cette classe d'IR joue un rôle essentiel dans la dissémination de l'antibiorésistance car la région variable est essentiellement composée de CG qui hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques (Partridge et al., 2018). Plusieurs études ont montré que les CG les plus prédominantes au sein des IR1 sont les cassettes *aadA* et *dfrA* qui confèrent des résistances à la streptomycine / spectinomycine et au triméthoprime respectivement (Fluit and Schmitz, 2004; van Essen-Zandbergen et al., 2007). Du fait du grand nombre de CG décrites chez les

IR1 (Partridge et al., 2009), il existe une multitude de réseaux de cassettes. La base de données INTEGRALL regroupe l'ensemble de ces réseaux déposés dans la GenBank et à l'heure actuelle (juin 2022) elle compte 1475 réseaux différents d'IR1 ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>).

Les IR1 sont largement présents au sein des souches cliniques mais ils sont de plus en plus décrits dans des souches d'origine animale (Gillings, 2017; Y.-G. Zhu et al., 2017) ou environnementale (Gillings et al., 2015; Stalder et al., 2014).

I.4.1.5.2. Les intégrons de résistance de classe 2 (IR2)

Les IR2 ont une prévalence plus faible que celle des IR1. Ils sont souvent décrits en clinique mais sont également retrouvés dans divers environnements (sols, milieux aquatiques etc). On les retrouve très souvent associés au transposon Tn7 ainsi que leur dérivés (Hansson et al., 2002). Le gène de l'intégrase, *intl2*, code une protéine de 325 aa qui à 50% d'identité avec le gène *intl1* (Hall et al., 1999). La plupart des protéines Intl2 présente une mutation en position 179 (TAA) ce qui aboutit à un codon STOP prématuré et à une protéine Intl2 tronquée de seulement 178 aa qui n'est pas fonctionnelle (Hansson et al., 2002). Les Intl2 non fonctionnelles sont majoritaires dans les IR2, de ce fait il y a peu de réarrangements de CG et leur réseau de cassettes est très stable. Il est composé des CG suivantes : *dfrA1* ; *sat2* et *aadA1* qui confèrent respectivement des résistances au triméthoprim, à la streptothricine, et à la streptomycine/spectinomycine. Il a été démontré *in vitro* que la substitution du codon STOP par un triplet GAG codant un acide glutamique permet la production d'une intégrase fonctionnelle avec une activité de recombinaison chez les IR2 (Hansson et al., 2002). Il a été décrit en 2006 un IR2 sans codon STOP dans la séquence nucléotidique de l'*intl2* chez une souche de *Providencia stuartii*. Le réseau de cassette associé était composé de neuf CG de fonctions inconnues (Barlow and Gobius, 2006).

Toutefois, malgré la présence de cette intégrase non fonctionnelle, d'autres réarrangements de cassettes ont été décrits. En 2003 une cassette de résistance à l'érythromycine, *ereA*, a

été décrite au sein d'un IR2 provenant d'une souche d'*E. coli*. La région variable de cet intégron se composait des cassettes suivantes *sat2-ereA-aadA1-orfX* et son expression était assurée par un promoteur au sein de la cassette (Biskri and Mazel, 2003). En 2005, l'équipe de Ramirez a décrit dans trois souches cliniques d'*Acinetobacter baumannii* (AB2, AB28 et AB29) un nouveau réarrangement de cassettes d'IR2 appelé Tn7::In2-8. Le réseau de cassettes contenait trois nouvelles CG (*sat2*, *aadB* et *catB2*) insérées en amont des trois CG habituelles (Ramírez et al., 2005a). De plus un réarrangement singulier avec uniquement la cassette *sat2* (appelé Tn7::In2-1) a été trouvé par cette même équipe chez une souche de *Burkholderia cenocepacia* (Ramírez et al., 2005b). Une étude de surveillance rétrospective des intégrons en Chine de 2001 à 2005 a montré que les IR2 étaient présents chez 33 sur les 583 souches testées (5.7%) (Xu et al., 2010, 2009).

Les IR2 ont donc une région variable très stable quand l'intégrase est tronquée mais lorsque cette intégrase est fonctionnelle, différents réseaux de cassettes sont retrouvés. Ces derniers contiennent des CG qui sont normalement retrouvées chez les IR1, ce qui suggère que des échanges de CG sont possibles entre des IR1 et des IR2 (Mendes Moreira et al., 2019).

1.4.1.5.3. Les intégrons de résistance de classe 3 (IR3)

Les IR3 sont les intégrons les moins étudiés parmi les trois classes principales d'intégrons (à l'heure actuelle seulement une vingtaine d'articles publiés). Ils sont principalement retrouvés dans l'environnement (Stalder et al., 2014) mais, ils ont été principalement décrits dans un contexte clinique. Comme les IR1, ils sont associés aux Tn402 (Collis et al., 2002a; Xu et al., 2007) et leur gène *intl3* code une protéine de 346 aa qui présente plus de 50% d'identité avec Int1. L'intégrase Int3 est fonctionnelle et capable de catalyser des réactions d'excision et d'intégration (Hall et al., 1999). Il existe deux promoteurs putatifs pour l'expression de l'intégrase Int3, appelés Pint3 (1) et Pinit3 (2) (Collis et al., 2002b), et il a été démontré lors de la thèse de Pierrette Tchuinte au sein du laboratoire que seul le promoteur Pint3 (1) est capable d'assurer l'expression du gène *intl3*. Il existe 4 variants du

promoteur *PintI3* (1). L'expression du gène de l'intégrase *intI3* est potentiellement régulée par la réponse SOS car lors de sa thèse, elle a également démontré que la protéine LexA se fixe bien sur la boîte LexA présente au sein du promoteur *PintI3* (1) (Thèse Pierrette Tchuinte, Université de Limoges, 2016). Les CG qui composent le réseau de cassettes des IR3 confèrent des résistances principalement aux β -lactamines et aux aminoglycosides, mais on retrouve également de nombreuses CG avec une fonction inconnue ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>).

Le premier IR3 a été décrit en 1995, isolé d'une souche clinique de *Serratia marcescens* (AK9373) au Japon (Arakawa et al., 1995). Nommé In3-1 par l'équipe de Xu (Xu et al., 2007), sa région variable est composée de deux CG *bla*_{IMP-1} et *aac*(6')-Ib qui confèrent une résistance aux carbapénèmes et aux aminoglycosides respectivement (Arakawa et al., 1995). Depuis, peu d'IR3 ont été décrits dans des souches cliniques (Correia et al., 2003; Kargar et al., 2014; Papagiannitsis et al., 2015; Poirel et al., 2010). Au niveau animalier, les IR3 ont très rarement décrits. En 2010, le gène de l'intégrase *intI3* a été détecté dans des huîtres d'une rivière de Géorgie aux Etats-Unis (Barkovskii et al., 2010). Plusieurs études ont montré que les IR3 sont principalement retrouvés dans l'environnement. Les premiers IR3 décrits dans l'environnement (boues activées) sont les IR3-3 et IR3-4 et ont été isolés dans des souches de *Delftia acidovorans* C17 et *Delftia tsuruhatensis* A90 respectivement. Leur région variable comprend des CG de fonctions inconnues (*orfA* ; *orfB* ; *orfC/fD* ; *orfE*) (Xu et al., 2007). Des études de métagénomique ont montré une forte prévalence des IR3 dans l'environnement (Moura et al., 2010; Stalder et al., 2014). En 2016, un nouvel IR3, appelé IR3-13, a été décrit dans une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolé d'une fraise de production biologique (Jones-Dias et al., 2016). C'est la première fois qu'un IR3 est détecté dans des fruits et une analyse de sa séquence montre une correspondance de 100% avec l'IR3-9 (KT984195) isolé d'une souche de *Citrobacter freundii* trouvée dans des effluents d'un hôpital au Luxembourg (Simo Tchuinte et al., 2016).

I.4.1.5.4. Les intégrons de résistance de classe 4, 5 et 6 (IR4, IR5 et IR6)

Les IR4 ont été décrits pour la première fois chez une souche de *Vibrio cholerae* (Mazel et al., 1998). Cet IR4 est localisé au sein du chromosome bactérien dans un élément intégratif conjugatif (ICE) (Clark et al., 2000). Actuellement la base de données INTEGRALL recense huit IR4 qui contiennent principalement des CG de fonction inconnues et qui ont toutes été isolées de souches de *V. cholerae* (“INTEGRALL,” <http://integrall.bio.ua.pt/>).

Le premier IR5 a également été décrit chez une souche de la famille des Vibrionaceae, appelée *Aliivibrio salmonicida*. Cet IR5 était associé à un plasmide pRSV1 et sa région variable contenait une seule CG *dfr* qui confère une résistance au triméthoprim (GenBank: AJ277063.1). Un seul autre IR5 est répertorié dans la base de données INTEGRALL. Il s'agit d'un IR5 isolé d'une souche de *Vibrio mimicus* contenant une seule CG au sein de sa région variable, *vco33*, de fonction inconnue (GenBank: AF179595.1).

Au sein du laboratoire, Thomas Jové (modérateur de la base de données Integrall) a identifié une nouvelle classe d'intégron appelée classe 6 dans le génome d'une souche clinique d'*E. coli* provenant du Pérou. La région variable de cet IR6 contient 9 CG (trois CG conférant une résistance aux antibiotiques et six CG de fonctions inconnues) (Jové, 2021). En 2016, l'équipe de Gillings a également décrit dans une souche environnementale un IR6 avec une potentielle protéine de fonction inconnue dans sa région variable (GenBank: AF314191.1). Du fait de la présence de protéines de fonctions inconnues, l'implication de ces IR dans l'antibiorésistance est limitée.

I.4.2. Les intégrons sédentaires chromosomiques

Les intégrons sédentaires chromosomiques (ISC) ou anciennement appelés super-intégrons ont été décrits la première fois sur le chromosome 2 d'une souche de *Vibrio cholerae* en 1998 (Mazel et al., 1998). Cet intégron possède une intégrase spécifique, appelée VchIntIA, qui est semblable aux différentes intégrases présentes dans les IR (Heidelberg et al., 2000).

Ils se distinguent des IR par trois caractéristiques majeures : (i) leur présence exclusivement sur le chromosome bactérien, ils sont non mobiles; (ii) leur région variable peut contenir un nombre très élevé de cassettes (jusqu'à 200 cassettes) qui codent généralement des protéines de fonctions inconnues et qui ne sont pas impliquées dans la résistance aux antibiotiques et (iii) les sites *attC* des cassettes sont très conservés, ils présentent plus de 80% d'identité entre eux (Mazel et al., 1998).

A l'heure actuelle les ISC sont connus pour faire partie intégrante du génome des γ -protéobactéries. Ils ont été identifiés au sein de la famille des Vibrionaceae de même pour la famille des Xanthomonadaceae qui leur est proche ainsi que les Pseudomonadaceae. On les retrouve également chez des β -protéobactéries et σ -protéobactéries.

Partie II. Antibiorésistance et environnement

II.1. Méthodes d'analyses de l'antibiorésistance dans l'environnement

L'environnement est constitué de bactéries très diverses et variées et les méthodes de cultures traditionnelles ne permettent pas d'étudier l'ensemble de ces bactéries (beaucoup de bactéries non cultivables ou avec des conditions de culture très spécifiques). Il a été estimé que seulement 1% des bactéries environnementales pouvaient être isolées (Amann et al., 1995). De plus, la détection de la résistance aux antibiotiques est traditionnellement basée sur une sélection phénotypique. Les bactéries d'intérêt sont sélectionnées en milieu liquide ou solide en présence d'antibiotiques. Pour obtenir des résultats, il faut attendre que les bactéries se multiplient, un à deux jours pour les bactéries qui se développent vite (*Escherichia coli* ou *Salmonella*) et jusqu'à plusieurs jours pour des bactéries comme *Mycobacterium* sp. Pour pallier à ce temps d'attente, des méthodes de détection par qPCR ciblées contre certains gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) ont été mises au point (Shaheen et al., 2009; Waseem et al., 2019), permettant ainsi de détecter des gènes d'intérêt en seulement quelques heures à partir d'ADN extraits de prélèvements environnementaux ou directement à partir de souches bactériennes. Ces techniques restent cependant limitantes en raison de l'absence d'informations concernant les bactéries non cultivables présentes en majorité dans l'environnement et les amorces utilisées ciblent des gènes déjà bien connus et passent à côté de probables gènes de résistance non connus à l'heure actuelle. C'est pourquoi il est nécessaire de trouver des méthodes de détection de gènes de résistance aux antibiotiques sans avoir besoin de cultiver les bactéries en amont.

Avec l'arrivée du séquençage de deuxième génération (NGS), des études basées sur l'étude de l'ensemble des génomes, appelée métagénomique, ont été développées. Grâce à ces techniques, l'écosystème environnemental a pu être beaucoup mieux étudié (Schmieder

and Edwards, 2012). Mais plus de 60% des gènes de résistance retrouvés dans les effluents se trouvent sur des EGM (Buelow et al., 2020) ce qui rend assez difficile de connecter ces gènes de résistance aux génomes associés (Lerminiaux and Cameron, 2019; Sultan et al., 2018). Une étude a comparé la méthode métagénomique et la méthode de culture classique indépendamment et il a été montré que les GRA associés aux EGM étaient prédominants dans le résistome des stations d'épuration des eaux usées (STEU) et leur abondance relative augmente dans les effluents (Che et al., 2019). La métagénomique est un outil très utile pour détecter la présence des gènes de résistance mais une de ses limites est l'absence d'informations sur la fonctionnalité ou l'expression de ces gènes. C'est pourquoi il est aussi important d'associer la métagénomique avec d'autres outils.

II.2. La pollution anthropique

L'activité humaine a une influence directe ou indirecte sur la pollution de l'environnement appelé pollution anthropique. Les principaux types de pollution anthropique décrits sont le déversement des boues d'épandage ou d'épuration sur les sols pour leur fertilisation (Roberts, 2018; Surette and Wright, 2017) et la contamination des eaux par les effluents de diverses origines (Roberts, 2018). Les effluents anthropiques (urbains, hospitaliers, industriels, d'abattoirs) traités ou non dans les STEU sont considérés comme des sources de BMR et de GRA (Bielen et al., 2017; Duan et al., 2019; Laquaz et al., 2018).

II.2.1. Les effluents anthropiques et l'antibiorésistance

Les eaux usées, appelées également effluents, sont principalement polluées par les fèces, qu'elles soient d'origine humaine ou animale. Le microbiote digestif est non seulement une source importante de GRA (Sommer et al., 2010) mais aussi de molécules d'antibiotiques. En effet il a été estimé que les fèces d'origine humaine ou animale représentent respectivement 57,6% et 42,6% des rejets d'antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire (Chen et al., 2020; Sarmah et al., 2006). La pollution fécale, qu'elle soit humaine

ou animale, est donc impliquée dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans les effluents (Karkman et al., 2019). D'origines différentes, ces effluents sont donc le plus grand vecteur de pollution dans l'environnement et c'est pourquoi il faut y prêter beaucoup d'attention et évaluer leur impact (Stalder et al., 2014).

II.2.1.1. Les effluents hospitaliers

Les hôpitaux, de par leur activité, sont des établissements très consommateurs d'antibiotiques, ce qui va favoriser la sélection et la multiplication de BMR porteuses de GRA. Pour étudier et détecter ces gènes dans les effluents hospitaliers, plusieurs méthodes de détection ont été utilisées selon les études. Les GRA ont été majoritairement détectés par PCR en ciblant directement les gènes d'intérêt avec des amorces spécifiques, leur détection étant associée ou non à une détection phénotypique (Hassoun-Kheir et al., 2020). Parmi ces études, certaines ont utilisé le NGS en plus de la PCR pour identifier les gènes de résistance. Grâce à ces techniques, il a été possible de montrer que les effluents hospitaliers présentent un profil de résistance différent du reste des effluents anthropiques. Cela peut être possiblement lié à une plus grande consommation d'antibiotiques dans ces établissements (Buelow et al., 2018; Wang et al., 2018). En plus d'être unique, ce profil de résistance semble stable dans le temps (Buelow et al., 2020) (**Figure 10**).

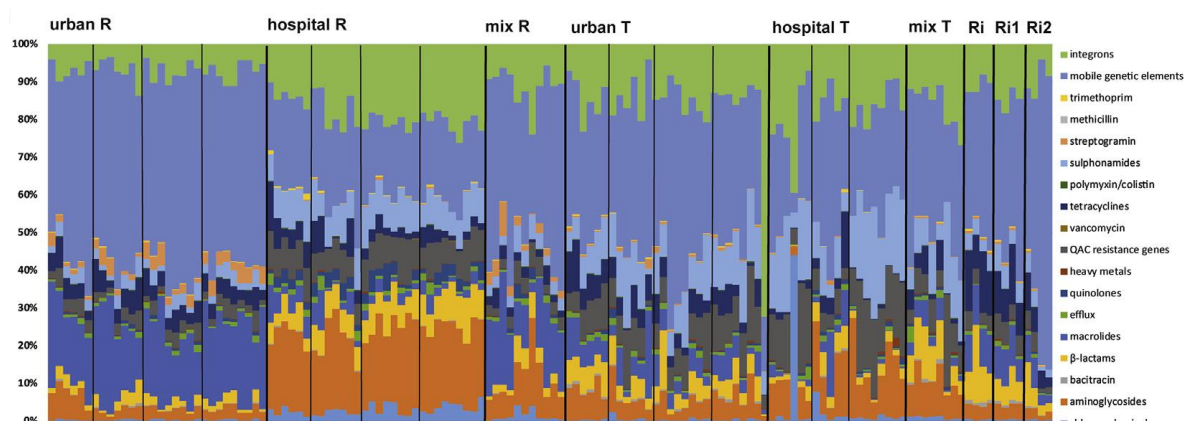


Figure 10 Abondance du résistome dans les effluents non traités et traités et des rivières en amont et aval de STEU au cours du temps (2012-2015) (Buelow et al., 2020)

Proportion des abondances du résistome des effluents urbains, hospitaliers et mélangés avant (R) et après (T) traitement ainsi que des rivières en amont (Ri) et en aval (Ri1 et Ri2) de la STEU sur une période allant de 2012 à 2015.

Plusieurs études ont montré dans les effluents hospitaliers une plus grande quantité d'entérobactéries porteuses de gènes de résistance. Les GRA les plus fréquemment retrouvés dans ces bactéries sont les β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Blaak *et al* ont montré que les BLSE (*bla*_{CTX-M-1}; *bla*_{CTX-M-2} ; *bla*_{CTX-M-9} ; *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} et *bla*_{TEM}) étaient présentes dans 34% des isolats issus d'effluents hospitaliers contre seulement 1,3% des isolats issus d'effluents urbains (Blaak et al., 2015), ce qui a été confirmé par de nombreuses autres études (Bréchet et al., 2014; Ebomah and Okoh, 2020; Galvin et al., 2010; Harris et al., 2013; Hassoun-Kheir et al., 2020; Korzeniewska et al., 2013; Kwak et al., 2015; Lamba et al., 2017). La BLSE la plus fréquemment retrouvée dans les effluents hospitaliers est codée par le gène *bla*_{CTX-M}, qui présente plusieurs variants (Chagas et al., 2011).

Les carbapénèmes sont des antibiotiques d'importance critique en médecine humaine car ils sont utilisés en dernier recours à l'hôpital pour traiter les infections à BMR (bactéries productrices de BLSE par exemple) (Remoué et al., 2017). Il a été rapporté une forte présence de différents gènes de carbapénémases (*bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC} et *bla*_{GIM}) dans des effluents hospitaliers contrairement à une faible présence ou une absence totale de ces gènes dans les effluents agricoles (Müller et al., 2018; Teban-Man et al., 2022, 2021)

(Figure 11).

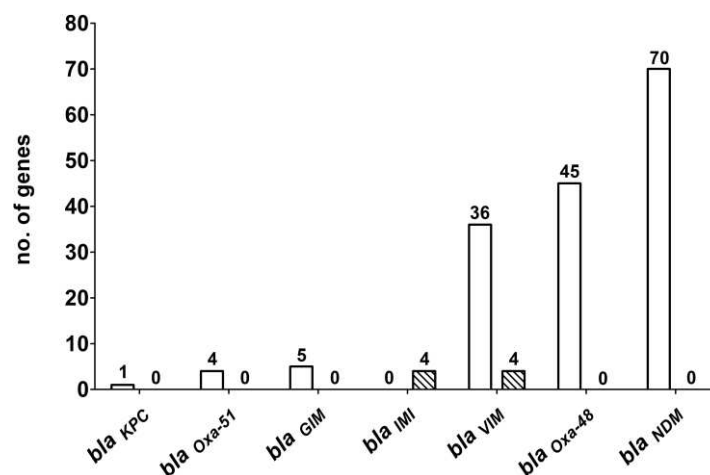


Figure 11 Distribution des gènes de carbapénémases détectées dans des bactéries isolées d'effluents hospitaliers versus d'effluents agricoles (Müller *et al.*, 2018)

Distribution des différents gènes de carbapénémases détectés dans 475 différentes souches isolées d'effluents hospitaliers (en blanc) et 568 souches isolées d'effluents agricoles (en hachuré noir et blanc).

Le gène de résistance aux carbapénèmes le plus détecté/recherché dans les effluents hospitaliers est le gène *bla_{NDM}* (Islam et al., 2017; Lamba et al., 2018, 2017; Ludden et al., 2017; Meir-Gruber et al., 2016; Proia et al., 2018). Ce gène très présent en Asie code une métallo- β -lactamase qui est insensible à l'action des inhibiteurs de β -lactamases.

Les gènes de résistance aux sulfamides sont aussi présents dans ce type d'effluent anthropique. Les gènes *sul1*, *sul2* et *sul3* sont prévalents dans les effluents de STEU (Xu et al., 2015). Ces gènes sont généralement retrouvés associés et sont souvent présents sur des EGM (Yu et al., 2016).

Des gènes de résistance à la pénicilline chez les staphylocoques, *mecA*, ont été détectés exclusivement dans des biofilms d'effluents hospitaliers (Schwartz et al., 2003). Une autre étude a également retrouvé dans des effluents hospitaliers *mecA* en plus d'autres gènes de résistance, *tetA* et *tetB* qui sont impliqués dans la résistance à la tétracycline et un gène de résistance aux aminoglycosides (*aac(60)-Ie + aph(2'')*) (Börjesson et al., 2010).

En 2020, une revue a investigué le rôle des effluents hospitaliers versus les effluents urbains : 81% (30/37) des études décrivent une fréquence des GRA plus importante dans les effluents hospitaliers, comparée aux autres effluents anthropiques (Hassoun-Kheir et al., 2020). Cependant, certaines études ont montré le contraire. Blanch *et al* a étudié un grand panel de souches provenant d'effluents hospitaliers et de STEU municipales et a montré une grande variation des prévalences selon le pays d'origine des souches ou du gène de résistance étudié avec parfois une plus grande prévalence dans les effluents urbains (Blanch et al., 2003). Cette étude a une limite car l'évaluation de la pollution des effluents a été réalisée dans la STEU, c'est-à-dire après le déversement des effluents hospitaliers dans les effluents urbains. Ce qui est également le cas pour d'autres études rendant difficile l'étude de l'impact que peuvent avoir les effluents hospitaliers par rapport aux effluents urbains (Börjesson et al., 2009; Schwartz et al., 2006, 2003).

L'impact des effluents hospitaliers après traitement dans la STEU et le déversement dans les rivières ont été étudiés. En 2010, Passerat *et al* ont montré que les effluents

hospitaliers sont contaminés très fortement par des bactéries fécales contenant beaucoup de GRA et que les traitements dans les STEU ne sont pas suffisants pour les éliminer totalement. Mais les effluents hospitaliers ne sont pas la source majoritaire de pollution fécale dans le bassin de la Seine (Passerat et al., 2010). Ces conclusions ont également été trouvées par d'autres études quand les effluents hospitaliers sont mélangés aux effluents urbains en amont de la STEU (Buelow et al., 2020; Teban-Man et al., 2022) (**Figure 12**).

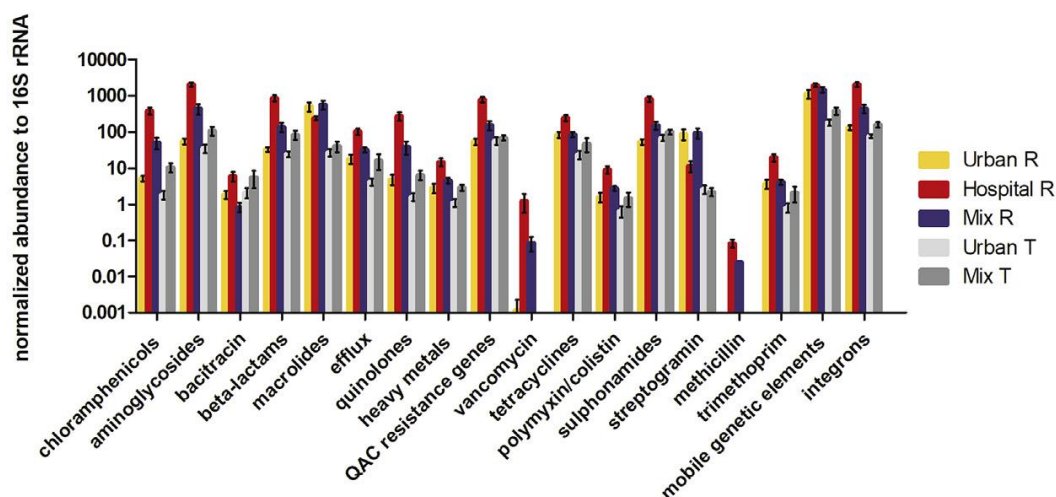


Figure 12 Abondance relative normalisée de différentes classes de gènes de résistance aux antibiotiques, de métaux lourds, d'éléments génétiques mobiles et d'intégrons dans différents types d'effluents (Buelow et al., 2020)

Abondance relative normalisée de différents gènes et EGM présents dans des effluents urbains (en jaune), des effluents hospitaliers (en rouge), un mélange d'effluents urbains et hospitaliers (en violet), des effluents urbains traités à le STEU (en gris clair) et un mélange d'effluents urbains et hospitaliers traités à la STEU (en gris foncé).

Les effluents hospitaliers sont donc des sources importantes de GRA et jouent un rôle plus ou moins certain dans la dissémination de la résistance dans l'environnement.

II.2.1.2. Les effluents d'abattoirs

Les fermes d'élevage d'animaux sont, comme les hôpitaux, des lieux où les bactéries commensales des animaux sont soumises à une pression exercée par les antibiotiques et leurs effluents contribuent donc également à la dissémination de l'antibiorésistance. Une coordination au niveau européen du suivi des ventes d'antibiotiques en santé animale a été

mise en place en 2010 par l'EMA (Agence européenne des médicaments). En 2020, la France a consommé 56,6mg/kg d'antibiotiques vétérinaires, ce qui est inférieur à la moyenne européenne (89mg/kg) mais reste conséquent ("Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020," 2021). Cet usage des ATB dans les fermes d'élevages est impliqué dans la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement au même point que l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine (Barlow et al., 2009). Les échanges de gènes de résistance entre les souches d'origine humaine et animale ont été démontrés et posent un sérieux problème en santé publique (van den Bogaard and Stobberingh, 2000).

De 2012 à 2017, en France, le ministère de l'agriculture a mis en place un plan d'action national pour surveiller l'antibiorésistance et réduire les risques liés à l'antibiorésistance en médecine vétérinaire (*Le plan Ecoantibio (2012-2017)*, 2012). Il se compose de cinq axes :

- Promouvoir les bonnes pratiques et sensibiliser les acteurs.
- Développer les alternatives évitant les recours aux antibiotiques.
- Renforcer l'encadrement des pratiques commerciales et des règles de prescription.
- Améliorer le dispositif de suivi de la consommation des antibiotiques et de l'antibiorésistance.
- Promouvoir la même approche à l'échelon européen et international.

Suite au succès du premier plan, Ecoantibio 2 a été mis en place, cette fois-ci composé de quatre axes semblables au premier plan (*Le plan Ecoantibio 2 (2017-2022)*, 2017).

De plus l'agence nationale de sécurité sanitaire des aliments (ANSES) a son propre réseau de surveillance appelé Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (RESAPATH). Il vise à surveiller l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales en France en menant plusieurs études.

Suite à ces plans d'action nationaux, l'usage des antibiotiques a diminué depuis ces dernières années (**Figure 13**) et a eu pour conséquence une diminution des résistances de plusieurs bactéries.

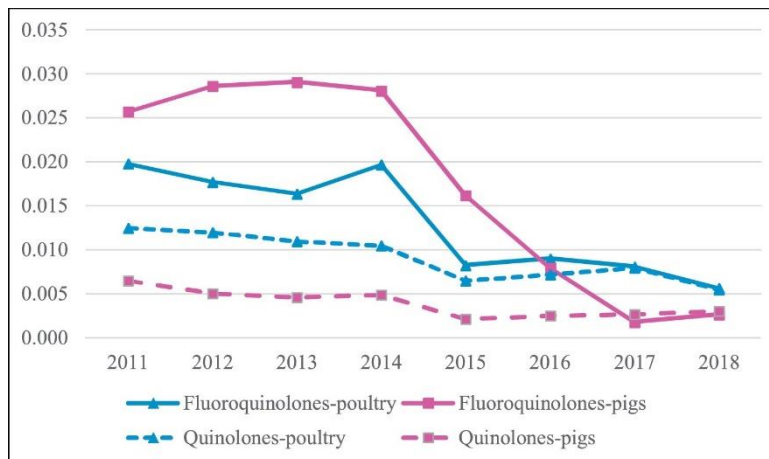


Figure 13 Exposition des élevages de volailles et de porcins aux quinolones et fluoroquinolones (Anses-ANMV, 2019)

Evolution de l'exposition des élevages de poulets (en bleu) et de porcs (en rose) face aux fluoroquinolones (ligne continue) et aux quinolones (ligne pointillés) de 2011 à 2018 en France.

En effet, une diminution des résistances pour quatre familles d'antibiotiques a été montrée chez des souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et de streptocoques du groupe C chez le cheval (Léon et al., 2020). Une diminution des résistances aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) chez des souches d'entérobactéries isolées d'animaux de ferme malades a été observée en passant de 26% en 2010 à 5% en 2016 (Bourély et al., 2018). De 2011 à 2018, une diminution de la résistance aux fluoroquinolones de 71,5% pour la volaille et de 89,7% pour les cochons a été rapportée. Il a été montré que suite à cette diminution, la résistance associée à cet antibiotique a diminué chez des souches de *E. coli*, passant de 9% en 2010 à 5,4% en 2018 (Perrin-Guyomard et al., 2020). Mais d'autres résistances comme celles à la ciprofloxacine ont augmenté chez les souches de *Campylobacter* isolées de volailles.

Les méthodes de détection de la résistance dans les abattoirs reposent sur des méthodes traditionnelles (culture bactérienne avec antibiogrammes), des méthodes moléculaires (PCR, qPCR, RT-PCR) et de la métagénomique (S P Galhano et al., 2021).

Les études portant sur les résistances dans les abattoirs sont beaucoup plus portées sur les animaux ou les fèces des animaux (Lavilla Lerma et al., 2014; Pexara et al., 2020; Y.

Zhu et al., 2017) et très peu sur les effluents et la dissémination dans l'environnement. Une étude a montré une forte présence de gènes de résistance à la ciprofloxacine chez des souches d'*Escherichia coli* (50.5%) et *Klebsiella pneumoniae* (67.9%) isolées d'effluents d'abattoirs de volailles (Savin et al., 2020b). Cette même équipe a de plus montré une importante présence de BLSE, de gènes de résistance à la méticilline et à la colistine dans les effluents d'abattoirs traités à la STEU mais une absence de gènes de carbapénémase (Savin et al., 2020a). Une étude comparative des bactéries isolées à partir d'effluents hospitaliers, urbains et d'abattoirs a détecté la présence du gène *mcr-1* (gène de résistance à la colistine) uniquement dans les isolats d'effluents d'abattoirs (Sib et al., 2020). Homeier-Bachmann *et al* ont également retrouvé des gènes *mcr-1* dans des isolats (provenant d'effluents d'abattoirs de cochons (54%) et de volaille (21%) (Homeier-Bachmann et al., 2021).

Les effluents d'abattoirs sont donc des pourvoyeurs de BMR, ce qui présente un risque pour l'environnement en contaminant possiblement les rivières mais aussi potentiellement les employés des abattoirs.

II.2.1.3. Les effluents industriels (cas des usines productrices d'antibiotiques)

Sauf exception, le taux d'antibiotiques présent dans l'environnement est en général peu élevé. En effet, les concentrations en antibiotiques retrouvées sont en dessous des concentrations minimales inhibitrices (CMI) connues (< 2 µg/L) et sont encore plus faibles que les concentrations prédites pour sélectionner des souches résistantes au laboratoire (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016). Cependant, à certains endroits dans le monde, la concentration en antibiotiques retrouvée dans l'environnement est élevée, notamment dans les zones près des usines de production d'antibiotiques. Ces molécules antibiotiques se retrouvent en quantité non négligeable dans les eaux usées des usines et se mélangent par la suite aux effluents des activités humaines et agricoles. Les concentrations en antibiotiques mesurées dans les rivières où se déversent les déchets issus des usines de production

d'antibiotiques sont de l'ordre du mg/L (par exemple de 2.5 à 6.5 mg/L pour la ciprofloxacine ou de 0.06 à 0.52 mg/L pour la norfloxacine) (Rehman et al., 2015). La présence de molécules antibiotiques en grande quantité dans l'environnement va alors avoir un impact sur la dissémination de l'antibiorésistance. Un milieu propice à la multiplication des BMR est ainsi créé, favorisant les échanges de GRA (Rehman et al., 2015). Ceci présente un gros problème dans les pays de l'Asie de l'Est très fortement peuplés comme la Chine, l'Inde, le Pakistan et le Bangladesh où de nombreuses usines de fabrication d'antibiotiques y sont présentes. Les eaux usées de ces usines ne sont pas traitées à leur sortie et contiennent alors une grande quantité d'antibiotiques qui va contaminer les sols et les eaux qui seront utilisés par la suite en agriculture (Azizullah et al., 2011; Tong et al., 2011).

II.2.1.4. Les effluents urbains

Issus de différentes sources domestiques, les effluents urbains sont généralement mélangés aux autres effluents anthropiques tels que les effluents hospitaliers ou industriels avant d'être traités à la STEU (Deblonde et al., 2011). De ce fait, il est difficile d'évaluer l'impact des effluents urbains seuls sans aucune contamination autre.

Le résistome des effluents urbains est différent de celui des effluents hospitaliers avec une plus faible teneur en GRA (entre 3 et 161 gènes de résistance détectés en moins) et en BMR (Buelow et al., 2020). Pourtant, certains gènes de résistance aux antibiotiques comme les sulfamides ou la tétracycline, sont retrouvés en plus forte abondance dans les effluents urbains (**Figure 14**) (Hiller et al., 2019). Les résistances à l'ampicilline et la vancomycine (antibiotique de derniers recours) ont quant à eux une abondance faible dans les effluents urbains (Hiller et al., 2019)

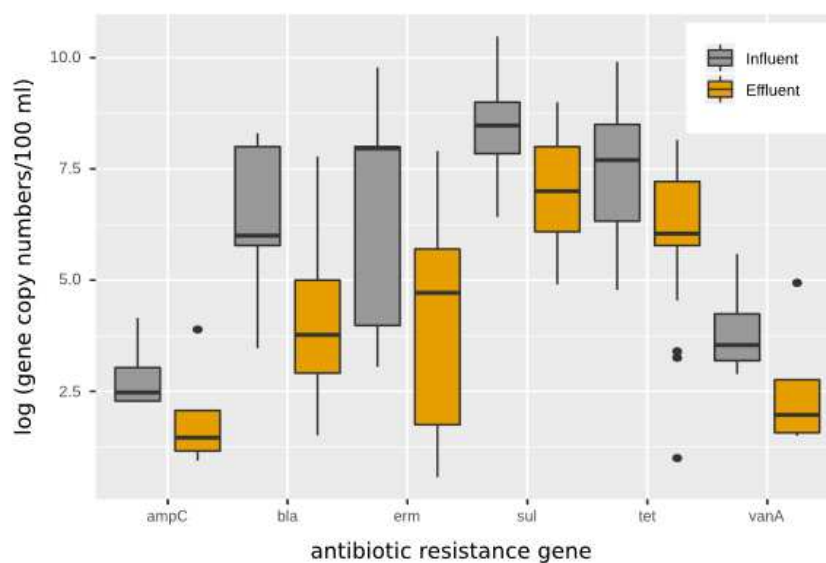


Figure 14 Abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les eaux usées à l'entrée et la sortie de STEU municipales (Hiller *et al.*, 2019)

Total de l'abondance relative des gènes *ampC*, *tet*, *sul*, *ermB*, *vanA* et *bla* détectés à l'entrée (en gris) et à la sortie (en orange) de STEU municipales.

Les données sont issues des études suivantes : Laht *et al.*, 2014; Salcedo *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2015; Alexander *et al.*, 2016; Böckelmann *et al.*, 2009; Czekalski *et al.*, 2012; Koczura *et al.*, 2016; Makowska *et al.*, 2016; Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2015; Negreanu *et al.*, 2012; Michael *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009; Lachmayr *et al.*, 2009; Al-Jassim *et al.*, 2015; Quach-Cu *et al.*, 2018; Narciso-da-Rocha *et al.*, 2018 et Proia *et al.*, 2018.

La plupart des études portant sur l'analyse des GRA dans les effluents urbains ont été réalisées en collectant de l'eau en amont, pendant le traitement, et à la sortie de STEU municipales. Cependant une étude a évalué la présence de GRA lors du transport de ces eaux usées vers la STEU directement dans les égouts (Auguet *et al.*, 2017). Les auteurs ont décrit une concentration élevée de gènes de résistance aux sulfamides (*sul1* et *sul2*), suivie par une concentration plus faible mais non négligeable de gènes de résistance aux macrolides (*ermB*) et aux tétracyclines (*tetM* et *tetW*) avec une concentration d'environ 2 log copies de gènes/copies d'ARN16S (Auguet *et al.*, 2017).

II.2.2. Devenir et traitement des eaux dans les stations d'épuration (STEU)

La **Figure 15** retrace les différentes voies de dissémination des GRA par les effluents de diverses origines qui aboutissent tous à la STEU pour y être traités.

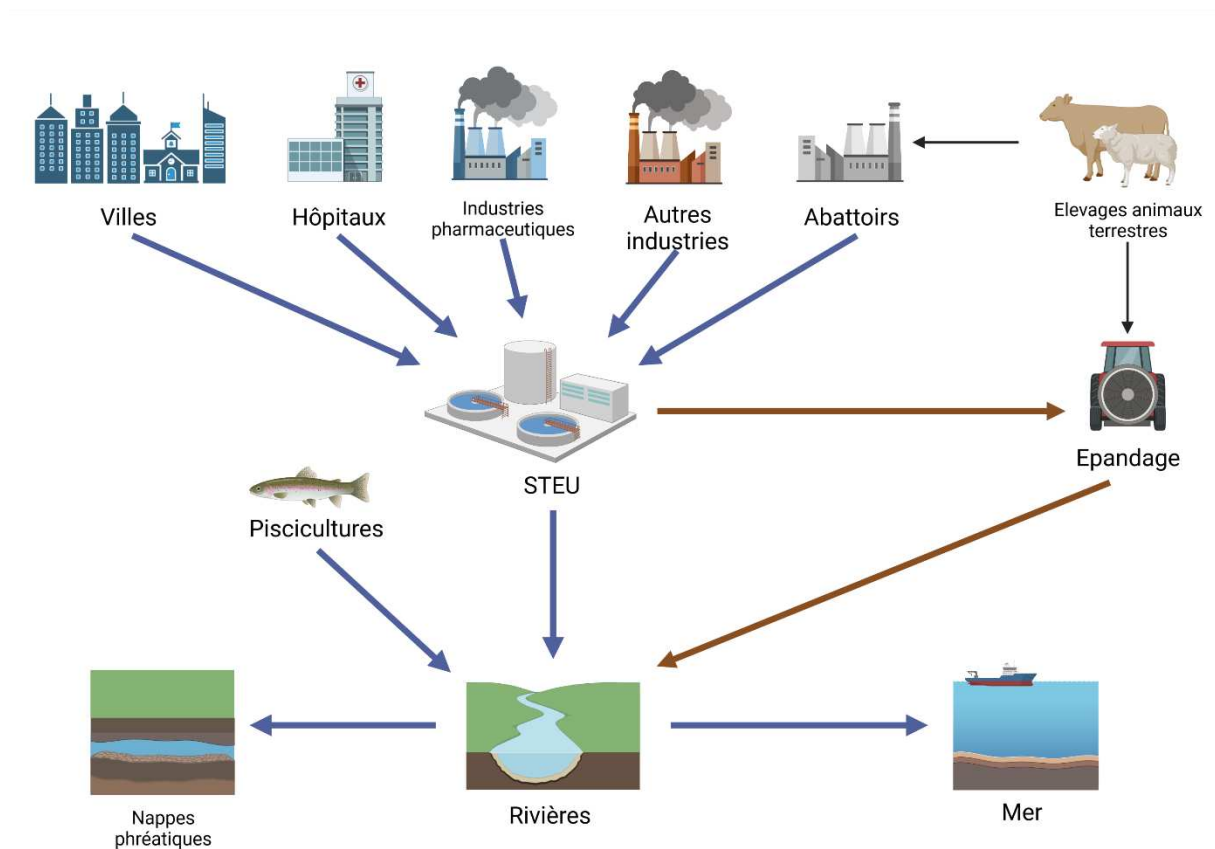


Figure 15 Voies de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques selon différentes sources environnementales

Les flèches bleues représentent les flux d'eaux et les flèches marron les boues. Qu'ils soient d'origine urbaine, hospitalière, industrielle ou d'abattoirs, les effluents sont tous traités dans les stations d'épuration (STEU). L'eau va subir plusieurs traitements et l'eau qui en sort est par la suite déversée dans les rivières. Les boues actives issues de la STEU sont utilisées dans l'agriculture comme épandage. Ces boues vont contaminer les sols et par la suite les rivières. Les eaux des piscicultures vont également se déverser dans les rivières. Cette eau de rivière va alimenter la mer et les nappes phréatiques.

Dans les STEU, les eaux usées sont traitées en deux principales étapes :

- Traitement primaire : séparation de l'eau et des gros déchets puis du sable et des matières grasses (huile, essence et autres matières grasses).
- Traitement secondaire (biologique) : dans un premier bassin l'eau est mise en contact avec des boues actives. Ces boues actives contiennent des bactéries consommatrices de molécules de pollution carbonée et/ou azotée. Ce mélange passe par la suite dans

un deuxième bassin pour une décantation. Les boues vont décanter, l'eau va rester en surface et se clarifier. L'eau totalement épurée sera finalement rejetée dans la rivière. Une partie des boues actives est récupérée et séchée pour être utilisée en agriculture pour la fertilisation des sols.

Les effluents hospitaliers, urbains, pharmaceutiques ou d'abattoirs qui arrivent à la STEU sont vecteurs de BMR et de GRA (Berendonk et al., 2015; Er et al., 2016; Um et al., 2016). Les STEU représentent alors de véritables « hot-spots » avec des concentrations élevées en nutriments et en bactéries diverses (Szczepanowski et al., 2009), favorisant ainsi des transferts horizontaux de gènes de résistance et le développement de BMR (Auerbach et al., 2007; Proia et al., 2016). Salvin *et al* ont montré que la détection des GRA dans les effluents d'abattoirs est plus faible après traitement de ces eaux dans les STEU municipales en Allemagne (Savin et al., 2021, 2020c). Il a été montré que la concentration en GRA contenue dans les eaux usées diminue de un à deux logs après le traitement secondaire dans la STEU (Chen and Zhang, 2013). De plus, pour les gènes de résistance à la tétracycline (*tetO* et *tetW*), leur concentration passe de 10^7 à 10^4 gènes/100 mL (Gao et al., 2012). Une récente étude a également montré que le profil de résistance aux antibiotiques change après traitement à la STEU : les résistances à la vancomycine diminuent significativement ainsi que les résistances aux aminoglycosides et aux β -lactamines (Ma et al., 2022). Le traitement des eaux usées par la STEU n'est cependant pas suffisant pour tout éliminer et ces eaux se retrouvent toujours contaminées avec des quantités élevées de bactéries. Il a été évalué que les STEU rejettent chaque jour environ 10^9 à 10^{12} UFC par équivalent habitant dont 10^7 à 10^{10} bactéries possédant au minimum une résistance (Łuczkiwicz et al., 2010; Novo and Manaia, 2010).

Actuellement, des travaux de recherche sont en cours pour améliorer et réduire les BMR après les traitements classiques des STEU. Certaines STEU ajoutent ainsi un troisième traitement pour une purification plus profonde des eaux à l'aide d'une étape de désinfection. Cela peut se faire par des procédés chimiques (irradiation aux UVs ou chloration par exemple), de séparation physique (membranes) ou biologiques (bioréacteurs sur membrane par

exemple) (Pei et al., 2019). Ce complément aide à diminuer encore plus les quantités de BMR. Il a été montré qu'après rayonnement UV, les bactéries résistantes à la tétracycline passent de 10^2 copies/mL à 10^1 copies/mL (Kim et al., 2010). Cependant, le traitement des eaux par le chlore favorise l'échange de GRA (Jin et al., 2020). De plus les boues actives utilisées pour l'épandage jouent également un rôle dans la dissémination des GRA dans le sol (Chen et al., 2016).

Comme mentionné précédemment, les effluents d'origine hospitalière ne sont pas traités séparément des effluents urbains. Dans le cadre du projet SIPIBEL (Site Pilote de Bellecombe) (Chonova et al., 2018), une étude menée au laboratoire a eu pour but d'étudier la dynamique du résistome et du microbiome des effluents hospitaliers et urbains traités dans deux STEU séparées. Un hôpital à Annemasse a été construit avec sa propre STEU qui traitait les eaux usées directement à la sortie de l'hôpital. Des prélèvements d'eaux ont été réalisés en amont et en aval de la STEU de manière régulière de 2012 à 2015 pour analyser le résistome et le microbiote. En parallèle, la ville de Annemasse avait ses effluents urbains qui étaient traités dans la STEU municipale et des prélèvements y étaient aussi réalisés durant cette période et aux mêmes intervalles. Puis en 2015, un mélange des eaux usées a été réalisé (1/3 effluent hospitalier et 2/3 effluent urbain) puis traité dans la STEU rattachée à l'hôpital. Des prélèvements ont aussi été réalisés en amont et en aval de la STEU. Il a été montré que les effluents hospitaliers étaient tellement dilués par les effluents urbains que les eaux usées de l'hôpital étaient « noyées ». Ainsi il en a été conclu qu'il n'était pas forcément nécessaire de construire des STEU spécifiques pour les centres de soins et que les effluents hospitaliers pouvaient être traités directement avec les autres effluents (Buelow et al., 2020).

II.2.3. Marqueurs de la pollution anthropique

L'activité humaine a donc un impact direct sur l'environnement qui est par conséquent un terrain favorable à la sélection des BMR et à la dissémination des GRA (Buelow et al.,

2021). Pour évaluer cette pollution anthropique, à l'heure actuelle, il existe plusieurs marqueurs viraux ou bactériens.

Parmi les marqueurs viraux de la pollution anthropique on retrouve le Torque Teno Virus (TTV) (Focosi et al., 2016), c'est un petit virus à ADN simple brin de la famille des Anelloviridae qui représente la plus grande proportion (70%) du virome humain (De Vlaminck et al., 2013). Un autre exemple de marqueur viral est le crAssphage. C'est un bactériophage utilisé récemment comme marqueur de la contamination fécale de l'environnement (Chen et al., 2019; Kongprajug et al., 2019).

Au niveau bactérien, afin d'évaluer la dissémination de l'antibiorésistance par ces rejets anthropiques et les éventuels risques sanitaires qui s'y rapportent, ce sont les intégrons qui sont utilisés et notamment les intégrons de classe 1 (Amos et al., 2015; Gillings et al., 2015). Comme dit précédemment, les intégrons sont des EGM capables d'acquérir, d'échanger et d'exprimer des GRA sous forme de cassettes. Dans l'environnement (eaux et sols), il est estimé qu'entre 1 à 5% des bactéries sont porteuses d'intégrons (Gillings, 2014).

La forte concentration en ATB retrouvée dans les effluents anthropiques va faire émerger les BMR porteuses d'intégrons. En effet, il a été montré *in vitro* que des concentrations subinhibitrices en ATB ont une influence sur les modifications génétiques avec une augmentation du taux de mutations et de transferts horizontaux chez les bactéries soumises à ces pressions (Chow et al., 2021; Rodríguez-Rojas et al., 2013). Malgré cela, plusieurs études ont détecté des intégrons dans les fèces d'animaux d'élevage bio (élevages où l'utilisation d'antibiotiques n'est pas autorisé), ce qui indique que les intégrons peuvent également persister sans pression de sélection dû à l'utilisation d'antibiotiques (Barlow et al., 2009; Hoyle et al., 2006). De plus il a été montré que la prolifération des intégrons dans l'environnement était également due à une pression de sélection exercée par les métaux lourds (tels que le zinc, le manganèse et le cuivre), le phosphore et les désinfectants retrouvés dans l'environnement (Amos et al., 2015; Baker-Austin et al., 2006; Hegstad et al., 2010; Seiler and Berendonk, 2012).

II.3. Les intégrons dans l'environnement : cas des effluents

Les effluents anthropiques de toutes origines sont vecteurs de BMR et ces bactéries peuvent potentiellement posséder des GRA portés par un ou plusieurs intégrons. Les méthodes de détection et de quantification des intégrons dans l'environnement et plus spécifiquement dans les effluents par des approches indépendantes de la culture bactérienne permettent la surveillance de leur dissémination dans l'environnement (Amos et al., 2018, 2015; Buelow et al., 2020; Stalder et al., 2012). Cela permet également de distinguer les différents types d'effluents anthropiques en fonction de la quantité en intégrons. Cependant ces méthodes de détection des intégrons sont variées et nécessitent donc une standardisation.

L'étude des intégrons dans les effluents anthropiques a permis de montrer qu'ils jouaient un rôle important dans la dissémination des GRA au sein de l'environnement (Stalder et al., 2012). La plupart de ces travaux, que ce soit par qPCR ciblée ou en métagénomique, font un focus seulement sur le gène de l'intégrase, le plus souvent uniquement sur *intI1* (Marathe et al., 2019; Rodríguez et al., 2021) ou sur certaines cassettes d'importance en santé publique (Lamba et al., 2018; Li et al., 2015; Rafraf et al., 2016). Très peu d'études se consacrent à l'analyse de l'ensemble des cassettes portées par les différents intégrons retrouvés dans les matrices environnementales. En 2016, Gatica et al ont étudié le contenu en cassettes des intégrons de classe 1 retrouvés dans des effluents de STEU urbaines de douze villes Européennes par NGS (Gatica et al., 2016). A partir d'ADN totaux extraits en amont, ils ont amplifié les cassettes en utilisant le protocole décrit précédemment par Stokes et al. (Stokes et al., 2001) puis les ont séquencées par la technique de séquençage haut débit Illumina. Ils ont montré que les gènes de résistance aux β -lactamines étaient prédominants dans 7/12 effluents, suivis par les gènes de résistance aux aminoglycosides dans 4/12 effluents (**Figure 16**).

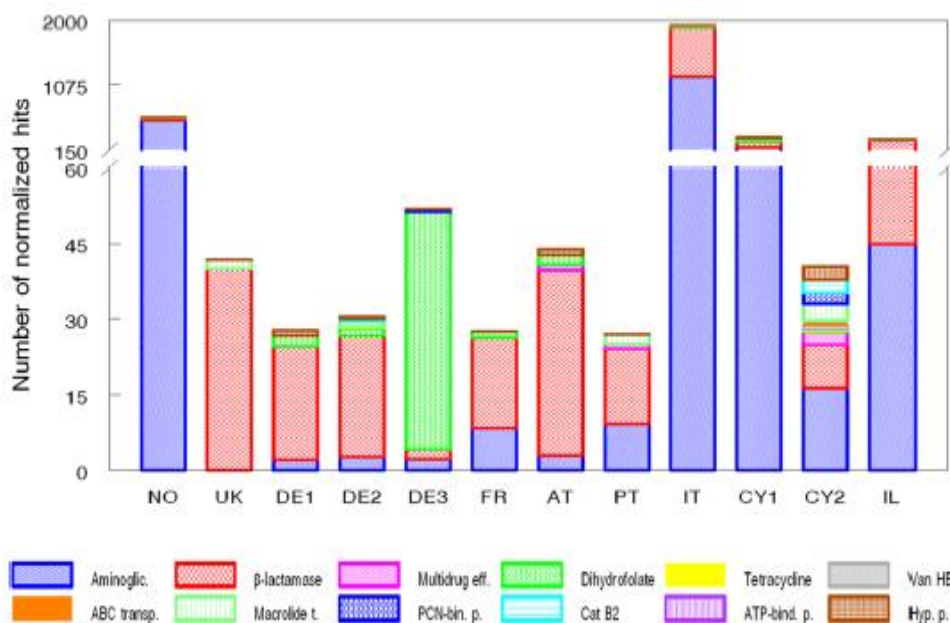


Figure 16 Abondance des mécanismes de résistances aux antibiotiques associés aux intégrons de classe 1 retrouvés dans douze effluents de STEU urbaines (Gatica *et al.*, 2016)

Représentation graphique des GRA présents au sein des IR1 isolés d'effluents de douze STEU municipales Européennes. Les abondances ont été normalisées par rapport au nombre total de *reads* pour chaque prélèvement.

L'équipe de Yang *et al.* a utilisé le séquençage de troisième génération avec la technologie PacBio pour étudier les cassettes des IR1 présents dans les boues activées d'une STEU (Yang *et al.*, 2021). Parmi l'ensemble des cassettes détectées, 78,3% d'entre elles ont une fonction de résistance aux antibiotiques. Les résistances les plus fréquemment retrouvées étaient des résistances aux aminoglycosides (65,7%), aux β -lactamines (61,8%), au chloramphénicol (16,2%) et au triméthoprim (14,6%).

Dans une étude récente, la technologie PacBio a également été utilisée pour séquencer les régions variables des IR1 présents dans des souches bactériennes isolées des eaux usées et des boues d'une STEU municipale en Chine (An *et al.*, 2022) (**Figure 17**). Une large diversité des résistances apportés par les intégrons dans les eaux usées a été rapportée. En effet, les cassettes détectées conféraient principalement des résistances aux aminoglycosides suivi par des résistances aux β -lactamines, au triméthoprim, aux lincosamides, aux macrolides, aux phénicolés, à la rifampicine et aux sulfamides.

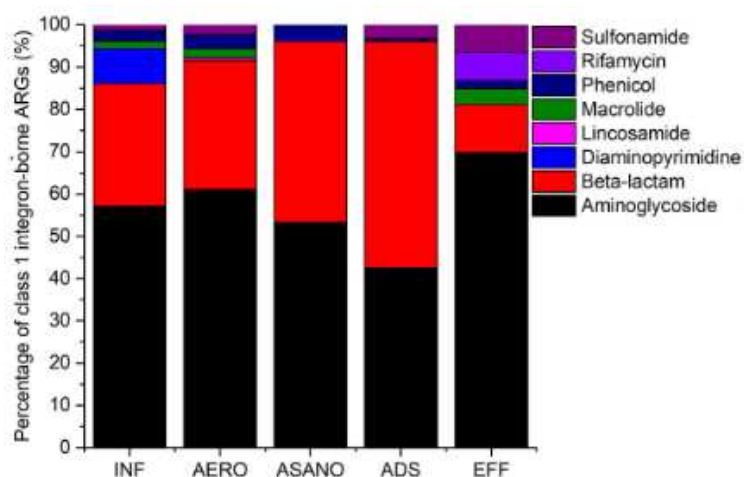


Figure 17 Proportion des différents gènes de résistance aux antibiotiques des cassettes des intégrons de classe 1 issus de prélèvements de STEU municipales (An *et al.*, 2022)

Pourcentage des résistances conférées par les CG présentes dans les IR1 isolés de souches provenant d'eaux usées et de boues d'une STEU municipale en Chine.

INF : eaux usées à l'entrée de STEU ; AERO, ASANO et ADS : différentes étapes de boues activées ; EFF : eaux usées à la sortie de STEU.

Ces études ont toutes montré une prédominance des gènes de résistance aux aminoglycosides suivis des résistances aux β -lactamines dans les effluents anthropiques et plus spécifiquement de STEU urbaines (An *et al.*, 2018). Ces mêmes observations ont été rapportées par Ghaly *et al* mais cette fois-ci dans des intégrons trouvés dans des biofilms d'eau douce et des rivières (Ghaly *et al.*, 2021). De plus, parmi l'ensemble des *reads* obtenus lors des différents séquençages, une importante proportion a été décrite comme des protéines hypothétiques de fonction inconnue associées aux intégrons (Gatica *et al.*, 2016), ce qui montre ainsi que probablement beaucoup de cassettes ne sont pas encore décrites à l'heure actuelle.

L'impact des traitements des eaux usées sur les intégrons dans les STEU urbaines a été étudié. A l'exception des IR3, l'abondance relative des intégrons (IR1 et IR2) était significativement réduite à la sortie de la STEU (An *et al.*, 2018; Stalder *et al.*, 2014). Cependant, même après traitement des eaux, on détecte toujours une quantité non négligeable d'intégrons (10^6 à 10^5 copies/mL) qui par la suite vont se déverser dans l'environnement (An *et al.*, 2018).

II.3.1. Les intégrons de résistance dans les effluents hospitaliers

Les effluents des hôpitaux, ou tout autre centre de soins, du fait de leur activité sont des établissements très concentrés en BMR. Comme évoqué précédemment, les effluents hospitaliers sont porteurs d'une plus grande diversité du microbiote et du résistome (Buelow et al., 2018). Au sein du résistome, les intégrons ont été retrouvés en plus grande quantité dans les effluents hospitaliers comparés à d'autres effluents anthropiques tels que les effluents d'abattoirs, les effluents urbains ou les rivières (**Figure 18**) (Buelow et al., 2020; Laquaz et al., 2018; Stalder, 2012; Stalder et al., 2014). De plus, parmi les intégrons présents dans les effluents hospitaliers, ce sont les IR1 qui sont les plus abondants suivi par les IR3 et enfin les moins abondants sont les IR2 (Stalder et al., 2014).

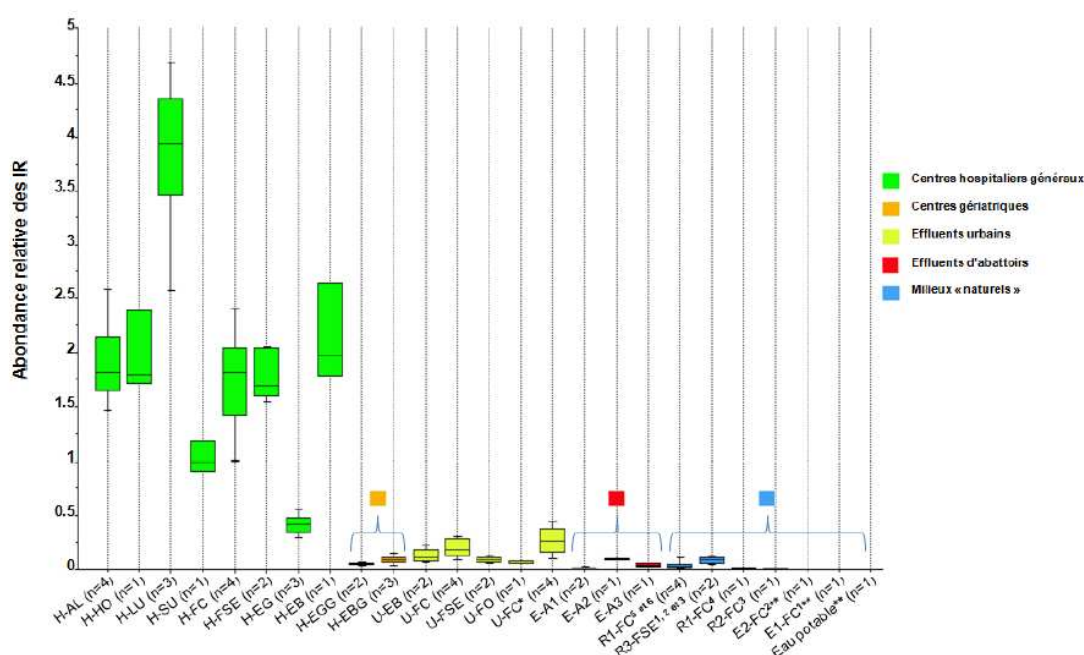


Figure 18 Abondance relative des intégrons de classe 1 dans différentes matrices environnementales (thèse de Thibault Stalder, 2012)

Boîtes à moustache des abondances relatives de l'*intI1* dans les effluents hospitaliers (en vert), dans les effluents de centres gériatriques (en orange), dans les effluents urbains (en jaune), dans les effluents d'abattoirs (en rouge) et dans les rivières et les étangs (en bleu). L'abondance relative des IR1 dans les effluents des hôpitaux est plus importante.

Contrairement aux effluents de STEU urbaines, aucune étude utilisant des méthodes de métagénomique n'a été réalisée afin d'étudier l'ensemble des cassettes d'intégrons

présents dans les effluents hospitaliers. Cependant, certaines études ont utilisé des méthodes de détection ciblées pour étudier certains GRA d'importance clinique associés aux intégrons telles que les carbapénèmases (Teban-Man et al., 2022), les céphalosporinases (Anssour et al., 2014) ou les gènes de résistance aux quinolones (Vaz-Moreira et al., 2016) retrouvés dans ce type d'effluent.

L'une des premières études portant sur la recherche d'IR1 dans les effluents hospitaliers a été réalisé par Guo *et al* en 2011 (Guo et al., 2011). Ils ont décrit 27 réseaux de cassettes différents avec au total 34 cassettes conférant des résistances aux aminoglycosides, au triméthoprim, aux β -lactamines, au chloramphénicol, à la rifampicine et à l'érythromycine.

Parmi les souches notables isolées d'effluents hospitaliers, huit espèces de *Pseudomonas* ont été isolées d'effluents de quatre hôpitaux universitaires au Brésil (Spindler et al., 2012) : 54,93% (68/124) des souches isolées étaient porteuses d'intégron et toutes ces souches présentaient un profil de multi-résistance (résistance à plus de six familles d'ATB différentes). Une autre étude a décidé de faire un focus sur les résistances aux C3G dans les effluents d'un hôpital Algérien (Anssour et al., 2014). Sur l'ensemble des souches isolées résistantes au céfotaxime, 97,2% (106/109) étaient porteuses d'IR1.

Malheureusement ces études montrent la présence d'intégrons et de GRA mais ne démontrent pas la présence de ces gènes au sein de réseaux de cassettes d'intégrons. Une étude a cependant analysé la région variable des IR1 détectés dans un effluent hospitalier au Portugal (Vaz-Moreira et al., 2016). Les CG les plus retrouvées au sein de ces réseaux de cassettes confèrent des résistances aux aminoglycosides (*aadA1* ; *aadA2*, *aacA4* ; *aac(3)Ic* ; *aacA7*) ; au triméthoprim (*dfrA1* ; *dfrA12*) et aux β -lactamines et plus spécifiquement aux carbapénèmes (*bla_{IMP}* ; *bla_{OXA}* ; *bla_{VIM-2}*). 64,7% (11/17) des souches porteuses d'IR1 étaient également porteuses de résistances plasmidiques aux quinolones.

En Inde, des cassettes d'IR1 de résistance aux aminosides, β -lactamines, rifampicine, sulfamides et triméthoprim ont été détectées par NGS dans des souches isolées d'effluents hospitaliers (Marathe et al., 2019). Parmi les cassettes trouvées, un nouveau variant du gène

*bla*_{IMP} a été décrit dans cette étude. Appelé *bla*_{IMP-81}, il diminue la sensibilité des bactéries face aux carbapénèmes.

Une étude de 2011 s'est portée sur l'étude des entérobactéries présentes dans les eaux usées d'une STEU accueillant un mix d'effluent urbain et hospitalier (Pellegrini et al., 2011). Sur 471 entérobactéries isolées, 158 étaient porteuses d'IR1 et 35 porteuses d'IR2 mais aucun IR3 n'a été détecté parmi ces souches. Les réseaux de cassettes de certains IR1 et IR2 ont été décrits. Pour les IR1, deux réseaux ont été trouvés, un avec une cassette unique (*aadA10*) et un autre avec deux cassettes (*dfr17-aadA5*) et pour les IR2, également deux réseaux de cassettes ont été décrits : *dfrA1-sat2* et *dfrA1-sat2-aadA1*. Les intégrons détectés étaient tous chromosomiques à l'exception de deux IR1 portés par un plasmide commun, ce qui est surprenant car Buelow *et al* en 2020 ont montré que 60% des résistances présentes au sein des effluents hospitaliers étaient portées par des intégrons associés aux EGMs (Buelow et al., 2020).

Les carbapénémases sont des gènes de résistance aux carbapénèmes d'intérêt en médecine humaine et sont très souvent portées par des EGM (Gniadek et al., 2016). La carbapénémase *bla*_{NDM} a été détectée en association avec des IR1 dans 53,6% des souches bactériennes isolées d'un effluent hospitalier en Inde (Aggarwal et al., 2020).

Le séquençage haut débit a permis de détecter des gènes de résistance à la rifampicine (*arr2* et *arr3*) dans des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'effluents hospitaliers en Roumanie (Surleac et al., 2020).

Les IR1 suivis des IR2 sont les deux classes d'intégrons les plus étudiés dans les eaux usées des hôpitaux et les IR3 ne sont généralement pas détectés ou tout simplement pas recherchés. Pourtant en 2014, Stalder *et al* ont montré une abondance relative en IR3 supérieure aux IR2 dans les effluents hospitaliers (Stalder et al., 2014).

En 2013 un IR3, In3-5 (GenBank: HE616889), a été décrit dans une souche d'*Enterobacter cloacae* provenant d'un effluent hospitalier de France (Barraud et al., 2013). La souche était résistante aux β -lactamines (amoxicilline et ticarcilline), quinolones (acide nalidixique et

péfloxacine), aminoglycosides (tobramycine et nétilmicine) et tétracyclines grâce notamment à la présence des deux cassettes dans le réseau de cassettes de l'IR3 : *bla*_{OXA-256} et un variant de *aac(6')-Ib*. Puis d'autres IR3 ont été détectés dans des souches isolées d'effluents hospitaliers (Simo Tchuinte et al., 2016). Les bactéries isolées porteuses d'IR3 appartenaient aux espèces *Acinetobacter johnsonii*, *Aeromonas allosaccharophila* et *Citrobacter freundii*. Les résistances conférées par les CG de ces IR3 concernent les β -lactamines et les aminoglycosides. Les travaux de thèse de Pierrette Tchuinte en 2016 ont également permis d'isoler à partir d'effluents hospitaliers cinq souches de *Delftia* hébergeant un IR3 (Tchuinte, 2016). Les réseaux de cassettes identifiés étaient identiques à ceux précédemment décrit dans des souches de *Delftia* isolées de boues activées (Xu et al., 2007) : *orfA-orfC/orfD-orfE* et *orfA-orfB-orfC/orfD-orfE*.

L'impact des effluents hospitaliers dans l'environnement a été démontré par Stalder *et al* en 2014. Dans leur étude, les auteurs ont montré que ce type d'effluent anthropique représentait seulement 2% du flux total de l'ensemble des effluents arrivant à l'entrée de la STEU mais contribuait à hauteur de 14% de la masse totale d'IR1 détectés (Stalder et al., 2014). Oberlé *et al* ont montré une diminution des IR1 de souches *Escherichia coli* au cours du traitement des effluents hospitaliers et jusqu'au déversement dans les rivières (Oberlé et al., 2012). Ce qui a été confirmé par d'autres études plus récentes montrant elles aussi la dilution des effluents hospitaliers au sein des autres effluents en amont de la STEU (Buelow et al., 2020; Teban-Man et al., 2022). Cependant, comme dit précédemment, même après traitement des eaux usées, une quantité non négligeable d'intégrons est toujours détectée à la sortie de la STEU.

II.3.2. Les intégrons de résistance dans les effluents d'abattoirs

Très peu d'études ont utilisé les intégrons pour évaluer la dissémination de l'antibiorésistance dans les effluents d'abattoirs. Dans la majorité des cas, ce sont les IR1 qui ont été détectés/recherchés.

Harvey *et al* ont utilisé les intégrons comme marqueurs pour tracer des effluents d'abattoirs de poulets en Australie. Ils ont détecté des IR1 dans les eaux de sorties du bâtiment contenant les poulets et montré que la contamination des effluents de cet abattoir provenait de ces eaux (Harvey et al., 2017). La détection pour les autres bâtiments s'est révélée négative.

Une autre étude a voulu comparer l'abondance relative des IR1 dans les effluents municipaux et d'abattoirs porcins à l'entrée, pendant et à la sortie de ces STEU (Wang et al., 2018). Ils ont détecté une plus grande quantité de gènes de l'intégrase *intI1* dans les effluents d'abattoirs après traitement à la STEU par rapport aux effluents municipaux (**Figure 19** Erreur ! Source

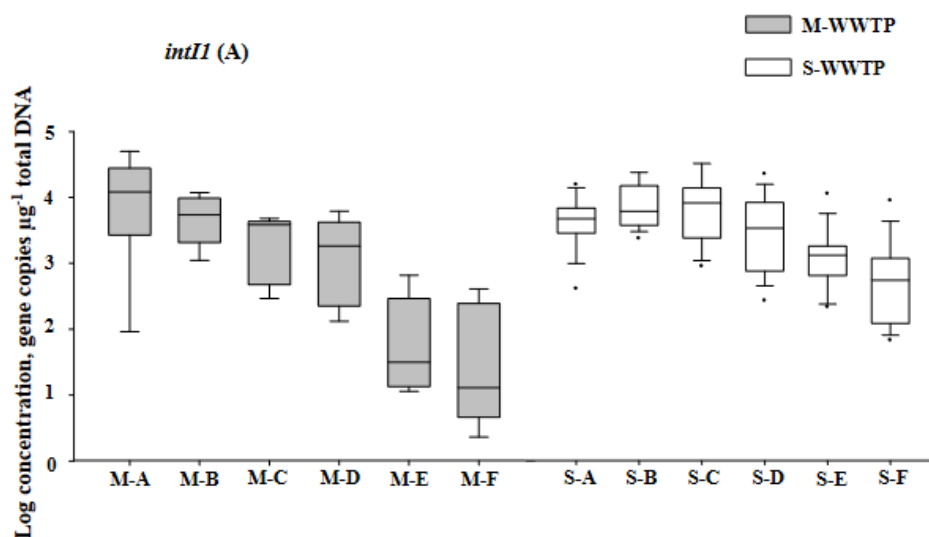


Figure 19 Abondances de *intI1* dans les effluents municipaux et d'abattoirs porcins (Wang et al., 2018).

Boîtes à moustache de l'abondance du gène de l'intégrase *intI1* dans les effluents de STEU municipale (M-WWTP) et d'abattoir (S-WWTP).

M-A : entrée de STEU municipale, M-B : entrée du premier bac de clarification, M-C : sortie du premier bac de clarification, M-D : système puits profond, M-E : deuxième bac de clarification et M-F : sortie de STEU municipale.

S-A : entrée de STEU abattoir, S-B à S-D : réacteur de boues activées I à III, S-E : bac de clarification final et M-F : sortie de STEU abattoir.

du renvoi introuvable.).

Au Brésil, neuf souches de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar (S.) Typhimurium porteuses d'IR1 ont été isolés d'effluents d'abattoirs porcins (Lopes et al., 2016). Deux réseaux de cassettes ont été détectés, le premier avec une cassette unique (6/9), *aadA23*, qui confère une résistance aux aminosides et le deuxième réseau avec trois cassettes (3/9), *dfrA12-orfA-aadA27*, conférant des résistances au triméthoprim, et aux aminosides. Ils ont démontré que tous ces intégrons étaient portés sur des plasmides conjugatifs, appuyant l'hypothèse de probables transferts horizontaux de ces IR1.

Moura *et al* ont non seulement détecté des IR1 dans les effluents d'abattoirs mais également des IR2 dans des souches d'*Escherichia coli* et d'*Aeromonas*. Ils rapportent que 30,7% (88/286) des souches isolées étaient porteuses d'IR1, 4,5% (13/286) d'IR2 et une seule souche était porteuse des deux classes d'intégrons simultanément (Moura et al., 2007). Le réseau de cassettes de ces IR1 était essentiellement *dfrA1-aadA1* et le réseau *dfrA1-sat-aadA1* a été retrouvé dans l'entièreté des IR2 de cette étude. Contrairement aux autres études, la plupart des intégrons détectés de cette étude étaient exclusivement présents sur le chromosome bactérien (Moura et al., 2007).

En 2016, des IR1 et IR2 ont été également détectés dans des souches d'*Escherichia coli* isolées d'effluents de deux abattoirs en France (Um et al., 2016). Les souches porteuses d'IR1 étaient majoritairement (25/30) résistantes à au moins six antibiotiques bien que leurs réseaux de cassettes étaient constitués seulement de quelques gènes de résistance (de deux à quatre cassettes par réseau). Les autres GRA portés par les souches étaient situés en dehors des intégrons. Ces études montrent ainsi que les intégrons sont des bons indicateurs de la présence d'*Escherichia coli* avec un phénotype BMR dans les effluents d'abattoirs.

Une autre étude a également montré que les IR1 étaient prédominants sur les IR2 dans les effluents d'abattoirs porcins (Yang et al., 2020).

A ce jour aucune souche porteuse d'IR3 n'a été isolée à partir d'effluents d'abattoirs.

Partie III. Intégrons et animaux (cas des *Aeromonas* dans la pisciculture)

III.1. L'aquaculture

Selon la FAO (*Food and Agriculture Organisation*), l'organisation internationale pour l'alimentation et l'agriculture, le domaine de l'aquaculture et spécifiquement la pisciculture a produit 82,1 millions de tonnes de poissons en 2018 et ce nombre ne fait qu'augmenter d'années en années (*The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*, 2020) (**Figure 20**). En effet, l'industrialisation de l'aquaculture depuis les années 1970 ne fait que s'accroître et dans quelques années le nombre de tonnes de poissons produit en aquaculture dépassera celui des poissons capturés dans la nature (Diana et al., 2013).

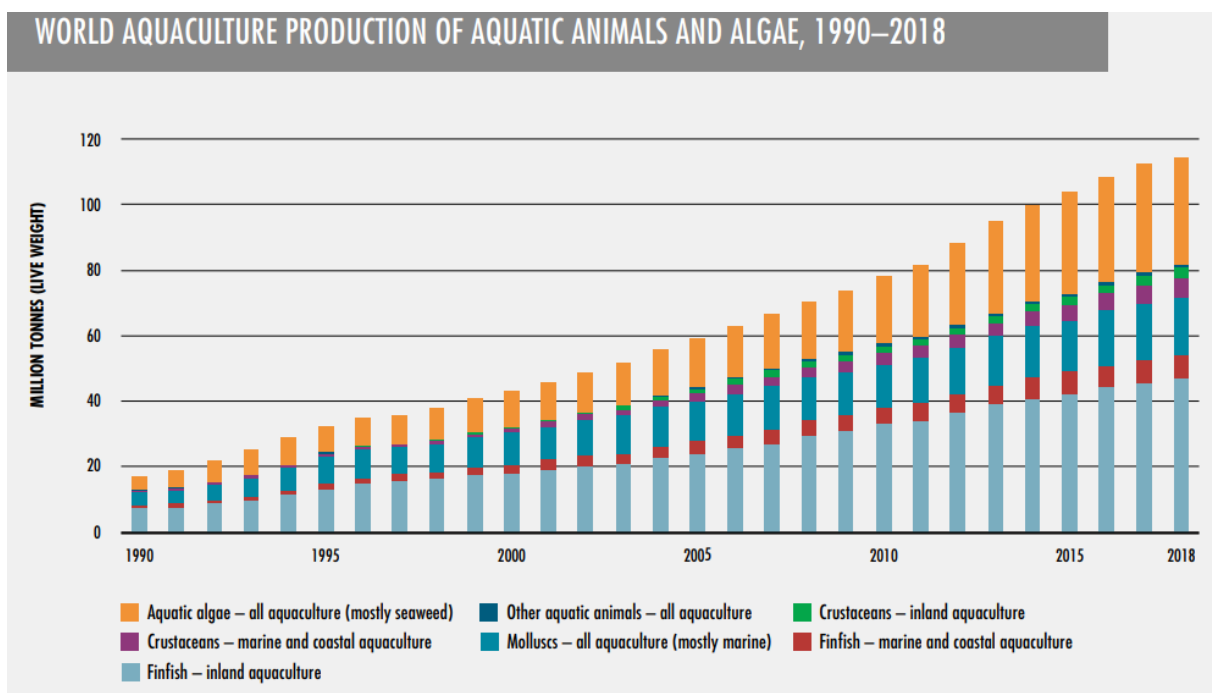


Figure 20 Production mondiale d'animaux marins et d'algues de 1990 à 2018 (*The State of World Fisheries and Aquaculture*, FAO, 2020)

Evolution mondiale de la production de poissons d'eau douce (en bleu ciel) et de mer (en rouge), de crustacés d'eau douce (en vert) et de mer (en violet), de mollusques (en bleu) et d'algues (en orange) en aquaculture.

Le nombre augmente d'années en années et dépasse la centaine de millions de tonnes par an.

Comme les élevages d'animaux terrestres, la pisciculture (en eau douce ou milieu marin) est touchée par l'utilisation massive des antibiotiques car les poissons et fruits de mer sont eux aussi sujets aux infections (conditions stressantes pour les animaux). Les antibiotiques sont délivrés dans la nourriture ou parfois directement dans l'eau d'immersion aux poissons malades mais également aux poissons sains. Après ingestion, les molécules antibiotiques non absorbées se retrouvent dans les sécrétions des poissons et vont contaminer l'eau. En addition avec les antibiotiques présents dans les sédiments de nourriture, on retrouve alors jusqu'à 80% des antibiotiques délivrés dans l'environnement aquatique à des concentrations inhibitrices ou sub-inhibitrices (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016; Cabello et al., 2016). Cet environnement favorise les mutations de résistance aux antibiotiques, la sélection des BMR et le transfert de GRA (Cabello et al., 2013; Lupo et al., 2012).

En dehors de l'Union Européenne, les restrictions concernant l'usage des antibiotiques en élevage d'animaux terrestres sont faibles. En conséquence, plusieurs pays ont une utilisation plus forte dans les élevages qu'en médecine humaine (Robinson et al., 2016; Tiseo et al., 2020) et c'est également le cas pour l'aquaculture. Au Chili, par exemple, l'usage des fluoroquinolones en aquaculture est dix fois plus important qu'en médecine humaine (Millanao B et al., 2011).

Une méta analyse récente a montré que le réchauffement climatique a pour conséquence l'augmentation de la population bactérienne et une plus forte mortalité des poissons (Reverter et al., 2020). En effet, les bactéries semblent se multiplier mieux dans des eaux plus chaudes et pour pallier à ces nombreuses morts, les éleveurs sont contraints d'augmenter l'usage des antibiotiques.

III.2. Les *Aeromonas*

Parmi les nombreuses bactéries responsables d'infections chez les poissons, on retrouve les *Aeromonas*. Elles présentent un grand intérêt d'un point de vue *One Health* car ces bactéries sont retrouvées dans l'environnement (aquatique plus spécifiquement) et sont

connues pour infecter des animaux (principalement des poissons) et elles peuvent également contaminer l'Homme (Lamy et al., 2022).

C'est un genre bactérien qui fait partie de la classe des Gammaproteobacteries, de l'ordre des Aeromonadales et de la famille des Aeromonadaceae (Fernández-Bravo and Figueras, 2020). Ces bactéries sont des BGN ubiquitaires de l'environnement aquatique (eaux douces principalement, estuaires, côtes, et également dans l'eau potable chlorée) mais elles sont aussi présentes sur le sol terrestre (Janda and Abbott, 2010) et chez les animaux comme c'est le cas pour les intestins des poissons (Ruzauskas et al., 2021) ou des bovins (Igbiosa et al., 2015). En ce qui concerne leur présence chez l'Homme, celle-ci reste moins fréquente et n'est décrite que lors d'infections, le plus souvent après contact et/ou consommation d'eau ou d'aliments contaminés (Pessoa et al., 2022; Van der Kooij, 1988).

Le genre *Aeromonas* est un genre très varié contenant 36 espèces différentes qui peuvent être regroupées en plusieurs complexes présentant des caractéristiques proches. Parmi les espèces, certaines sont connues pour être principalement responsables d'infections chez le poisson comme par exemple *Aeromonas hydrophila* (Bannai, 2013) (**Figure 21**), *A. veronii*, et surtout *A. salmonicida* (Gulla et al., 2016). Cette dernière espèce est bien décrite comme étant la seule spécialisée pour causer une maladie spécifique (Reith et al., 2008).



Figure 21 Poissons infectés par *Aeromonas hydrophila* (Bannai, 2013)

Images de poissons présentant des ulcères parfois nécrosés à la surface de la peau suite à une infection par une souche d'*A. hydrophila* retrouvés dans une rivière du sud de l'Irak.

Certaines espèces (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. trota* et *A. schubertii*) ont quant à elles montré une pathogénicité chez l'Homme. Ces bactéries sont opportunistes et provoquent principalement des infections cutanées et des gastro-entérites et dans de très rares cas des septicémies (Janda and Abbott, 2010). Même si l'exposition à l'eau douce et la contamination par ingestion d'aliments infectés reste le plus courant, il existe de nombreuses voies de contamination et d'infection chez l'Homme par *Aeromonas* listées dans la **Figure 22**.

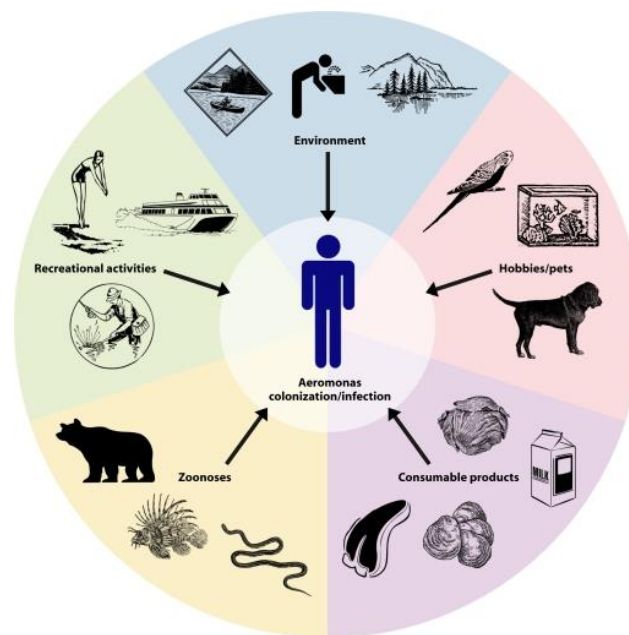


Figure 22 Sources potentielles de contamination chez l'Homme par des souches d'*Aeromonas* (Janda and Abbott, 2010)

Plusieurs *case report* suggèrent que les personnes avec un système immunitaire affaibli suite à des brûlures importantes sont susceptibles de faire une infection à *Aeromonas* (Azzopardi et al., 2011; Hadi et al., n.d.; Lai et al., 2007; Yasti et al., 2009). Il a été rapporté que des patients avaient tenté d'éteindre le feu qui les brûlait avec de l'eau douce de rivière ou de lac (Ampel and Peter, 1981; Barillo et al., 1996; Chim and Song, 2007; Kienzle et al., 2000; Skoll et al., 1998) ou en se roulant dans la boue (Chim and Song, 2007).

Un autre moyen de contamination par *Aeromonas* bien décrit chez l'Homme est via les sangsues. Ces dernières sont utilisées dans un procédé médical très ancien appelé

hirudothérapie (thérapie par les sangsues médicinales). Cette thérapie est utilisée dans de nombreux domaines médicaux et a pour but de faire une saignée et en même temps de libérer des molécules anticoagulantes et analgésiques liées à la morsure de la sangsue (**Figure 23**).



Figure 23 Image d'une sangsue utilisée en hirudothérapie (Herlin et al., 2017)

Sangsue vue de dessus avec la partie inférieure qui lui permet de ramper et de trouver une bonne position et la partie supérieure avec la mâchoire qui permet à la sangsue de se nourrir.

L'hirudothérapie est utilisée dans de nombreux domaines, comme par exemple pour traiter l'ostéoporose, les maladies inflammatoires ou en chirurgie (Herlin et al., 2017; Lui and Barkley, 2015; Sig et al., 2017; Singh, 2010). Les sangsues, comme tout être vivant doté d'un tube digestif, sont porteuses d'un microbiote digestif parmi lequel on peut retrouver certaines bactéries provoquant des infections chez l'Homme (Bauters et al., 2007). De nombreux cas d'infections suite à une hirudothérapie ont été rapportés (Bibbo et al., 2013; Giltner et al., 2013; Gönen et al., 2013; Kruer et al., 2015; Masters et al., 2020; Schnabl et al., 2010; Verriere et al., 2016; Wang et al., 2011; Wilmer et al., 2013) et dans la quasi la totalité des cas, la souche responsable était un *Aeromonas* spp (Pourrahimi et al., 2020). Pour pallier à ce risque, lors des soins, les patients sont systématiquement mis sous antibioprophylaxie ciblée contre *Aeromonas* (fluoroquinolone, triméthoprime–sulfaméthoxazole, céphalosporines de 3^{ème} génération) mais il peut arriver parfois que la souche présente des résistances et entraîne des complications (Bauters et al., 2014; Floug et al., 2019).

Les *Aeromonas* sont des bactéries présentant une grande plasticité génétique (Dallaire-Dufresne et al., 2014), ce qui leur permet d'acquérir de nombreux supports

génétiques tels que les intégrons. Comme dit précédemment, la résistance aux antibiotiques dans les piscicultures est de plus en plus importante, c'est pourquoi l'étude des intégrons chez les *Aeromonas* présente un grand intérêt. De multiples études ayant pour but de caractériser les intégrons de ces bactéries ont été réalisées dans divers pays du monde, en utilisant comme sujets d'étude diverses espèces de poissons.

III.2.1. Intégrons de classe 1 chez *Aeromonas*

Chez les *Aeromonas*, les intégrons de classe 1 (IR1) sont les plus étudiés avec une 50^{aine} de publications en ligne. L'ensemble de ces études montre une prévalence des IR1 très variable, allant de 6,2% à 72% chez des souches d'*Aeromonas* (Carnelli et al., 2017; Deng et al., 2016; Lee et al., 2008). Ces proportions varient en fonction de l'origine des souches. On retrouve par exemple 28 à 48% d'IR1 chez des souches isolées de poissons-chats (*A. veronii* étant l'espèce la plus retrouvée dans cette étude) (Nawaz et al., 2010), 33% d'IR1 dans des souches isolées de carpes (Čížek et al., 2010) ou encore seulement 6,2% chez les *Aeromonas* infectant des truites (Vega-Sánchez et al., 2014). Des études ont aussi porté leurs recherches d'IR1 chez *Aeromonas* non pas dans les poissons mais dans les eaux d'élevage de ces poissons. En Australie, sur neuf prélèvements différents d'eaux de pisciculture, 28,6 % des souches d'*Aeromonas* isolées étaient porteuses d'IR1 (Ndi and Barton, 2011).

Les principales cassettes décrites dans ces IR1 d'*Aeromonas* confèrent des résistances aux β -lactamines, aux aminosides, au triméthoprimé et au chloramphénicol (Lamy et al., 2022).

III.2.2. Intégrons de classe 2 chez *Aeromonas*

Quelques publications (une 10^{aine}) ont montré la présence d'IR2 chez des espèces bactériennes appartenant au genre *Aeromonas*. Le premier réseau de cassettes d'IR2 chez *Aeromonas* a été décrit par Moura *et al* dans une souche isolée d'effluents d'abattoir au Portugal (Moura et al., 2007). Depuis, ils ont été identifiés en aquaculture par exemple chez *A. hydrophila* infectant un mollusque appelé *Mossambicus tilapia* (*Oreochromis mossambicus*)

(Marathe et al., 2016), chez *A. media* isolée d'eaux non traitées du Portugal (Carvalho et al., 2012) ou encore dans des biofilms de souches d'*Aeromonas* d'espèces différentes (*A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. salmonicida*, *A. allosaccharophila* et *A. bivalvium*) (Nagar et al., 2015). Au niveau du réseau de cassettes, ces études ont montré un réseau commun constitué des trois cassettes : *dfrA1* – *sat2* – *aadA1* (Otero-Olarrá et al., 2020) qui est le réseau de cassettes typique chez les IR2 (I.4..1.5.2. Les intégrons de résistance de classe 2, page 39). Les intégrases associés à ces réseaux identiques étaient toutes non fonctionnelles.

De nombreuses fois, les IR2 ont été retrouvés en association avec un ou plusieurs IR1 (Gillings, 2014). Du fait de la présence d'intégrases *IntI2* non fonctionnelles, l'hypothèse de potentiels transferts horizontaux de GRA entre IR1 et IR2 chez les *Aeromonas* dans le milieu aquatique est peu probable. De plus, une étude en 2020 a montré une faible variabilité des réseaux de cassettes d'IR1 et d'IR2 dans des souches d'*Aeromonas* environnementales (Otero-Olarrá et al., 2020) validant ainsi cette hypothèse.

III.2.3. Intégrons de classe 3 chez *Aeromonas*

Ce n'est qu'en 2016 que le premier IR3, appelé In3-7, est caractérisé chez une souche d'*A. allosaccharophila* isolée d'échantillon de boues en France (Simo Tchuinte et al., 2016). La souche présentait une résistance acquise aux β -lactamines et aminoglycosides et son IR3 possédait deux cassettes : *bla*_{OXA-368} et *aac(6')-Ib'* qui codent respectivement des gènes de résistance aux pénicillines et à la tobramycine et gentamicine (**Figure 24**).

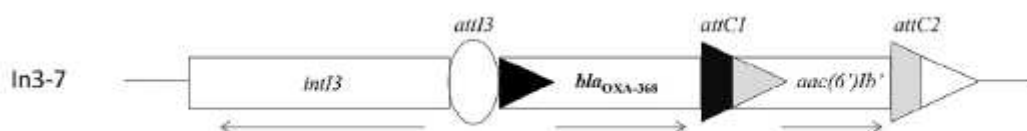


Figure 24 Structure de l'intégron de classe 3 In3-7 (Simo Tchuinte et al., 2016)

Le réseau de l'intégron In3-7 contient deux cassettes, la cassette *bla*_{OXA-368} hébergeant un gène de résistance aux pénicillines et la cassette *aac(6')Ib'* hébergeant un gène de résistance à la tobramycine et la gentamicine.

L'analyse de l'environnement génétique de cet IR3 a révélé qu'il était situé sur un petit plasmide très similaire aux plasmides pASa-1 (GenBank : AY301063) et pASa-2 (GenBank : AJ508383) précédemment décrit chez *A. salmonicida*. Des gènes de mobilisation y ont été retrouvés (*mobA*, *mobB* et *mobD*) suggérant une nouvelle fois la possible dissémination de GRA via des EGM. A ce jour aucun autre IR3 n'a été détecté chez une souche appartenant au genre *Aeromonas*.

Synthèse et objectifs du travail de thèse

La résistance aux antibiotiques dans l'environnement est ancrée dans le concept « *One Health* ». En effet, ce problème touche non seulement l'Homme mais également les animaux et se retrouve également dans de nombreuses matrices environnementales, notamment les effluents anthropiques. Pour évaluer la dissémination des résistances dans l'environnement, des marqueurs phénotypiques et surtout génotypiques sont nécessaires. Comme cela a été développé dans la partie introductive, les intégrons, par leur aspect quantitatif, sont considérés aujourd'hui comme un marqueur global pertinent de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement et donc comme des marqueurs de la pollution anthropique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons souhaité positionné les intégrons toujours comme des marqueurs de la pollution anthropique mais en les analysant selon deux modèles différents : (i) tout d'abord de façon globale à partir d'effluents hospitaliers et d'abattoirs en analysant de façon qualitative leur composition en cassettes ; ce travail est présenté dans la **Partie I** à travers les articles « **CALYPSO** », « **CALYPSO Nouvelle-Aquitaine** » et « **ROSETA** » ; (ii) puis de façon plus ciblée en les recherchant à partir de souches d'*Aeromonas* isolées de poissons soumis à différentes pressions de sélection antibiotique ; ce travail est présenté dans la **Partie II** à travers le projet « **ARMANI** ».

Partie I. Analyse des cassettes d'intégrons dans les effluents : projets CALYPSO et ROSETA

I.1. CALYPSO

Le premier projet « **CALYPSO** », appelé également « **CALYPSO historique** », a consisté en une analyse qualitative du contenu en cassettes des intégrons présents dans des effluents hospitaliers, urbains, d'abattoirs et de rivières. Une approche par amplification des réseaux de cassettes des intégrons de classe 1, 2 et 3 à l'aide d'amorces ciblant les régions 5'CS et 3'CS puis un séquençage haut débit des amplicons par la technologie Ion Torrent®, a permis d'identifier le « cassetome » de ces différents types d'effluents anthropiques (dix hôpitaux, deux villes, deux abattoirs, deux STEU et deux rivières). Un premier mapping des séquences générées par NGS, appelées *reads*, contre l'ensemble des cassettes de gènes connues au moment de l'analyse et disponible en ligne dans la GenBank (426 cassettes disponibles en 2019) a été réalisé. Ce mapping a donné accès au « cassetome » des différents effluents. La différence des « cassetomes » entre les différents types d'effluents ainsi que les similarités au sein de chaque type d'effluents a été révélée. Cependant, une quantité non négligeable de *reads* obtenus ne mappait avec aucune cassette connue à l'issue du premier mapping indiquant la présence probable de nouvelles cassettes présentes. La recherche de nouvelles cassettes s'est effectuée par un assemblage des *reads* en contigs (séquences d'ADN de taille plus grande) puis une recherche de structures CALIN (séquence nucléotidique avec un site *attC* et éloignée d'une séquence d'intégrase) absentes des databases. Chaque nouvelle cassette appelé GCLIM a été annotée manuellement et leurs séquences ont été analysés. Au total cinq groupes ont été définis : GCLIM-U codant des peptides sans domaine conservés ; GCLIM-D codant des peptides de fonction inconnue avec des domaines conservés ; GCLIM-C codant des peptides de fonction connue avec des domaines conservés ; GCLIM-AR codant des peptides avec possiblement une fonction de résistance aux antibiotiques et enfin les GCLIM-N qui ne semblent pas coder de peptides.

C'est ainsi qu'au terme de cette étude, 593 cassettes auparavant jamais décrites ont été découvertes. Actuellement, au sein du laboratoire, nous possédons donc une liste de 1019 cassettes (426 cassettes connues + 593 cassettes GCLIM). Un deuxième mapping a été réalisé avec ces 1019 cassettes. En comparant les « cassetomes » des deux mappings différents, une modification importante a été observée chez les intégrons de classe 3 : les cassettes GCLIM constituaient une proportion importante du « cassetome » et représentaient par exemple entre 68% et 83% du « cassetome » des effluents urbains. Au niveau des intégrons de classe 1, peu de changements ont été observés et les changements étaient quasi nuls en ce qui concerne les intégrons de classe 2.

Le projet CALYPSO historique fait l'objet d'un article présenté ci-après, article pour lequel je suis 3^{ème} auteure et auquel j'ai participé via l'analyse des données et l'écriture du manuscrit. Il sera prochainement soumis au journal *Nature communications*.

Integrans gene cassettes in effluents: from integrons to “cassettomics”

Thomas Jové¹, Valentin Tilloy², Lucie Laval¹, Claire Da Silva¹, Margaux Gaschet¹, Emilie Guérin³, Marie-Cécile Ploy¹, Christophe Dagot¹, and Olivier Barraud^{1*}

¹ INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Université Limoges, Limoges, France

² CNR Herpesvirus, UF9481 Bioinformatics, CHU Limoges, Limoges, France

³ UF8843 Medical Genomics Department, CHU Limoges, Limoges, France

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 5 55 05 61 65

Email: olivier.barraud@unilim.fr

ABSTRACT

Effluents play a major role as dynamic drivers for antimicrobial resistance genes and mobile elements moving these genes across bacteria. Mobile integrons (MI) are key actors in disseminating antimicrobial resistance genes as mobile elements called gene cassettes (GCs). Indeed, class 1, 2 and 3 MI are widespread in environmental settings especially when anthropologically impacted. Load of MI in environment is mostly studied on the basis of the quantity of their integrase genes which does not suffice to discriminate effluents each other. We previously reported the pool of GCs in effluents could be distinct according to the effluent type in relation with the level of anthropic impact. To further explore this hypothesis, we designed a novel NGS-based method to extensively explore the pool of MI GCs in a given effluent (*cassettomics*), determine the relative proportions of GCs and be able to recover and identify novel MI GCs. This method, applied to the three main classes of MI, can detect any embedded GCs, independently of their sequences. Besides, it can be iteratively redone using each time an updated pool of GCs enriched with the newly identified ones. We set up and applied our method on a set of 18 environmental samples of various origins (rivers, hospital effluents, urban effluents, slaughterhouse effluents, wastewater treatment plants influents) which led us to discover 593 novel MI GCs (to be compared to the initial known 426 MI GCs). We so obtained patterns of the relative proportions of each of the 1019 GCs for each effluent. Lastly, analysis of these patterns, called *cassettomes*, allowed us to discriminate hospital effluents compared to any other type of environmental samples. This workflow can become a useful tool to discover new MI GCs, to track and compare the pool of MI GCs in distinct types of effluents and can become a valuable epidemiological antibiotic resistance survey tool.

INTRODUCTION

Antibiotic resistance (AR) relies on the ability of bacteria to spread antibiotic-resistance genes via horizontally transferred mobile genetic elements (MGEs) in bacterial populations within and between different ecological compartments including human, animal and environmental settings ¹. To do so, bacteria developed an arsenal of MGEs like plasmids, transposons, integrative and conjugative elements, but also gene cassettes of integrons ². Integrons are efficient genetic elements for bacterial adaptation to changing environments ³. Indeed, these platforms are able to acquire, cumulate and express a large collection of genes encoded by non-autonomous mobile elements called gene cassettes (thereafter termed GCs). Integrons are widespread in the bacteria world, recovered in diverse bacterial taxa, for instance detected in 20% of γ -Proteobacteria complete genomes ⁴. They are defined as the association of an *IntI* integrase gene able to capture and stockpile GCs, an adjacent *attI* recombination site where GCs insert and a functional *P_c* promoter enabling expression of promoterless genes GCs carry ³. Successive integrations of GCs in *attI* site result in GCs arrays with genes of the more distal GCs being less or not expressed ⁵. Nevertheless, these integrations are reversible as *IntI* also catalyze GCs excisions, resulting into a variety of GCs arrays ⁶. The GCs arrays therefore consist in variable regions standing between the conserved functional part of MI, known as 5'-CS (5' Conserved Segment) and a second, namely 3'-CS, (conserved segment). Thousands of integrons classes have been reported based on the sequence of their *IntI* integrase ⁴. Each integron class encode a closely related *IntI* integrase but very distinct *attI* recombination sites and 3'-CS. Mobile integrons (MI) have been mobilized into conjugative elements ⁴. Five classes of MI (MI1-MI5) have been reported so far, MI1 to MI3 being the most important drivers of AR GCs in clinical settings. MI are widely involved in spreading AR genes across bacterial pathogens and commensals within clinical settings, veterinary (including wild animals) and diversely anthropologically impacted environments ^{2,7-12}. As of today, no less than 174 AR GCs

to 11 major antibiotic classes have been reported^{2,13}. Many of these AR GCs are very common in MI1 to MI3 and decline into alleles. Besides AR, at least 252 GCs of unknown function (not experimentally determined or not predictable) have also been reported but most of them are rarely detected in MI¹³. Many studies address the diversity of MI and their GCs have been studied in environmental settings. Indeed, early studies on this topic indicated *intI1*, the prevailing MI1 class, to be abundant in anthropically impacted effluents like hospital or urban effluents⁸. As MI1 are frequently associated to AR GCs, *intI1* is even used as a good proxy for the presence of AR genes in environmental samples^{14,15}. Many studies on environmental MI actually consist in detecting and quantifying *intI1* in various samples. Other reports suggest a wider diversity of MI GCs in the environment than in the clinical settings⁸. Some groups like Ghaly *et al.* investigated the diversity of environmental GCs by PCRs using degenerated oligonucleotides as primers to recover the GCs through detection of their recombination sites called *attC*^{16,17}. Indeed, the sequences of *attC* are not conserved but for short 7/8-bp long motifs and display various sizes (median size, 66bp). These studies reported thousands of novel GCs. However, such approach does not link these GCs to any integrase genes thereby remaining unclear whether their genes indeed are mobilized by MI integrase and/or expressed from a MI *P_c* promoter.

To our knowledge there is no metagenomic study investigating the diversity of MI-associated GCs and comparing the GCs pool between samples of various origins. Based on primers located in MI1 to MI3 5'-CS and 3'-CS, the purpose of this work was to design a novel metagenomic approach to both extensively scout the diversity of MI-associated GCs and to determine each GC relative proportions in a given effluent sample. This method allowed us to discover 593 novel MI-associated GCs and to draw and compare GCs patterns of a collection of 18 environmental samples of various origins, including hospital, urban, slaughterhouse effluents, wastewater treatment plant (WWTP) influents and rivers.

RESULTS

1) Relative proportions of known GCs in effluents from various origins

We amplified MI1 to MI3 GC arrays of total DNA extracts from 18 environmental samples: 14 effluents from hospital, urban or slaughterhouse origins, as well as two WWTP influents and two rivers (Supplementary Table 1). PCR products were extensively sequenced by NGS Ion Proton™ technology except for rivers MI2 for which no PCR products were obtained.

GCs present in each effluent were first identified by a M1 raw reads mapping performed with a list of 426 available MI GCs (May 2019, 95% nucleotide identity threshold, listed in Supplementary Table 2). No read from PCR products from a given MI class mapped the 5'-CS/3'-CS of another MI class confirming the high specificity of PCR amplifications (Supplementary Table 3). The proportion of assigned reads was the highest for MI1 and the lowest for MI3 (Fig. 1A, median proportion from 81% to 16%). For MI1 and MI3, the assignment rates were the highest in hospital effluents but not for MI2 for which the WWTP influents displayed the highest proportion of assigned reads (Fig. 1). Whatever the effluent type, MI1 were the most covered. The average number of identified GCs was the highest for MI1 (136 GCs), significantly lower in MI3 (70 GCs) and the lowest for MI2 (29 GCs) and this trend was observed in every effluent type (Table 1A). For MI1 to MI3, most mapped reads (>90%) mapped to a limited number of GCs thereby referred to as “frequent GCs” (>1% of WNR, see Methods for WNR calculations). The GC pool diversity therefore mainly relied on the rare GCs that happened to be numerous in MI1 (125 in average), smaller in MI3 (63) and much limited in MI2 (Table 1A). Detailed analysis of the mapped GCs indicated aminoglycosides resistance and β -lactams resistance GCs predominated the MI1 GC pool in nearly every effluent; nevertheless, the nature of GCs responsible for their high rates differed according to the effluent (Supplementary Figure 1). Interestingly, whatever the MI class, the origin of effluent does not seem to shape the GC pool structure (Supplementary Figure 1). Indeed, there was as much GC

pool differences between effluents of a same type as between effluent types (Supplementary Figure 1).

2) Discovery of novel MI GCs

Novel MI GCs identification workflow

Depending on effluents, between 16% (MI1) and 91% (MI3) of the NGS raw reads remained unidentified after this first M1 raw reads mapping (Fig. 1). This suggests these reads could stand for still not known integrons GCs. We therefore designed a novel raw reads analysis pipeline intended to identify unseen integron GCs (Fig. 2). Briefly, this consists in looking for *attC* sites in at least 500p long contigs assembled from unmapped reads (details in Methods section). After a first round of this pipeline, GCs were detected in 8.2% of the 53992 contigs assembled from unmapped reads and 3.8% displayed novel GCs (Supplementary Table 4). Subsequent manual annotation of these contigs confirmed they display 542 novel and complete GCs (Supplementary Table 4). These novel 542 GCs were added to the initial list of 426 GCs to redo the raw reads mapping with a more extensive set of GCs, thereby refining the description of each effluent GCs pool (Fig. 2). Four complete rounds of the entire process have ultimately been completed; indeed, at this stage, only 5.3% assembled contigs of unmapped reads displayed novel GCs, the ratio of contigs with novel GCs was close to zero (0.3%; Supplementary Table 4) and consistently, only 10 novel GCs could be identified. All accumulated, 13544 *attC*-positive contigs were annotated to identify 593 unseen MI GCs (listed in Supplementary Table 5). Location of these GCs within MI was confirmed for 81% of the 593 novel GCs associated in at least one contig to a fragment of MI 5'-CS or 3'-CS. We validated the *attC* sites for 72% of the 593 novel GCs which happened to be higher than for the 426 initial GCs (61% of the *attC* detected) and therefore confirmed the high conservation of the recombination *attC* sites in the detected MI GCs.

Features of the 593 novel MI GCs identified

All the novel GCs were further analyzed for their function and consequently felt into five groups (see Methods, summarized in Supplementary Table 6): most make up a large first group of GCs encodings peptides with no conserved domain, thereby remaining of unknown and unpredictable function we renamed as GCLIM-U (n=404, 68%, listed in Supplementary Table 7). A second group of 38 GCs (6%) encoding peptides with conserved domain of unknown function (DUF) were considered as GCLIM-D (described in Supplementary Table 8). A third group gathers 114 GCs (19%) encoding peptides with conserved protein domains of known activity (pfam or cd domains); these GCs were designated GCLIM-C (detailed in Supplementary Table 9). Few GCs from these three GCLIM-U, GCLIM-D or GCLIM-C groups encoded several peptides. Moreover, peptides they encode were highly diverse most of them could not be clustered even with a threshold as low as 30% amino-acid identity, highlighting a high structural diversity of peptides (Supplementary Table 5, last column). Interestingly, only 27 (5%) of the novel GCs were predicted as possibly encoding putative novel AR proteins of existing families (GCLIM-AR, described in Supplementary Table 10). The 27 GCLIM-AR encode peptides putatively conferring resistance to 9 classes of antibiotics, mostly to β -lactams (n=6, 5 consisting in new members of the OXA family) and quaternary ammoniums (n=6; Table 2). A last group of 10 GCs (2%, GCLIM-N, detailed in Supplementary Table 11) does not seem to encode any peptide as we could not find any coding sequence in both strands. Altogether, the 593 MI GCLIMs (average size 593bp) were significantly shorter than the 426 known MI GCs (average size 673bp). Among GCLIMs, the GCLIM-N (average size: 406bp) and GCLIM-U (average size: 536bp) were significantly smaller compared to other groups of GCLIMs, in agreement with the uncertainty they indeed encode functional proteins (Supplementary Figure 2). Conversely, GCLIM-AR and GCLIM-C were the longest GCLIMs with similar sizes

between each other (720bp and 773bp long, respectively, Supplementary Figure 2). There was no significant difference between the size of GCLIM-AR and the set of the 426 known MI GCs thereby supporting their features are similar to the classical MI GCs (Supplementary Figure 2).

3) Relative proportions of all known and novel GCs

Diversity of the effluents MI GCs

Identifying 593 novel MI GCs after four rounds of the workflow (Fig. 2) led us to think our initial description of each effluent GC pool, performed with 426 GCs, was limited by the relatively low number of used GCs compared to the actual existing diversity of MI GCs. This was supported by the low percentage of reads mapping the initial 426 GCs, especially for MI3 (16%, Fig. 1A). To have a better insight into the structure of effluent GC pools, a final M2 raw reads mapping was performed with the initial set of raw reads against a merged list of the now available 1019 (426 + 593) MI GCs (Fig.1B and Fig. 3). Compared to the initial M1 mapping, the proportion of mapped reads with the M2 mapping was similar for MI1 and MI2 suggesting the novel GCLIM GCs do not importantly contribute to the GCs pool of these MI classes, whatever the considered effluent type is (Fig. 3). Conversely, the average proportion of mapped reads in MI3 was 3.7-fold higher compared to M1 mapping (from 16% to 59%) with largest contributions to this increase from urban (x 7.6), WWTP (x4.2) and rivers (x3.4) while it did not significantly differ in hospital effluents. Novel GCs were mostly present in MI3, especially in MI3 from environmental effluents. This was consistent with a comparison of the number of mapped GCs for each MI between M1 and M2 mapping (Table 1B). Indeed, the average number of detected GCs for MI3 was nearly 3-fold higher in M2 mapping compared to M1 mapping while it was only 50% higher for MI1 and almost unchanged for MI2 (Table 1A Vs Table 1B). Interestingly, in this M2 mapping, the average number of mapped GCs in MI1 and MI3 was

similar with more than 200 GCs, with the largest contribution from urban effluents for both MI classes (Table 1B). To further compare the number of MI GCs and their diversity between samples, we calculated the richness and the α -diversity (Shannon index), metrics commonly used in ecology to describe microbiota. Once applied to our data, these indicators provide MI GCs diversity we can compare between MIs and between effluents types (Supplementary Figure 3 and Supplementary Figure 4). For MI1, the GCs diversity was the lowest in hospital and slaughterhouse effluents (richness around 100 and Shannon index around 2) compared to effluents of other types (Shannon index around 2.5 and richness around 200). Conversely, no difference between effluents types was observed for MI2 GCs diversity (Shannon index between 1 and 1.5, richness at 20). For MI3, values were the highest in rivers, urban, WWTP and slaughterhouse effluents (Shannon index between 2.5 and 3, richness at 250) whereas in hospital effluents, they did not reach values obtained for MI1.

GCs pools between MIs

We then estimated in each effluent the proportion of GCs detected in a single MI class or shared with one or both of the two other MI classes (Fig.4 and Supplementary Tables 12A and 12B). While most MI2 GCs were also detected within either MI1 or MI3, these shared GCs represented only a small proportion of the MI1/MI3 GCs (around 20%). Most importantly, only 66% of MI1 GCs and 58% of MI3 GCs were shared with one or both of the others MIs and only 107 GCs (12% of all the considered MI GCs) were detected in the three MIs (Fig. 4). These data highlight limited exchanged rates across MIs of distinct class. These trends were similar in every effluent whatever their origin and therefore seems not directly related to the level of anthropic impact (Supplementary Tables 12A and 12B).

Composition of each effluent in MI GC: cassetomes

A more detailed analysis of the prevalent GCs in each effluent confirmed some of the novel GCLIMs were highly represented in MI3 being often part of the major GCs; for instance, in urban effluents, GCLIMs consisted in 68% or 83% of all the MI3 mapped reads (Fig. 3). Conversely, pools of MI1 GCs were only slightly changed with the introduction of the GCLIMs and those from MI2 were unmodified (Fig. 3). Whatever the effluent type comparison, MI2 cassettes looked very similar between effluents types (HF effluents compared to UF, SF or WF, for instance) but also between each effluent (hospital effluent compared each other, for instance): in every effluent, three GCs predominated, namely *dfrA1*, *sat2* and *aadA1*. Conversely, M2 mappings for MI3 display a shift in the distribution of the GCs mapped in hospital effluents compared to any other type of effluents (Fig. 3 and Supplementary Table 13). Indeed, in every hospital effluent but one, predominant GCs encoded resistance to aminoglycosides or β -lactams while in every other effluent, the most abundant GCs were of unknown functions, mostly from those newly identified in this study like GCLIM-U or GCLIM-D (Fig. 3 and Supplementary Table 13). The large pool of novel GCs identified in this study happens therefore to be very important in the MI3 GCs arrays, except those from hospital settings where AR GCs predominate. For MI1, aminoglycosides resistance GCs prevailed in every effluent, especially in slaughterhouses effluents where they exceeded 88% of the mapped reads (Supplementary Table 14). This type of GCs was followed by β -lactams or trimethoprim resistance GCs in hospital, urban and slaughterhouses effluents, but β -lactams or quaternary ammonium compounds resistance GCs in WWTP and rivers (Supplementary Table 14). *gcu* and novel GCLIMs were poorly represented, being over 10% of the mapped reads only in one urban and one WWTP influent, respectively (Supplementary Table 14). It is noteworthy that despite aminoglycosides resistance GCs predominate in MI1 for all effluents, this was not driven by the same GCs upon effluents: in most effluents (10/18), *aadA* streptomycin and spectinomycin resistance GCs predominated while others displayed *aacA4* and derivatives

(*aacA4* or derivatives, 7/18; *aadB*, 1/18) tobramycin/gentamicin resistance GCs (Supplementary Table 15). A detailed analysis of the detected MI1 aminoglycosides resistance GCs in hospital effluents revealed it is highly variable even between two hospitals from the same country: HF2 distinguish from HF1 with the high-level detection of *aacC2*, HS1 and HS2/HS3 do not display the same predominant aminoglycoside resistance GC and the same for HG1 compared to HG2. The same trend was observed with effluents from other origins: there was no common pattern of aminoglycosides resistance GCs between effluents from the same type as well as between effluents of distinct origins (Supplementary Table 15). These variations do not result from dynamical variations of the GCs pool within an effluent as we could not observe such variations when the same effluent was sampled and analyzed at two sampling times (HF1a and HF1b are from the same French hospital effluent). The nature of the most prevalent MI GCs can also be commented: in 7 out of 10 hospital effluents, the *aacA/aacC/aadB/aphA* tobramycin/gentamicin resistance GCs predominated while in the 3 remaining hospital effluents, as well as in all other effluents types, the *aadA* streptomycin and spectinomycin resistance GCs were detected at the highest rates, especially in slaughterhouses in which *aadA* GCs represented more than 85% of the mapped reads (Supplementary Table 3). A similar analysis can be performed for β -lactamases encoding MI GCs, the second most detected group of GCs detected in effluents in MI1 and MI3 (Supplementary Table 16). The *bla_{OXA-10}* GC predominated in most effluents whatever their origin. But, as observed for aminoglycoside resistance GCs, the predominating β -lactamases MI GCs can differ between effluents of the same type (*bla_{OXA-10}* in most of hospital effluents, *bla_{OXA-1}* or *bla_{OXA-2}* in others) and between effluents of the same type and from the same country (*bla_{OXA-10}* in HG1, *bla_{OXA-1}* in HG2).

4) Use of cassetomics to discriminate effluent types (PCoA analysis)

Considering GCs types or each MI taken individually is not powerful enough to discriminate effluents based on their MI GCs pools. For each MI class, we therefore used PCoA (principal component analysis) using each GCs as a dimension and WNR as data (Fig.5). It resulted most of hospital effluents could be clustered and taken away from any other effluents type based only on MI1 cassetomes (Fig. 5A). All effluents of other types were clustered and therefore not distinguished. Distinction between hospital effluents and effluents of other types was even more marked with MI3 cassetomes (Fig. 5C). As expected from previous observations, such comparison of MI2 cassetomes does not allow to group effluents belonging to the same type (Fig. 5B).

DISCUSSION

In this study, we conceived a novel method to extensively qualitatively and semi-quantitatively describe the composition of a given environmental sample in MI GCs. This method results for every sample in a MI GC profile we refer to as a “cassettome signature”, that indicates the relative proportions of all detected MI GCs. Cassettome signatures constitute an innovative and useful tool to compare effluent types and notably to distinguish hospital effluents from other effluent types. Since MI GCs are major drivers of AR genes into clinical, animal and environmental settings, and since assessing antimicrobial resistance in the environment is highly complex, it is of utmost importance to have high-throughput tools like cassettome signatures allowing to reflect the diversity of MI GCs in one sample.

Conversely to other available metagenomic studies addressing the MI and GCs diversity in environmental samples^{16,17}, we did not unlink the detection of MI and GCs. Indeed, in our approach, we only detect GCs located into MIs and therefore likely to be expressed, shuffled into the GCs array and mobilized by horizontal gene transfer. These GCs are therefore the more

at risk to be acquired by bacterial pathogens, which justifies our special interest. Besides, focusing on integrated GCs increases the probability these GCs are functional to integrate into/excise from MIs. We designed oligonucleotides to target the 3'-CS of the clinical MI1¹⁵. Indeed, this type of MI1 displays as 3'CS part of the entire set of the *qacEΔ1-sul1-orf5* genes inherited from the MI1 capture by a Tn402 transposon that would have occurred in clinical setting while environmental pre-clinical MI1 do not display any of these genes. By targeting clinical MI1 in the environment, we therefore detected GCs integrated into MI1 that may be already located in human adapted bacteria and most probably on plasmids for horizontal transfers. Our method is adaptable and could easily be implemented with another specific alternative MI1 3'-CS primer that binds DNA regions located downstream pre-clinical MI1 GCs arrays. Likewise, another primer design could also allow to recover the so-called hybrid MIs, not researched in our study, which display the 5'-CS of one MI class and the 3'-CS of another class¹⁸.

Another unique feature of our approach is our interest for NGS reads that did not match any of the 426 known MIs GCs. Albeit this list was already unique in the literature, compiling reviews and datasets from the INTEGRALL database curating process, a large proportion of the reads happened to be unidentified, especially for MI3. Once assembled into contigs, using our unique method, we found many of these reads actually stand for MI GCs that were not described yet and we could identify 593 novel complete MI GCs. This strongly supports previous reports on GCs metagenomic studies in environmental settings on the higher diversity of MI GCs outside from clinical settings^{8,16,17}. For most of these novel GCs, we could not predict any function or not even a biochemical activity as their genes encode very diverse proteins with no conserved domain. Considering we discovered them into a relatively limited number of effluents, this means MIs probably carry and disseminate a much larger pool of GCs than previously known. There is therefore a high probability some of these GCs could consist in yet not discovered AR

mechanisms. A major source of these novel MI GCs was MI3. Indeed, the average number of MI3 mapped into an effluent was more than 2.8-fold higher after addition of the novel GCs in the GCs list (compared to 1.5x for MI1 and 1.3 for MI2). This probably reflects the very low knowledge on MI3 and their GCs in the literature, mostly from rare clinical strains¹⁹⁻²⁸. Our study showed that MI3 actually display a pool of GCs at least as diverse as the MI1 one (around to 200 GCs in each MI in each effluent). Conversely, in line with the known low diversity of GCs arrays in MI2 retrieved from isolates^{29,30}, these integrons mostly carried the usual three GCs found in the Tn7 and almost no novel GC could be identified in MI2. Our approach allows implementing the initial list of GCs with novel GCs. We estimated this approach needs to be performed four or five times to reach a plateau with no more identification of novel GCs and/or no significant change in the proportion of mapped reads. By doing this, we ultimately obtained a unique dataset of 1019 MI GCs we used for a final M2 mapping.

By increasing the number of MI GCs to 1019, we obtained more precise cassette signatures we used to compare the pool of GCs between samples upon their origin. Main observation is the fact that GCs with the highest proportions were aminoglycosides and β -lactams resistance GCs, notably in hospital effluents, more markedly for MI3. This is in line with several metagenomics studies^{16,31-33}, as well as with studies on clinical isolates³⁴ for which *aacA4*, *aadA*, *bla_{OXA}* and *bla_{GES}* GCs are highly frequently described. Second, we observed the lowest diversity and richness in MI1 and MI3 GCs concerned hospital effluents, suggesting that GCs may have been selected by an antibiotic selective pressure. Like microbiota for which we know a low diversity and a low richness are in link with dysbiosis³⁵, we can hypothesize a comparable selection occurs with MI GCs. Based on PCoA analyses, we noticed the MI1 and MI3 hospital effluents cassettes clustered and could be separated from effluents of other origins. For MI3, this difference clearly relies on a shift between AR GCs in hospital effluents and GCs of

unknown functions in effluents of other origins. These cassette profiles therefore reflect how highly anthropogenically impacted hospital effluents are, as a potential consequence of high antibiotic consumption. It also highlights how the simultaneous detection of 1019 MI GCs in effluents could be used as a powerful indicator of anthropogenic activities especially of hospital effluents. However, there is no large-scale high-throughput MI GCs composition comparative study between effluents of distinct origins. Although β -lactams and aminoglycosides resistance GCs predominate in hospital effluents, our results suggest this is not due to the same GCs. Major differences in the cassettes can be observed even between effluents from hospital from the same world region (France, Scotland and Germany) or even from the same country (HF1 Vs HF2) where antibiotic consumption policies are more standardized. This indicates environmental parameters shaping effluents cassette are yet to be identified and could not be restricted to antibiotic consumption and/or to antibiotic concentrations in effluents. Likewise, cassette signatures between MIs classes from a same effluent were often very distinct leading to think genetic barriers limiting GCs exchange between MI classes exist. Accordingly, we showed only 12% of all detected GCs are present within the three MI classes and only 60% between MI1 and MI3. This could result from either a distinct bacterial host range for each MI class, which has not been extensively studied in the literature, or from differential benefits, costs and dynamic of each GCs. Nevertheless, it proves MIs from distinct class do not easily exchange GCs.

Our study presents several limits. First, even if we detected hundreds of novel GCs, our number of effluent samples was quite low and hospital effluents were overrepresented. We can expect other GCs would have been detected from other effluents types, like urban effluents. Moreover, data dealing with low richness and α -diversities from non-hospital effluents need to be confirmed including more samples. Second, in the positioning of integrons as markers of anthropic pollution in the AR field, we have to keep in mind AR GCs represent only a very

little part of the resistome³⁶. Nevertheless, even though MI GCs encoding AR function prevail in both clinical and environmental settings (especially in MI1 and MI2), the range of GCs MI disseminate seems much wider. Indeed, the number of GCs of unknown or other function in the initial set of 426 MI GCs was already higher than the number of AR MI GCs (n=174). Consistently, putative novel AR MI GCs were a minority compared to GCs of unknown function in the set of the 593 novel GCs identified here. Their proportion was even very low (4.6%; GCLIM-AR) and we believe for three reasons: (i) MIs have been extensively studied for decades through isolation of AR bacteria leading to identification of many GCs responsible for this specific phenotype^{2,3}, (ii) AR MI GCs are not selected in effluents, except in hospital ones, and could potentially be lost at a higher frequency than in clinical settings, (iii) some of the hundreds GCs we could not assign a function may encode not predictable novel AR proteins as recently evidenced by Bohm *et al.* who identified a *gcu* that actually encodes a novel type of aminoglycoside resistance protein³⁷. Lastly, our approach depicts a one-point overview of MI GCs content with only one of the 18 effluents sampled at two different periods. It would be of interest to observe if this cassetome signature is stable over time.

Being quite easy to learn and affordable, the *cassetomics* approach we report here is an efficient novel method allowing knowledge on MI GCs composition. This approach is of major interest to compare the cassetome signatures of different effluents/ effluent types or to follow the cassetome signature of a given effluent over time. Finally, we can expect that hundreds novel GCs will be discovered in the future, which will improve our knowledge on MI in the environment. As bacterial genes and notably novel AR genes discovered in the clinical setting have progenitors in the environment, our method constitutes a precious tool able to identify them in advance.

METHODS

Studied effluents and sampling procedure

Eighteen effluents were included in this study (Supplementary Table 1). Freshwater sampling, total bacterial DNA extractions and quantification of class 1 to 3 integrons were already performed and described in⁸. Each effluent is here renamed with a first letter referring to the effluent type (Hospital, n=10; Urban, n=2; Slaughterhouses, n=2; Wastewater treatment plants influents, n=2; Rivers, n=2), a second letter indicating its country origin (France, Scotland, Germany, The Netherlands and Luxembourg) and then numbered (Supplementary Table 1). One French hospital effluent was sampled twice (once over the week, the other during week-end) so that samples were called HF1a and HF1b.

Amplification of integrons gene cassettes arrays

GCs arrays of class 1 to 3 MI were amplified from primers designed in 5' and 3'-conserved segments (Supplementary Table 17). CAL1-L, CAL2-L and CAL3-L were designed to anneal the *attI1*, *attI2* and *attI3* recombination sites and therefore at the last part of the cognate 5'-CS regions. Since MI3 display more variations in its 5'CS compared to other classes, CAL3-L was designed in a strictly conserved segment among the 28 MI3 sequences where the 5'-CS is available (Supplementary Table 18). Since the usual MI1 3'CS starts with a *qacE* pseudogene (*qacEΔ1*) closely related to some *qac* GCs, CAL1-R was designed to target the beginning of the *sul1* gene, therefore being strictly specific to MI1 3'CS. This also allows to recover MI1 with an *attI1-sul1* structure. CAL2-R targets the *ybeA* (also known as *orfX*) pseudocassette that typifies MI2. Lastly, since no MI3 3'-CS has been highlighted in the literature yet, we designed CAL3-R in a short region strictly conserved in all the 24 MI3 of which the sequence downstream of the GC array was available (Supplementary Table 18). Specificity assays of PCR amplifications were performed with integron-positive reference strains to ensure each

CAL primers pair only amplifies its cognate MI, even when several MI classes were used as substrate (data not shown). MI GCs arrays were amplified from 5µL of total DNA extract of each effluent with 1 unit of the proofreading High-Fidelity Phusion™ DNA Polymerase (ThermoFisher™), 0.5 mM of each oligonucleotide, 0.2 mM of a dNTP mix in a 50µL final volume. Conditions of amplification were an initial denaturation of 30sec at 98°C followed by 35 cycles of 98°C/30sec denaturation, 60°C/10sec annealing and 72°C/2min elongation followed by a final 5min elongation at 72°C. A sample of PCR products were analyzed on a 0.8% agarose gel. No PCR product was detected for samples RF1 and RF2 (rivers) with CAL2-L/CAL2-R primers. When necessary, several amplifications were performed to reach a total quantity of 1µg of DNA of PCR products as determined using an Agilent Bioanalyzer 2100.

NGS sequencing of amplified integrons gene cassettes

NGS was performed with Ion Proton™ technology (ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) according to manufacturer's instructions, using one Ion Torrent 540 chip for each integron class. A pool of each effluent library, each one identified with a distinct barcode, was loaded on each chip. The NGS Ion Proton sequencing generated a total of 4.42×10^7 (MI1), 7.05×10^7 (MI2) and 5.78×10^7 (MI3) reads.

Bioinformatics analysis

All obtained reads were checked for quality using FastQC v0.11.5 and no trimming was required. Raw-reads were then aligned against concern sequences using BWA-MEM algorithm from bwa 0.7.17-r1188 (raw reads mapping with a seed 50 parameter). In the initial M1 mapping, these sequences consisted in 426 distinct GCs collected from INTEGRALL curation of available online MI sequences as of May 2019 with a threshold of 95% nucleotide identity (detailed in Supplementary Table 2 and sequences available in **Dataset 1**). The final M2

mapping included the 426 GCs supplemented with the 593 novel GCs identified in this study (detailed in Supplementary Table 5 and sequences available in **Dataset 2**).

Both mapping sequences included not only the GCs but also (i) three 81bp representative sequences, namely empty-MI1 to empty-MI3, of the expected PCR products for MI1 to MI3 carrying no GC between the 5'-CS and the 3'-CS, (ii) a MI1 with an *attI1-sulI* 86bp structure, and (iii) the usual *qacEΔ1-sulI* 494bp long sequence from the beginning of MI1 3'CS until the CAL1-R primer. These additional sequences allowed to verify the integron class specificity and to remove from the analysis all reads that matched the sole 5'-CS and 3'-CS and therefore not the integrons GCs variable region.

To prevent reads to redundantly map, which would lead to an overestimation of some GCs relative proportions in each effluent, both M1 and M2 mapping lists were subdivided into 7 (M1A to M1G) and 17 (M2A to M2Q) lists: to construct these lists, we chose sequences with seed ≤ 50 by aligning GCs sequences between each other (bwa seed %) and selecting sequences containing XA tag and having XS tags different from 0. Such discriminative seed parameter was used based on the average size of *attC* sites (72bp) and considered as sufficient to discriminate two GCs with closely related *attC* sites. Both M1 and M2 mappings were then first performed successively on each list taken in the alphabetical order using each time unmapped reads of the previous mapping.

Determination of GCs relative proportions

Relative proportions of each GC were calculated as a Weighted Number of Reads (WNR) index calculated based on (i) the N number of raw reads mapping each GC sequence, (ii) each GC size (S) and (iii) the average size of mapped GCs in the considered effluent (AS) using the formula: $WNR = N \times (AS/S)$. WNR were then expressed as percentages for effluent comparisons.

α -diversity (Shannon index), richness and PcoA analysis were determined with Primer-e v7.0.21 software³⁸. A Venn diagram was built online to determine the number of GCs of each MI that were also mapped in other MIs.

Detection of novel integron GCs

Mapped reads were quantified and discarded using samtools 1.9 (view, sort, index and idxstats options) and bamtools 2.4.1 to convert bam into fastq files. The remaining unmapped reads after the last M1 mapping (M1G) were assembled into contigs using MIRA (Mimicking Intelligent Read Assembly, version 4.9.5). Contigs smaller than 500bp long were removed using a custom Perl script. Integrons were detected from contigs using IntegronFinder v2 (https://github.com/gem-pasteur/Integron_Finder⁴). Contigs with CALIN structures (e.g. in which *attC* sites were detected with a score higher than 1 - IntegronFinder default parameters) were blasted against the nr/nt NCBI database to retrieve GC arrays with unknown sequences. Each CALIN-containing contig with an at least 100bp fragment absent from databases was subsequently manually annotated for its array of GCs. Novel GCs were manually annotated based on the presence of an open reading frame (ORF) and a potential *attC* site. Conservation of the *attC* structures was then confirmed with the standalone IntegronFinder software.

Analysis of novel integron GCs

All the 593 validated novel GCs were further analyzed to get insight into their function (Supplementary Table 5). ORF were considered when at least 150bp long using ATG, GTG or TTG as START codons and searched in both strands of the GC. At least one ORF fitting these criteria could be detected in 583 out of the 593 gene cassettes (98.3%). 47 GCs displayed two ORFs and 2 GCs carried 3 ORFs (Supplementary Table 5). GCs with no ORF were renamed as

GCLIM-N1 to GCLIM-N10. BlastP analysis of the encoded peptides led us to classify GCs into four more groups: GCLIM-AR1 to GCLIM-AR27 if a peptide they encode displays a conserved protein domain found in antibiotic resistance proteins, GCLIM-C1 to GCLIM-C115 if this peptide displays a conserved domain of another known function, GCLIM-D1 to GCLIM-D38 if the conserved domain is of unknown function (DUF domain) and GCLIM-U1 to GCLIM-U404 in case of any related conserved domain in encoded peptides.

Acknowledgments

This study has been funded by CPAM Haute-Vienne, Inserm, Conseil Régional Nouvelle-Aquitaine, APREL CHU LIMOGES 2014, R18065GG and Ministère de l'Agriculture Plan EcoAntbio2, convention 2018-137.

Author contributions

Thomas Jové: Conceptualization, Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing-original draft, Writing – review & editing.

Valentin Tilloy: Conceptualization, Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Software, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

Lucie Laval: Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Writing – review & editing.

Claire Da Silva: Data Curation, Formal Analysis, Investigation

Margaux Gaschet: Investigation, Methodology, Writing – review & editing.

Emilie Guérin: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – review & editing.

Marie-Cécile Ploy: Formal Analysis, Supervision, Writing – review & editing

Christophe Dagot: Formal Analysis, Supervision, Writing – review & editing

Olivier Barraud: Conceptualization, Formal Analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Writing – review & editing

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Baquero, F., Coque, T. M., Martínez, J.-L., Aracil-Gisbert, S. & Lanza, V. F. Gene Transmission in the One Health Microbiosphere and the Channels of Antimicrobial Resistance. *Front. Microbiol.* **10**, 2892 (2019).
2. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00088-17 (2018).
3. Escudero, J. A., Loot, C., Nivina, A. & Mazel, D. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0019–2014 (2015).
4. Cury, J., Jové, T., Touchon, M., Néron, B. & Rocha, E. P. Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **44**, 4539–4550 (2016).
5. Collis, C. M. & Hall, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 155–162 (1995).
6. Barraud, O. & Ploy, M.-C. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J. Bacteriol.* **197**, 2171–2178 (2015).
7. Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C. & Ploy, M.-C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **3**, 119 (2012).
8. Stalder, T. *et al.* Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* **8**, 768–777 (2014).
9. Florez-Cuadrado, D., Moreno, M. A., Ugarte-Ruíz, M. & Domínguez, L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. *Adv. Food Nutr. Res.* **86**, 115–136 (2018).
10. Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R. K., Viridi, J. S. & Gulati, P. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* **51**, 167–176 (2018).

11. Ahlstrom, C. A. *et al.* Genomically diverse carbapenem resistant Enterobacteriaceae from wild birds provide insight into global patterns of spatiotemporal dissemination. *Sci. Total Environ.* **824**, 153632 (2022).
12. Błażejewska, A., Zalewska, M., Grudniak, A. & Popowska, M. A Comprehensive Study of the Microbiome, Resistome, and Physical and Chemical Characteristics of Chicken Waste from Intensive Farms. *Biomolecules* **12**, 1132 (2022).
13. Moura, A. *et al.* INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **25**, 1096–1098 (2009).
14. Gaze, W. H. *et al.* Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* **5**, 1253–1261 (2011).
15. Gillings, M. R. *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* **9**, 1269–1279 (2015).
16. Gatica, J. *et al.* High Throughput Analysis of Integron Gene Cassettes in Wastewater Environments. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 11825–11836 (2016).
17. Ghaly, T. M., Geoghegan, J. L., Alroy, J. & Gillings, M. R. High diversity and rapid spatial turnover of integron gene cassettes in soil. *Environ. Microbiol.* **21**, 1567–1574 (2019).
18. Ploy, M. C., Denis, F., Courvalin, P. & Lambert, T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2684–2688 (2000).
19. Arakawa, Y. *et al.* A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1612–1615 (1995).
20. Correia, M. *et al.* Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2838–2843 (2003).
21. Xu, H., Davies, J. & Miao, V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J. Bacteriol.* **189**, 6276–6283 (2007).

22. Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C. & Ploy, M.-C. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, E306-308 (2013).
23. Papagiannitsis, C. C. *et al.* Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 β -Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5065–5068 (2015).
24. Lee, H. J. *et al.* Recovery of plasmid pEMB1, whose toxin-antitoxin system stabilizes an ampicillin resistance-conferring β -lactamase gene in *Escherichia coli*, from natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 40–47 (2015).
25. Yamamoto, M. *et al.* Molecular Analysis of a blaIMP-1-Harboring Class 3 Integron in Multidrug-Resistant *Pseudomonas fulva*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00701-18 (2018).
26. Jones-Dias, D. *et al.* Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. *Front. Microbiol.* **7**, 1400 (2016).
27. Celejewski-Marciniak, P., Wolinowska, R. & Wróblewska, M. Molecular Characterization of Class 1, 2 and 3 Integrons in *Serratia* spp. Clinical Isolates in Poland - Isolation of a New Plasmid and Identification of a Gene for a Novel Fusion Protein. *Infect. Drug Resist.* **14**, 4601–4610 (2021).
28. Takizawa, S. *et al.* Genomic landscape of blaGES-5- and blaGES-24-harboring Gram-negative bacteria from hospital wastewater: emergence of class 3 integron-associated blaGES-24 genes. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **31**, 196–206 (2022).
29. Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A. & Roy, P. H. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* **184**, 1712–1721 (2002).
30. Mendes Moreira, A. *et al.* Proteae: a reservoir of class 2 integrons? *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 1560–1562 (2019).

31. An, X.-L. *et al.* Impact of Wastewater Treatment on the Prevalence of Integrons and the Genetic Diversity of Integron Gene Cassettes. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e02766-17 (2018).
32. Ghaly, T. M. *et al.* Methods for the targeted sequencing and analysis of integrons and their gene cassettes from complex microbial communities. *Microb. Genomics* **8**, (2022).
33. McGivern, B. B., McDonnell, R. K., Morris, S. K., LaPara, T. M. & Donato, J. J. Novel class 1 integron harboring antibiotic resistance genes in wastewater-derived bacteria as revealed by functional metagenomics. *Plasmid* **114**, 102563 (2021).
34. Domingues, S., da Silva, G. J. & Nielsen, K. M. Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. *Microbiol. Read. Engl.* **161**, 1313–1337 (2015).
35. Weiss, G. A. & Hennet, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **74**, 2959–2977 (2017).
36. Buelow, E. *et al.* Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94**, (2018).
37. Böhm, M.-E., Razavi, M., Marathe, N. P., Flach, C.-F. & Larsson, D. G. J. Discovery of a novel integron-borne aminoglycoside resistance gene present in clinical pathogens by screening environmental bacterial communities. *Microbiome* **8**, 41 (2020).
38. Clarke, KR, Gorley, RN. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. (2006).
39. Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L. & Li, W. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 680–682 (2010).

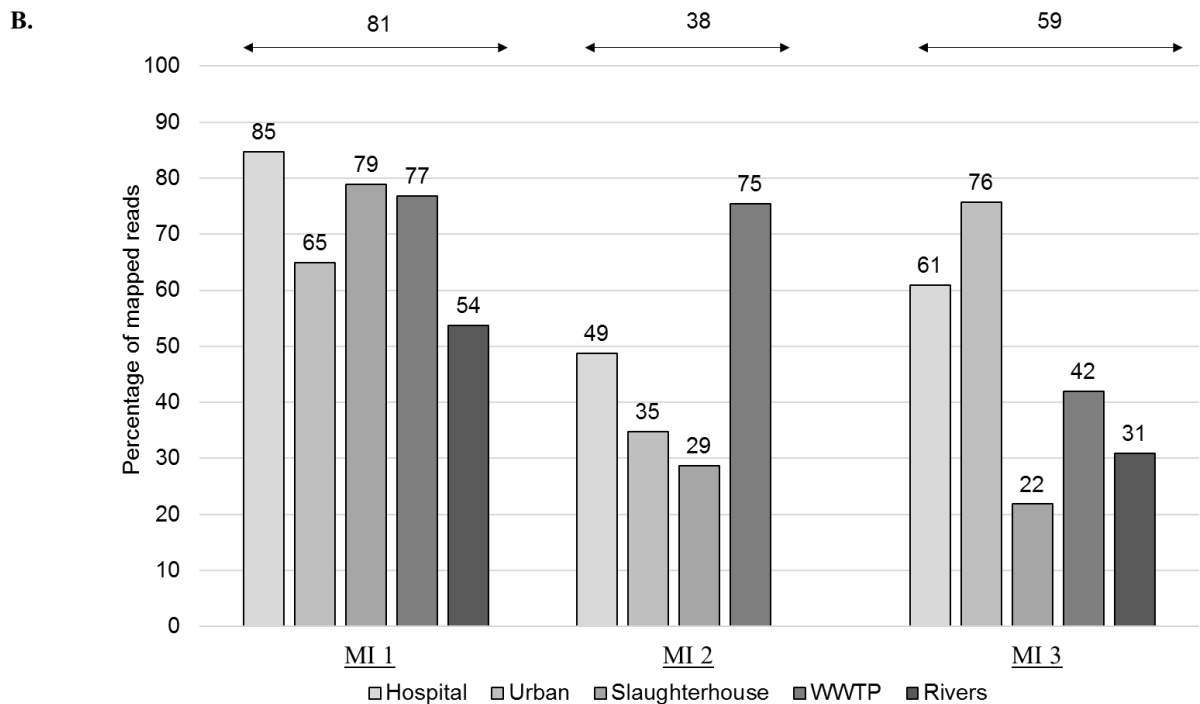
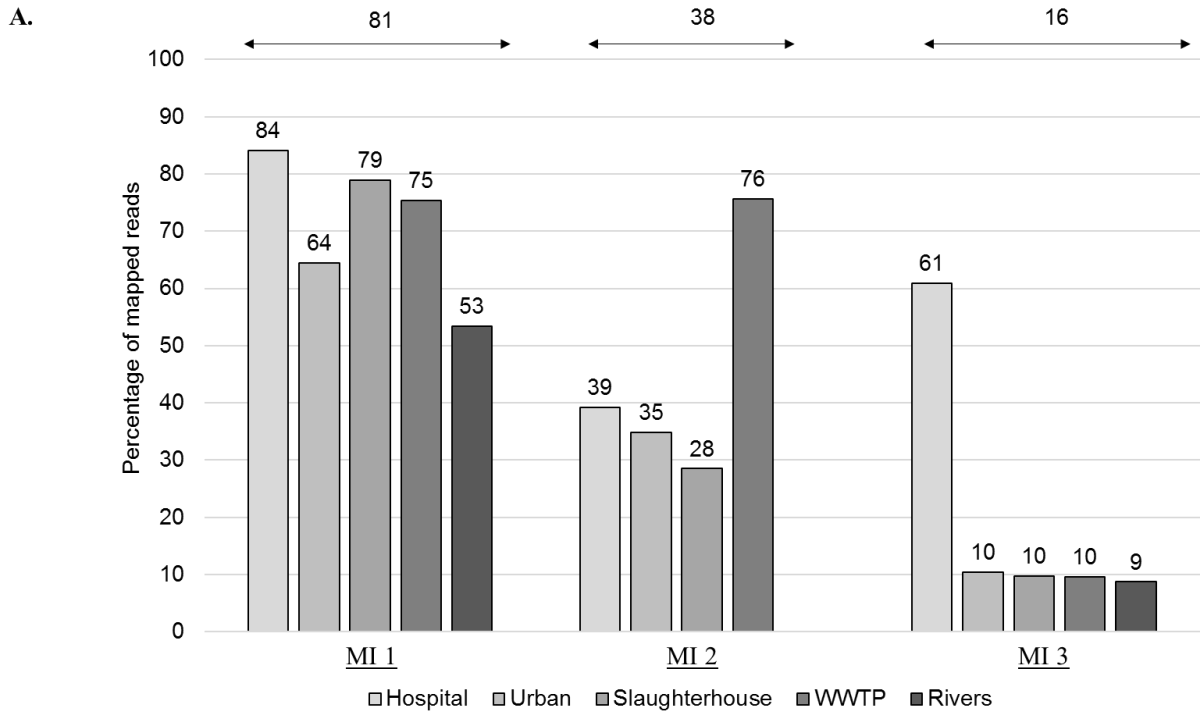
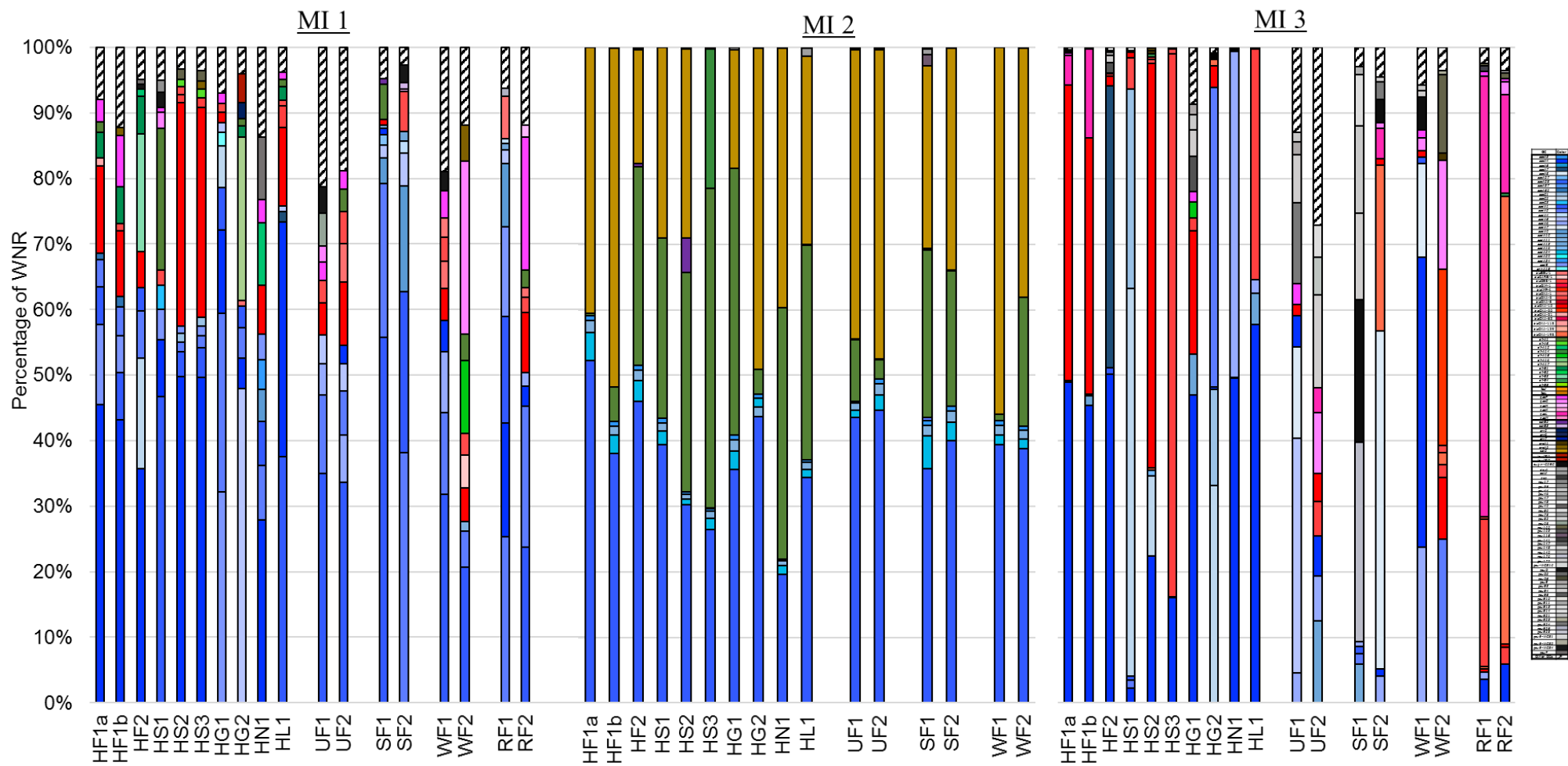


Figure 1: Proportion of assigned reads according to MI class and effluent type.

Effluents are grouped by types. The median percentage of raw reads identified to known GCs are indicated above each histogram. The median percentage of mapped reads considering all effluents, for each MI class, is indicated above the arrow. A: Proportions for the M1 mapping performed with the initial list of 426 GC. B: Proportions for the M2 mapping performed with 1019 GCs, including the 593 novel GCs identified in this study.



Supplementary Figure 1: Relative proportions of the main MI GCs from the M1 raw reads mapping

Y-axis percentages are expressed in weighted number of reads (WNR) calculated as detailed in the methods section. The ten most prevalent GCs are represented with colored bars while an eleventh hatched bar is added to indicate the addition of all the remaining GCs. M1 mapping performed with the initial list of GCs.



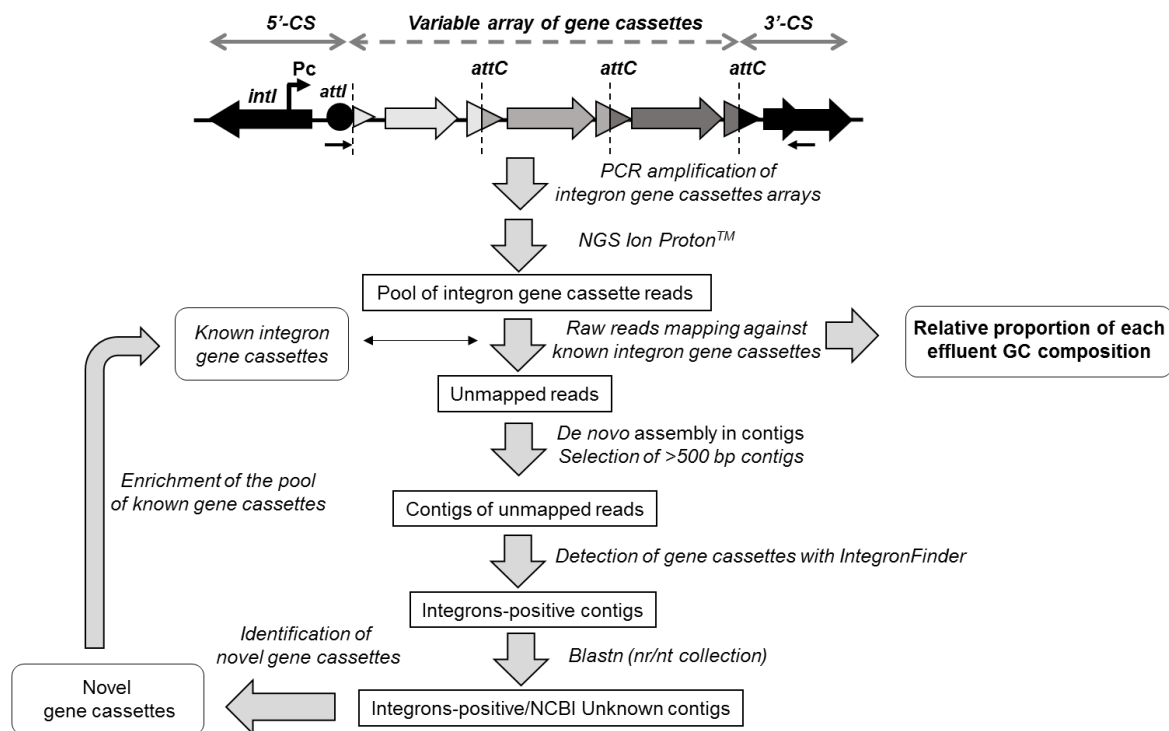
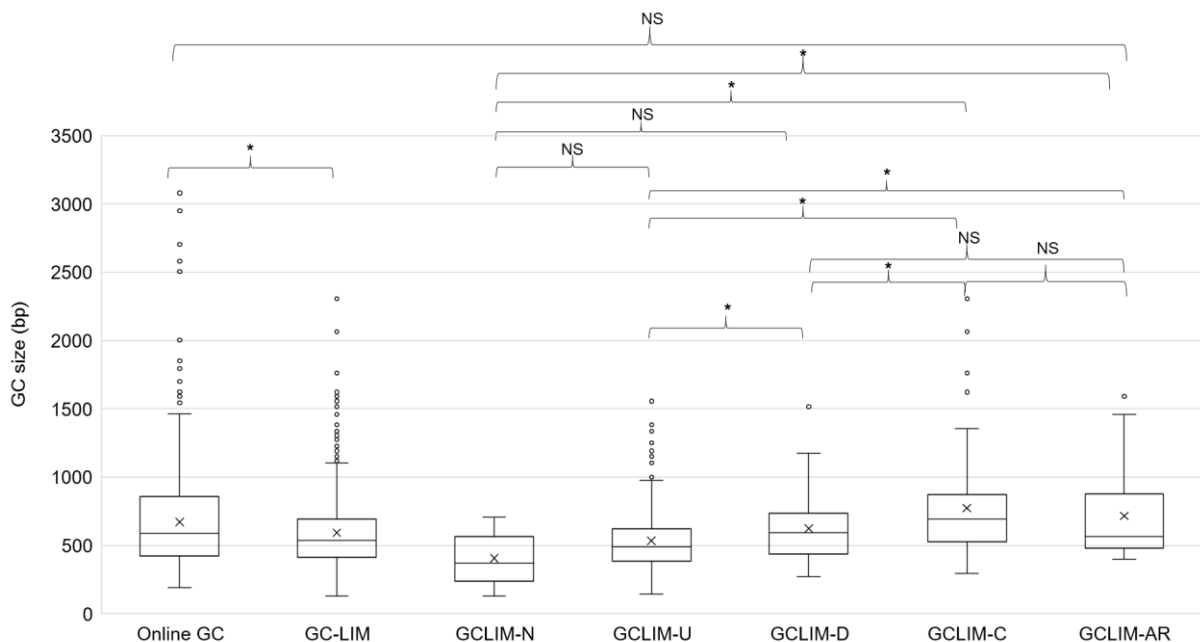


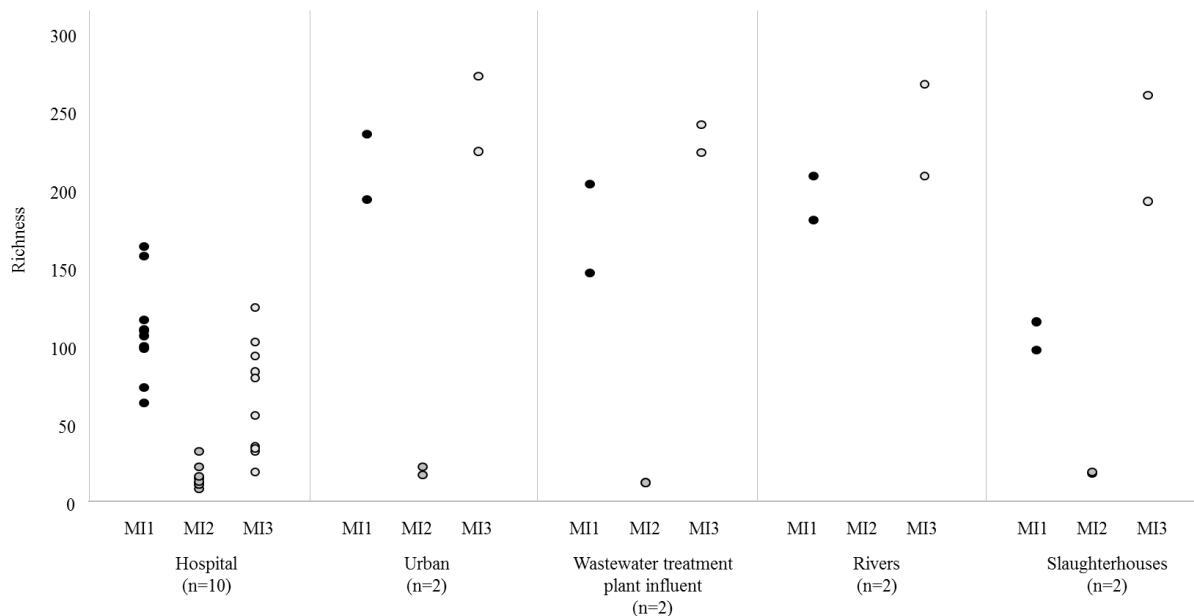
Figure 2: Workflow of NGS reads analysis used in this study for the high-throughput identification of novel MI GCs. Detailed in the Methods section.



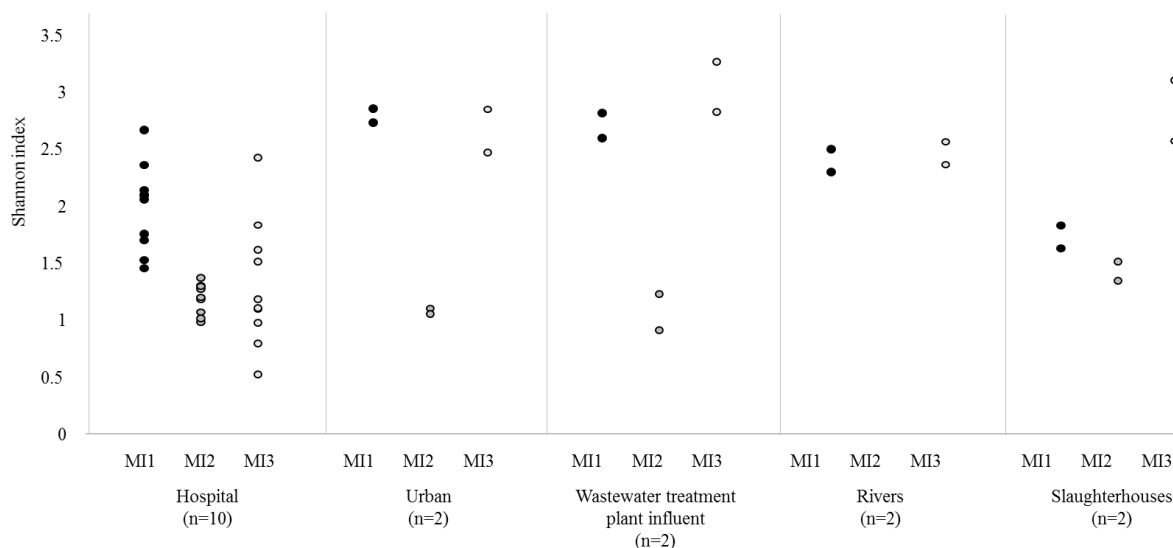
Supplementary Figure 2: Distribution of GCs sizes according to the GCs group.

Distribution of GCs sizes is compared between online GC (n=426) and the novel GC-LIM GCs identified in this study (GC-LIM, n=593) and between the GCLIM groups: GCLIM-n (n=10), GCLIM-U (n=404), GCLIM-D (n=38), GCLIM-C (n=114) and GCLIM-AR (n=27). *: p<0.05 (Wilcoxon - Mann Whitney statistics test).





Supplementary Figure 3: Richness of MI GCs composition according to effluents types. Richness of MI GCs for each effluent is indicated by a circle: a black circle for MI1 (left bar of each effluent type), dark grey circle for MI2 (middle bar of each effluent type) and a light grey circle for MI3 (right bar of each effluent type). MI2 have not been studied in rivers.



Supplementary Figure 4: α -diversity Shannon index of MI GCs composition according to effluents types. Shannon index of MI GCs for each effluent is indicated by a circle: a black circle for MI1 (left bar of each effluent type), dark grey circle for MI2 (middle bar of each effluent type) and a light grey circle for MI3 (right bar of each effluent type). MI2 have not been studied in rivers.

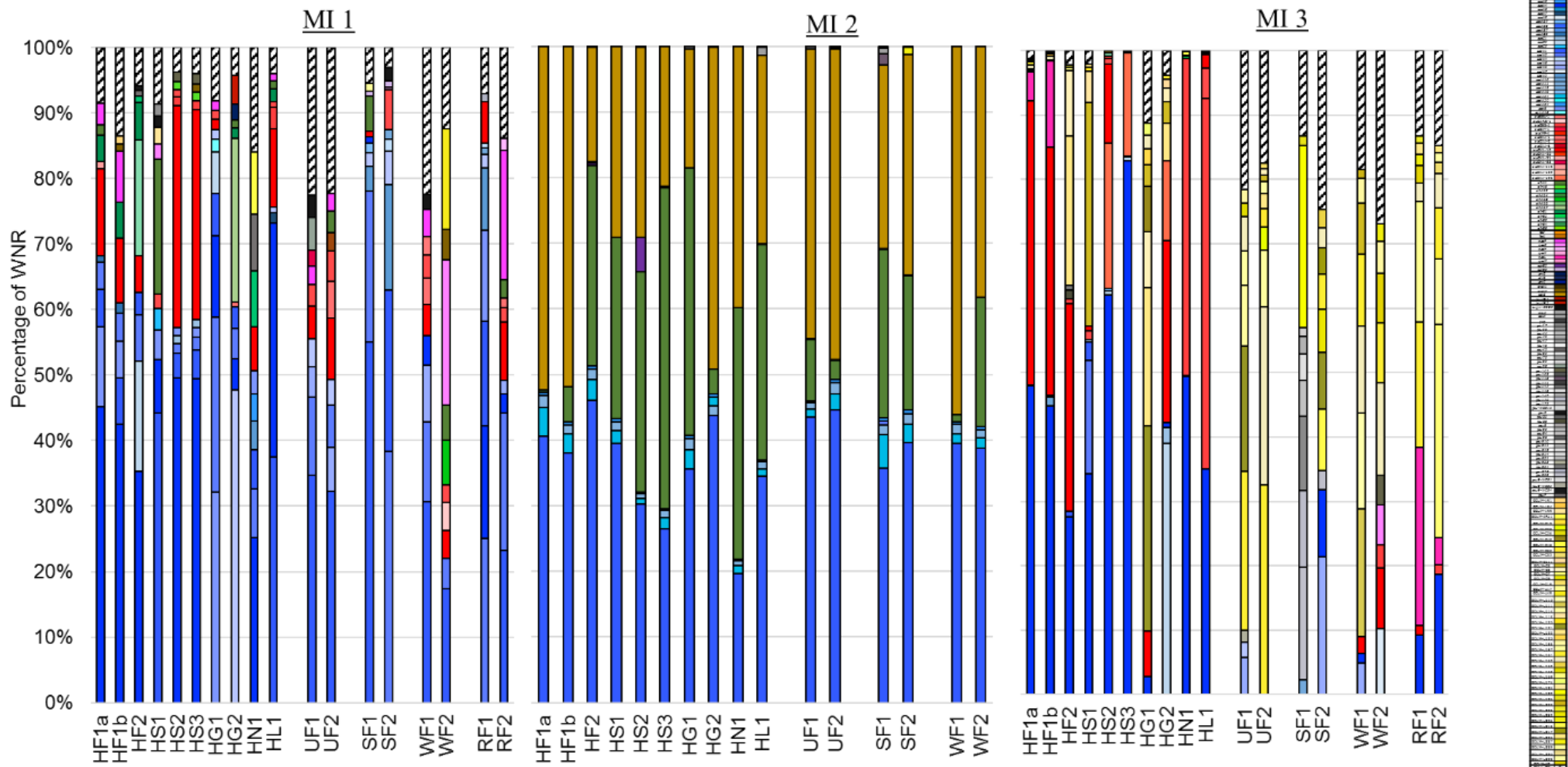
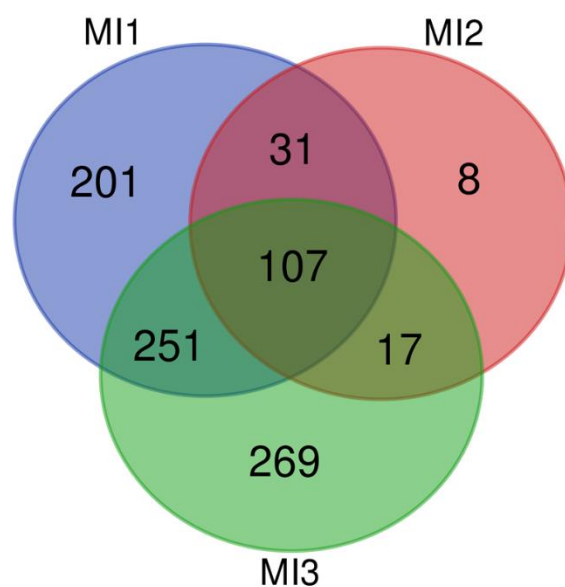


Figure 3: Relative proportions of the main MI GCs from the M2 raw reads mapping. Y-axis percentages are expressed in weighted number of reads (WNR) calculated as detailed in the Methods section. The ten most prevalent GCs are represented with colored bars while an eleventh hatched bar is added to indicate the addition of all the remaining GCs. M2 mapping performed with an updated list of 1019 GCs including the 593 novel GCs identified in this study.



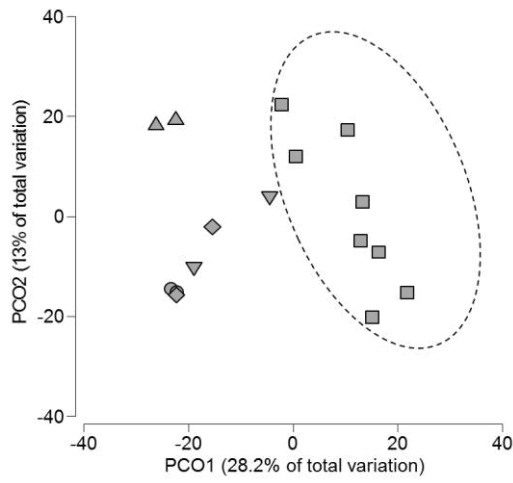


	MI1 GC	MI2 GC	MI3 GC
All	590	163	644
Shared with MI1	--	138 (85%)	358 (56%)
Shared with MI2	138 (23%)	--	124 (19%)
Shared with MI3	358 (60%)	124 (76%)	--
Shared with other MIs	389 (66%)	155 (95%)	375 (58%)

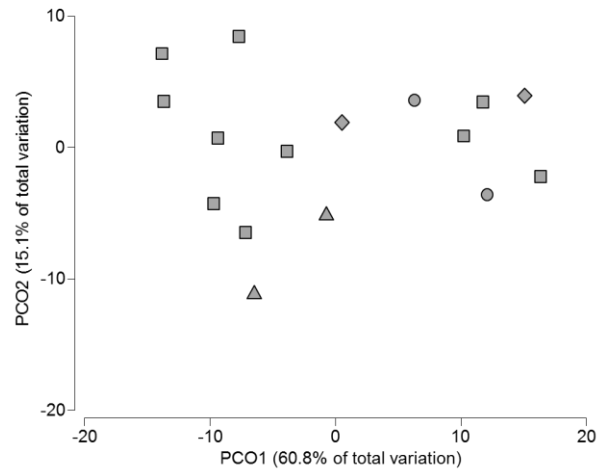
Figure 4: Venn diagram summarizing the proportion of the cumulated mapped GCs of each MI class that are also mapped in other MI classes. Each GC mapped at least once in the set of 18 studied effluents was counted once. Diagram generated online (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Percentage have been rounded to the nearest unit.



A.



B.



C.

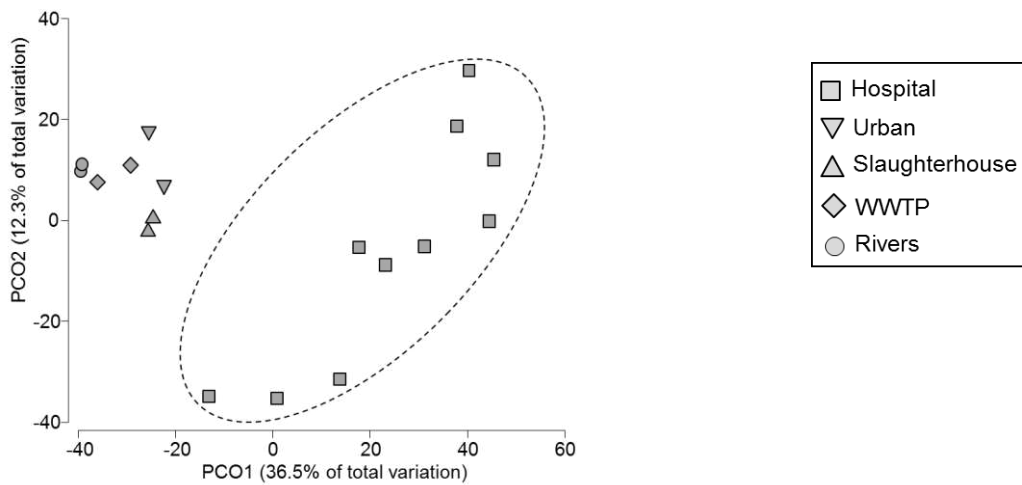


Figure 5: Principal Component Analysis (PCA) of the GCs distribution in effluents (M2 mapping).

Transform: Square root. Ressemblance: S17 Bray-Curtis similarity. WWTP: Wastewater treatment plants. Hospital effluents are grouped with a dotted line circle.

A. PCA for effluents composition of MI 1 GCs. B. PCA for effluents composition of MI 2 GCs. C. PCA for effluents composition of MI 3 GCs

Table 1: Number of detected GCs in samples according to the MI class and effluent origin.

A) M1 mapping			
	MI1	MI2	MI3
<i>Average number of mapped GC</i>	136	29	70
Hospital	127	27	55
Urban	186	34	104
Slaughterhouse	100	25	78
WWTP	147	40	93
Rivers	159	<i>n.d</i>	82
<i>Frequent GC (>=1% WNR)</i>	11	5	7
<i>Rare GC (<1% WNR)</i>	125	24	63
<i>Average %WNR TOP10 GC (>=1% WNR)</i>	91%	99%	95%
B) M2 mapping			
	MI1	MI2	MI3
<i>Average number of mapped GC</i>	209	39	202
Hospital	185	35	116
Urban	324	47	363
Slaughterhouse	140	35	257
WWTP	227	60	333
Rivers	265	<i>n.d</i>	290
<i>Frequent GC (>=1% WNR)</i>	11	5	8
<i>Rare GC (<1% WNR)</i>	197	35	194
<i>Average %WNR TOP10 GC (>=1% WNR)</i>	88%	99%	92%

Table 2: Description of the putative antibiotic resistance proteins encoded by the 27 novel MI GCs identified in this studied.

Percentage of identity is calculated with the closest MI-encoded antibiotic resistance protein within the initial dataset of 426 MI GCs.

GC name	Encoded peptide size (aa)	Conserved domain	% identity
<i>Resistance to β-lactams (6)</i>			
GCLIM-AR2	267	COG2602	67% OXA-129 (WP_032492122)
GCLIM-AR5	268	COG2602	64% OXA-20 (WP_000586782)
GCLIM-AR11	258	COG2602	64% OXA-198 (WP_063861498)
GCLIM-AR20	166; 315	COG2333	
GCLIM-AR24	266	COG2602	63% OXA-129 (WP_032492122)
GCLIM-AR25	278	COG2602	64% OXA-21 (WP_014386432)
<i>Resistance to quaternary ammonium (6)</i>			
GCLIM-AR4	105	pfam00893	88% SMR-1 (WP_063854743)
GCLIM-AR6	105	pfam00893	76% SMR-1 (WP_063854743)
GCLIM-AR12	110	pfam00893	90% QacH (WP_070342358)
GCLIM-AR13	105	pfam00893	70% SMR-1 (WP_063854743)
GCLIM-AR19	110	pfam00893	79% QacG (ACN22635)
GCLIM-AR23	104	pfam00893	83% SMR-1 (WP_063854743)
<i>Resistance to bleomycin (3)</i>			
GCLIM-AR3	123	cd08349	None
GCLIM-AR10	122	pfam00903	None
GCLIM-AR17	73	pfam00903	None
GCLIM-AR22	144; 84	pfam00903	None
<i>Resistance to aminoglycosides (4)</i>			
GCLIM-AR9	163	pfam13523	88% (AAC(6')-32 (WP_032491968)
GCLIM-AR18	267	PRK13746	None
GCLIM-AR21	177; 132	None; cd05403	None
GCLIM-AR26	146	pfam00585	None
<i>Resistance to rifampicin (2)</i>			
GCLIM-AR8	143	pfam12120	53% ARR-8 (WP_235768292)
GCLIM-AR14	149	pfam12120	82% ARR-6 (WP_063857694)
<i>Resistance to quinolones (2)</i>			
GCLIM-AR16	162	pfam13599	None

GCLIM-AR27	128	pfam00805	None
<i>Resistance to chloramphenicol (I)</i>			
GCLIM-AR1	201	cd03349	None
<i>Resistance to trimetoprim (I)</i>			
GCLIM-AR7	78	pfam06442	87% DFRB3 (WP_010890144)
<i>Resistance to erythromycin (I)</i>			
GCLIM-AR15	424	pfam05139	None

Supporting information

Supplementary Table 1: Features of investigated effluents.

Effluent	Effluent type	Country	
HF1a	Hospital	France	
HF1b		France	
HF2		France	
HS1		Scotland	
HS2		Scotland	
HS3		Scotland	
HG1		Germany	
HG2		Germany	
HN1		The Netherlands	
HL1		Luxembourg	
UF1		Urban	France
UF2			France
SF1	Slaughterhouse	France	
SF2		France	
WF1	Wastewater treatment plant influent	France	
WF2		France	
RF1	River	France	
RF2		France	

Supplementary Table 2: The 426 integron gene cassettes considered in this study

Gene cassettes (number)	Gene cassette	Size (bp)	Accession Number
Resistance to aminoglycosides (62)			
<i>aacA</i> (37)			
	<i>aacA1</i> ⁽¹⁾	1158	M18967
	<i>aacA2</i>	526	X12618
	<i>aacA3</i>	628	M29695
	<i>aacA4</i>	639	U59183
	<i>aacA5</i>	653	L06163
	<i>aacA7</i>	591	U13880
	<i>aacA8</i>	639	AY444814
	<i>aacA16</i>	712	Z54241
	<i>aacA17</i>	712	AF047556
	<i>aacA27</i>	738	AF162771
	<i>aacA28</i>	647	AB104852
	<i>aacA29</i>	512	AF263519
	<i>aacA30</i>	726	AY289608
	<i>aacA31</i>	639	AJ640197
	<i>aacA32</i>	697	EF614235
	<i>aacA34</i>	466	AY553333
	<i>aacA35</i>	700	AJ628983

	<i>aacA37</i>	462	DQ302723
	<i>aacA38</i>	668	EF382672
	<i>aacA39</i>	694	EU886977
	<i>aacA40</i>	700	EU912537
	<i>aacA42</i>	726	GQ337064
	<i>aacA43</i>	683	HQ247816
	<i>aacA44</i>	701	JQ407409
	<i>aacA45</i>	465	JN624388
	<i>aacA46</i>	940	AB709942
	<i>aacA48</i>	574	AB472901
	<i>aacA49</i>	676	KP754010
	<i>aacA50</i>	636	MK543944
	<i>aacA51</i>	653	KF525275
	<i>aacA52</i>	628	KF525276
	<i>aacA54</i>	742	KJ138219
	<i>aacA56</i>	725	KM201605
	<i>aacA59</i>	700	NG_052221
	<i>aacA61</i>	626	NG_052423
	<i>aacA64</i>	700	CP045552
	<i>aacA</i> ⁽²⁾	528	FJ663013
<i>aacC</i> (7)			
	<i>aacC1</i>	577	AF207065
	<i>aacC2</i>	577	GU390401
	<i>aacC3</i>	590	AJ511268
	<i>aacC5</i>	564	AB114632
	<i>aacC6</i>	577	MF564290
	<i>aacC11</i>	575	AJ877225
	<i>aacC13</i>	561	LLUN01000040
<i>aadA</i> (15)			
	<i>aadA1</i>	856	X12870
	<i>aadA2</i>	856	X68227
	<i>aadA4</i>	894	Z50802
	<i>aadA5</i>	895	AF170088
	<i>aadA6</i>	863	DQ315788
	<i>aadA7</i>	862	AF224733
	<i>aadA9</i>	901	AJ420072
	<i>aadA10</i>	822	U37105
	<i>aadA11</i>	856	AY758206
	<i>aadA13</i>	855	AY713504
	<i>aadA16</i>	863	EU678897
	<i>aadA24</i>	856	DQ677333
	<i>aadA28</i>	856	KF525279
	<i>aadA29</i>	856	CP011593
	<i>aadA34</i>	856	KX198712
<i>aadB</i> (1)			
	<i>aadB</i>	591	L06418
<i>aphA</i> (2)			
	<i>aphA15</i>	912	Y18050

	<i>aphA16</i>	934	CP011593
Resistance to β -lactams (41)			
<i>blaBEL</i> (1)			
	<i>blaBEL-1</i>	774	DQ089809
<i>blaBIM</i> (1)			
	<i>blaBIM-1</i>	883	CP016446
<i>blaCARB</i> (2)			
	<i>blaCARB-1</i>	1044	AF313471
	<i>blaCARB-4</i>	1058	FJ785525
<i>blaDIM</i> (1)			
	<i>blaDIM-1</i>	777	GU323019
<i>blaGES</i> (1)			
	<i>blaGES-1</i>	1020	AF156486
<i>blaGIM</i> (1)			
	<i>blaGIM-1</i>	776	AJ620678
<i>blaIMP</i> (14)			
	<i>blaIMP-1</i>	880	AB469046
	<i>blaIMP-2</i>	831	AJ243491
	<i>blaIMP-4</i>	886	AF445082
	<i>blaIMP-5</i>	886	AF290912
	<i>blaIMP-9</i>	886	KC543497
	<i>blaIMP-11</i>	885	AB074436
	<i>blaIMP-12</i>	884	AJ420864
	<i>blaIMP-13</i>	886	AJ550807
	<i>blaIMP-14</i>	886	AY553332
	<i>blaIMP-15</i>	894	AY553333
	<i>blaIMP-16</i>	886	AJ584652
	<i>blaIMP-18</i>	888	AY780674
	<i>blaIMP-22</i>	886	DQ361087
	<i>blaIMP-31</i>	868	JQ432564
<i>blaOXA</i> (12)			
	<i>blaOXA-1</i>	1004	AF255921
	<i>blaOXA-2</i>	876	X07260
	<i>blaOXA-5</i>	915	AF347074
	<i>blaOXA-9</i>	957	AF034958
	<i>blaOXA-10</i>	920	U37105
	<i>blaOXA-20</i>	953	AF024602
	<i>blaOXA-21</i>	876	Y10693
	<i>blaOXA-46</i>	862	JX131372
	<i>blaOXA-53</i>	876	AY289608
	<i>blaOXA-118</i>	861	AF371964
	<i>blaOXA-129</i>	917	AM932669
	<i>blaOXA-198</i>	851	HQ634775
<i>blaPBL</i> (1)			
	<i>blaPBL-1</i>	1246	KY171972
<i>blaSIM</i> (1)			
	<i>blaSIM-1</i>	860	AY887066
<i>blaTMB</i> (1)			

	<i>bla</i> TMB-1	774	FR771847
<i>bla</i>VEB (1)			
	<i>bla</i> VEB-1	1070	AF010416
<i>bla</i>VIM (4)			
	<i>bla</i> VIM-1	914	Y18050
	<i>bla</i> VIM-2	909	AF191564
	<i>bla</i> VIM-7	916	AJ536835
	<i>bla</i> VIM-13	932	EF577407
Resistance to trimetoprim (28)			
<i>dfr</i>A (19)			
	<i>dfr</i> A1	577	X00926
	<i>dfr</i> A5	568	X12868
	<i>dfr</i> A6	607	Z86002
	<i>dfr</i> A7	617	X58425
	<i>dfr</i> A12	584	Z21672
	<i>dfr</i> A14	567	Z50804
	<i>dfr</i> A15	586	Z83311
	<i>dfr</i> A16	588	AF077008
	<i>dfr</i> A17	616	AF169041
	<i>dfr</i> A21	584	AY552589
	<i>dfr</i> A22	584	AJ628423
	<i>dfr</i> A25	571	DQ267940
	<i>dfr</i> A27	562	EU675686
	<i>dfr</i> A29	616	AM237806
	<i>dfr</i> A30	568	AM997279
	<i>dfr</i> A31	607	AB200915
	<i>dfr</i> A32	616	GU067642
	<i>dfr</i> A34	569	KY623658
	<i>dfr</i> A35	583	MG649401
<i>dfr</i>B (9)			
	<i>dfr</i> B1	485	DQ104737
	<i>dfr</i> B2	384	AY139592
	<i>dfr</i> B3	408	FM877478
	<i>dfr</i> B4	408	AJ429132
	<i>dfr</i> B5	411	AY943084
	<i>dfr</i> B6	410	DQ274503
	<i>dfr</i> B7	477	DQ993182
	<i>dfr</i> B8	411	GU295656
	<i>dfr</i> B9	524	KC675185
Resistance to fosfomycin (11)			
<i>fos</i> (11)			
	<i>fos</i> C2	494	CP071152
	<i>fos</i> E	462	AY065966
	<i>fos</i> F	511	AY294333
	<i>fos</i> G	497	DQ11222
	<i>fos</i> H	467	DQ393784
	<i>fos</i> I	462	CP003505
	<i>fos</i> K	493	AB917040

	<i>fosL</i>	501	KT070138
	<i>fosM</i>	561	MK047609
	<i>fosN</i>	493	BCBD01000280
	<i>fosO</i>	501	LC276939
Resistance to quaternary ammonium compounds (9)			
<i>qac</i> (7)			
	<i>qacE</i>	587	X72585
	<i>qacF</i>	510	AF034958
	<i>qacG</i>	532	AF327731
	<i>qacH</i>	511	AF205943
	<i>qacK</i>	564	EF522838
	<i>qacL</i>	428	KF525338
	<i>qacM</i>	510	LT882698
<i>smr</i> (2)			
	<i>smr1</i>	406	AF406792
	<i>smr2</i>	405	AJ784256
Resistance to chloramphenicol (8)			
<i>catB</i> (6)			
	<i>catB2</i>	739	AJ487034
	<i>catB3</i>	715	U13880
	<i>catB5</i>	713	X82455
	<i>catB6</i>	730	AJ223604
	<i>catB10</i>	715	AJ878850
	<i>catB11</i>	756	DQ831140
<i>cmlA</i> (2)			
	<i>cmlA1</i>	1549	U12338
	<i>cmlA2</i>	1548	AF034958
Resistance to rifampicin (5)			
<i>arr</i> (5)			
	<i>arr2</i>	603	AF078527
	<i>arr5</i>	555	EF660563
	<i>arr6</i>	556	FM897214
	<i>arr7</i>	608	FN397623
	<i>arr8b</i>	628	LR812721
Resistance to erythromycin (3)			
<i>ereA</i> (3)			
	<i>ereA1</i>	1369	AY183453
	<i>ereA2</i>	1376	AF099140
	<i>ereA3</i>	1464	FN396877
Resistance to streptothricin (1)			
<i>sat</i> (1)			
	<i>sat2</i>	584	X15995
Resistance to quinolones (3)			
<i>qnrVC</i> (3)			
	<i>qnrVC1</i>	1012	EU436855
	<i>qnrVC2</i>	1016	AB200915
	<i>qnrVC6</i>	1012	GU944730

Resistance to lincosamids (2)			
<i>lnu</i> (2)			
	<i>lnuF1</i>	935	AJ561197
	<i>lnuF2</i>	937	DQ836009
Resistance to sulfamids (1)			
<i>sul</i> (1)			
	<i>sul4</i>	1850	MG649394
Unknown function (252)			
<i>gcu</i> (245)			
	<i>gcu1</i>	395	AF318077
	<i>gcu2</i>	340	AY139592
	<i>gcu3</i>	403	AY139600
	<i>gcu4</i>	271	AJ536835
	<i>gcu5</i>	426	AY220520
	<i>gcu6</i>	665	AB113580
	<i>gcu7</i>	665	AJ634050
	<i>gcu8</i>	444	AJ704863
	<i>gcu9</i>	641	AJ784256
	<i>gcu10</i> ³	650	AJ786649
	<i>gcu11</i>	571	AB195796
	<i>gcu12</i>	530	AJ871915
	<i>gcu13</i>	312	AY907717
	<i>gcu14</i>	265	DQ236170
	<i>gcu15</i>	405	DQ278188
	<i>gcu16</i>	437	DQ278190
	<i>gcu17</i>	511	DQ361087
	<i>gcu18</i>	529	AM237806
	<i>gcu19</i>	517	AM237806
	<i>gcu20</i>	492	DQ520941
	<i>gcu21</i>	464	DQ522237
	<i>gcu22</i>	1465	CP047349
	<i>gcu23</i>	1415	DQ533990
	<i>gcu24</i>	1248	DQ533990
	<i>gcu25</i>	515	DQ533990
	<i>gcu26</i>	598	AM711129
	<i>gcu27</i>	1794	EF614235
	<i>gcu28</i>	478	EU165039
	<i>gcu29</i>	245	EU284133
	<i>gcu30</i>	438	DQ914960
	<i>gcu31</i>	363	EU434611
	<i>gcu32</i>	517	EU487199
	<i>gcu33</i>	630	EU591509
	<i>gcu34</i>	400	FM179467
	<i>gcu35</i>	316	KJ510410
	<i>gcu36</i>	279	EU886977
	<i>gcu37</i>	424	JN157818
	<i>gcu38</i>	323	CP018839
	<i>gcu39</i>	581	JQ004406
	<i>gcu40</i>	352	FM877481

	<i>gcu41</i>	730	FJ663009
	<i>gcu42</i>	1159	DQ372711
	<i>gcu43</i>	725	DQ372711
	<i>gcu44</i>	477	EU327987
	<i>gcu45</i>	694	EF467661
	<i>gcu46</i>	739	EF469602
	<i>gcu47</i>	558	EF467661
	<i>gcu48</i>	796	EF467661
	<i>gcu49</i>	2566;1127	HQ170513
	<i>gcu50</i>	339	CP003684
	<i>gcu51</i>	278	JQ432564
	<i>gcu52</i>	1462	AB616660
	<i>gcu53</i>	2504	EU327987
	<i>gcu54</i>	856	EU327987
	<i>gcu55</i>	344	HQ386841
	<i>gcu56</i>	335	KC540631
	<i>gcu57</i>	371	KC540631
	<i>gcu58</i>	361	KC540631
	<i>gcu59</i>	1699	CP018839
	<i>gcu60</i>	339	JN596279
	<i>gcu62</i>	403	FJ817422
	<i>gcu63</i>	460	CP018839
	<i>gcu64</i>	353	FJ820162
	<i>gcu65</i>	423	JX867128
	<i>gcu66</i>	640	KF525302
	<i>gcu67</i>	312	KF525303
	<i>gcu68</i>	1447	CP018839
	<i>gcu69</i>	324	KF525305
	<i>gcu70</i>	337	KF525306
	<i>gcu71</i>	616	FJ172375
	<i>gcu72</i>	380	KF525308
	<i>gcu73</i>	382	KF525309
	<i>gcu74</i>	403	KF525310
	<i>gcu75</i>	413	KF525311
	<i>gcu76</i>	392	FJ172398
	<i>gcu77</i>	462	KF525312
	<i>gcu78</i>	520	KF525314
	<i>gcu79</i>	552	KF525315
	<i>gcu80</i>	573	KF525316
	<i>gcu81</i>	292	LC169585
	<i>gcu82</i>	592	KF525317
	<i>gcu83</i>	630	KF525318
	<i>gcu84</i>	368	KF525320
	<i>gcu85</i>	433	EU327987
	<i>gcu86</i>	423	KF525321
	<i>gcu87</i>	491	KX218442
	<i>gcu88</i>	320	KJ522747
	<i>gcu89</i>	558	KF525326

	<i>gcu90</i>	249	EU327989
	<i>gcu91</i>	336	FJ172372
	<i>gcu92</i>	555	KF525326
	<i>gcu93</i>	284	KF525327
	<i>gcu94</i>	925	KF525329
	<i>gcu95</i>	366	KF525330
	<i>gcu96</i>	472	KF525332
	<i>gcu97</i>	266	KF525333
	<i>gcu98</i>	606	KF525334
	<i>gcu100</i>	530	KF525335
	<i>gcu101</i>	442	KF525336
	<i>gcu102</i>	722	KF525337
	<i>gcu103</i>	2705	DQ520941
	<i>gcu104</i>	569	FJ445404
	<i>gcu106</i>	226	AB901044
	<i>gcu107</i>	373	EU780012
	<i>gcu108</i>	436	FJ820138
	<i>gcu109</i>	472	GQ281702
	<i>gcu110</i>	297	KJ541068
	<i>gcu111</i>	630	CP009874
	<i>gcu112</i>	191	ATNK01000052
	<i>gcu113</i>	625	KF914297
	<i>gcu114</i>	402	GQ281704
	<i>gcu115</i>	801	MH427142
	<i>gcu116</i> ⁴	1099	AP024115
	<i>gcu117</i>	1096	CP012365
	<i>gcu118</i>	1191	CP012365
	<i>gcu119</i>	790	CP012365
	<i>gcu120</i>	937	CP012365
	<i>gcu121</i>	1251	FJ172387
	<i>gcu122</i>	411	FJ172376
	<i>gcu123</i>	735	CP012365
	<i>gcu124</i>	496	CP012365
	<i>gcu125</i>	525	CP012365
	<i>gcu126</i>	614	CP012365
	<i>gcu127</i>	594	CP012365
	<i>gcu128</i>	2950	CP012365
	<i>gcu129</i>	585	CP012363
	<i>gcu130</i>	664	AY740681
	<i>gcu131</i>	390	CP012363
	<i>gcu132</i>	492	HQ423158
	<i>gcu133</i>	926	CP012363
	<i>gcu134</i>	658	CP012363
	<i>gcu135</i>	1631	CP012363
	<i>gcu136</i>	858	CP012363
	<i>gcu137</i>	1090	CP012363
	<i>gcu138</i>	2003	CP012359
	<i>gcu139</i>	717	CP012359

	<i>gcu140</i>	395	CP012359
	<i>gcu141</i>	1328	CP012359
	<i>gcu142</i>	1592	CP012359
	<i>gcu143</i>	1030	CP012359
	<i>gcu144</i>	483	FJ820121
	<i>gcu145</i>	526	FJ172392
	<i>gcu146</i>	970	CP012360
	<i>gcu147</i>	1082	CP012360
	<i>gcu148</i>	776	CP012360
	<i>gcu149</i>	604	EU327988
	<i>gcu150</i>	644	CP012364
	<i>gcu151</i>	699	CP012364
	<i>gcu152</i>	2581	AP018145
	<i>gcu152</i>	2581	AP018145
	<i>gcu153</i>	570	FJ172372
	<i>gcu154</i>	1096	CP012364
	<i>gcu155</i>	554	CP012364
	<i>gcu156</i>	341	CP012358
	<i>gcu157</i>	1624	CP012358
	<i>gcu158</i>	995	CP012363
	<i>gcu159</i>	1061	CP012363
	<i>gcu160</i>	310	FJ445404
	<i>gcu161</i>	284	KU254577
	<i>gcu162</i>	314	KT345947
	<i>gcu163</i>	452	KU130294
	<i>gcu164</i>	649	KR868993
	<i>gcu165</i>	530	KY883660
	<i>gcu166</i>	338	CP021775
	<i>gcu167</i>	1283	GU944731
	<i>gcu167-2</i>	1284	MBPN01000207
	<i>gcu168</i>	552	KU547048
	<i>gcu169⁵</i>	3080	EU327987
	<i>gcu170</i>	496	CP026122
	<i>gcu172</i>	441	FJ627181
	<i>gcu173</i>	582	CP017073
	<i>gcu174</i>	611	FJ172372
	<i>gcu175</i>	611	FJ172384
	<i>gcu176</i>	387	CP031512
	<i>gcu177</i>	806	CP021775
	<i>gcu182</i>	723	MH071811
	<i>gcu184</i>	858	MH882484
	<i>gcu185</i>	782	CP031449
	<i>gcu186</i>	703	EU327991
	<i>gcu189</i>	597	JN588534
	<i>gcu236</i>	843	CP068239
	<i>gcu253</i>	870	EU327987
	<i>gcu262</i>	857	FJ172395
	<i>gcu-WGS1</i>	810	LSUZ01000004

	<i>gcu-WGS2</i>	388	JGWG01000287
	<i>gcu-WGS3</i>	616	JUSV01001291
	<i>gcu-WGS4</i>	545	AMXF01000006
	<i>gcu-WGS5</i>	490	AMXA01000003
	<i>gcu-WGS6</i>	877	AMXA01000003
	<i>gcu-WGS7</i>	521	AMXA01000003
	<i>gcu-WGS9</i>	313	LJFD02000062
	<i>gcu-WGS10</i>	589	AICM01000004
	<i>gcu-WGS11</i>	664	LFTS01000104
	<i>gcu-WGS13</i>	1543	LLPT01000100
	<i>gcu-WGS14</i>	419	JUDR01000009
	<i>gcu-WGS15</i>	577	AQFO01000042
	<i>gcu-WGS16</i>	457	AQFO01000042
	<i>gcu-WGS18</i>	330	BCBA01000063
	<i>gcu-WGS21</i>	756	NZ_MCIC010000 05
	<i>gcuA</i>	501	U12441
	<i>gcuC</i>	512	AF455254
	<i>gcuD</i>	320	AY046276
	<i>gcuD2</i>	319	GU129909
	<i>gcuD5</i>	319	LC276939
	<i>gcuD-WGS1</i>	321	LPCS01000005
	<i>gcuE</i>	262	U12338
	<i>gcuE2</i>	262	DQ018383
	<i>gcuE3</i>	262	AY139595
	<i>gcuE4</i>	263	AY139597
	<i>gcuE5</i>	259	AJ564903
	<i>gcuE6</i>	283	AY758206
	<i>gcuE7</i>	319	DQ522236
	<i>gcuE8</i>	263	EU434616
	<i>gcuE9</i>	262	FJ172377
	<i>gcuE10</i>	262	FJ172382
	<i>gcuE11</i>	266	FJ820127
	<i>gcuE12</i>	319	FJ820136
	<i>gcuE13</i>	319	GQ466184
	<i>gcuE14</i>	319	GU129909
	<i>gcuE15</i>	262	JF822499
	<i>gcuE16</i>	319	FJ820136
	<i>gcuE17</i>	283	JX982232
	<i>gcuE18</i>	262	KC170993
	<i>gcuE19</i>	262	KC170993
	<i>gcuE20</i>	262	KC170993
	<i>gcuE21</i>	259	AB777500
	<i>gcuE22</i>	319	KC960556
	<i>gcuE23</i>	319	KF525304
	<i>gcuE24</i>	318	KF525323
	<i>gcuE25</i>	268	KF525331

	<i>gcuE26</i>	316	NZ_AYSK01000201
	<i>gcuE27</i>	266	KJ588780
	<i>gcuE28</i>	262	KT368820
	<i>gcuE29</i>	263	KY913898
	<i>gcuE-WGS1</i>	264	CYTY01000085
	<i>gcuE-WGS2</i>	262	LLQW01000144
	<i>gcuE-WGS3</i>	262	LLQT01000133
	<i>gcuE-WGS4</i>	262	AXPJ01000006
	<i>gcuF</i>	320	Z21672
	<i>gcuF1</i>	319	FJ207466
	<i>gcuH</i>	452	AF047479
	<i>gcuI</i>	598	AF047479
	<i>gcuJ</i>	376	AF047479
	<i>gcuN</i>	689	AJ223604
	<i>gcuP</i>	538	KJ546181
	<i>gcuQ</i>	339	KJ546181
	Others (7)		
	<i>akl</i>	645	CP009409
	<i>cupin-C2BC</i>	542	FJ172386
	<i>dcyA</i>	1191	HQ170512
	<i>estX</i>	952	AB121039
	<i>lsp</i>	611	EU780012
	<i>msrAB</i>	1874	FJ711439
	<i>psp</i>	673	AB121039

Supplementary Table 3: Average number of raw reads mapping control sequences

	Sequence size (bp)	RI1	RI2	RI3
Empty-MI1	81	2796	0	0
Empty-MI2	81	0	<1	0
Empty-MI3	81	0	0	0
<i>qacEΔ1-sul1</i>	494	516'547	4	<1
<i>attI1-sul1</i>	86	1814	0	5

Supplementary Table 4: Number of unmapped reads contigs at each round and stage of this study workflow.

Round	Workflow stage	RI1	RI2	RI3	TOTAL
<i>Round 1</i>					
	All >500bp long contigs	17190	15551	21251	53992
	<i>attC</i> -positive contigs	1655 (9.6%)	296 (1.9%)	2482 (11.8%)	4433 (8.2%)
	<i>attC</i> -positive Blastn negative contigs	349 (2%)	74 (0.5%)	1625 (7.6%)	2048 (3.8%)
	Novel gene cassettes	--	--	--	542
<i>Round 2</i>					
	All >500bp long contigs	15763	15544	20290	51597
	<i>attC</i> -positive contigs	937 (5.9%)	278 (1.8%)	829 (4.1%)	2044 (4%)
	<i>attC</i> -positive Blastn negative contigs	85 (0.5%)	11 (0.1%)	327 (1.6%)	423 (0.8%)
	Novel gene cassettes	--	--	--	28
<i>Round 3</i>					
	All >500bp long contigs	18972	15887	20799	55568
	<i>attC</i> -positive contigs	2847 (15%)	310 (2%)	1148 (5.5%)	4305 (7.7%)
	<i>attC</i> -positive Blastn negative contigs	95 (0.5%)	3 (0.02%)	422 (2%)	520 (0.9%)
	Novel gene cassettes	--	--	--	13
<i>Round 4</i>					
	All >500bp long contigs	15305	19628	16699	51632
	<i>attC</i> -positive contigs	2146 (14%)	331 (1.7%)	285 (0.2%)	2762 (5.3%)
	<i>attC</i> -positive Blastn negative contigs	90 (0.6%)	34 (0.2%)	26 (0.3%)	150 (0.3%)
	Novel gene cassettes	--	--	--	10

Supplementary Table 5: The 593 integron gene cassettes discovered in this study.

Gene cassettes type (number)	Gene cassette	Size (bp)
Putative <u>A</u> ntibiotic <u>R</u> esistance (27)		
	GCLIM-AR1*	718
	GCLIM-AR2*	926
	GCLIM-AR3	449
	GCLIM-AR4*	451
	GCLIM-AR5*	887
	GCLIM-AR6*	462
	GCLIM-AR7*	437
	GCLIM-AR8*	560
	GCLIM-AR9	695
	GCLIM-AR10	444
	GCLIM-AR11*	864
	GCLIM-AR12*	559
	GCLIM-AR13	478
	GCLIM-AR14*	552
	GCLIM-AR15*	1458

	GCLIM-AR16*	598
	GCLIM-AR17*	493
	GCLIM-AR18*	877
	GCLIM-AR19*	542
	<u>GCLIM-AR20*</u>	1591
	<u>GCLIM-AR21*</u>	1232
	<u>GCLIM-AR22*</u>	771
	GCLIM-AR23*	397
	GCLIM-AR24*	921
	GCLIM-AR25*	862
	GCLIM-AR26*	565
	<u>GCLIM-AR27*</u>	642
<u>Conserved Domain (114)</u>		
	<u>GCLIM-C1*</u>	772
	<u>GCLIM-C2*</u>	1015
	GCLIM-C3*	446
	GCLIM-C4*	732
	GCLIM-C5*	487
	GCLIM-C6*	600
	GCLIM-C7*	519
	GCLIM-C8*	818
	GCLIM-C9	580
	GCLIM-C10*	318
	<u>GCLIM-C11*</u>	686
	GCLIM-C12	543
	GCLIM-C13*	632
	GCLIM-C14*	603
	GCLIM-C15*	1763
	GCLIM-C16*	444
	GCLIM-C17*	659
	GCLIM-C18*	858
	GCLIM-C19	550
	GCLIM-C21*	466
	GCLIM-C22	529
	<u>GCLIM-C23*</u>	863
	<u>GCLIM-C24*</u>	1355
	GCLIM-C25*	989
	GCLIM-C26	465
	GCLIM-C27*	530
	GCLIM-C28*	560
	GCLIM-C29*	1629
	GCLIM-C30*	541
	GCLIM-C31*	381
	GCLIM-C32*	598
	GCLIM-C33*	511
	GCLIM-C34*	651
	GCLIM-C35*	1355
	GCLIM-C36*	750

	GCLIM-C37*	699
	GCLIM-C38*	1353
	GCLIM-C39*	1305
	GCLIM-C40*	1772
	GCLIM-C41	696
	<u>GCLIM-C42*</u>	1228
	GCLIM-C43*	693
	GCLIM-C44*	698
	GCLIM-C45*	901
	GCLIM-C46*	757
	<i>GCLIM-C47*</i>	2306
	<u>GCLIM-C48*</u>	933
	GCLIM-C49*	372
	GCLIM-C50*	1199
	GCLIM-C51*	753
	GCLIM-C52*	1037
	GCLIM-C53	353
	GCLIM-C54*	651
	GCLIM-C55	873
	GCLIM-C56*	504
	GCLIM-C57	477
	GCLIM-C58	740
	GCLIM-C59*	406
	GCLIM-C60*	962
	GCLIM-C61*	672
	GCLIM-C62	1143
	GCLIM-C63*	881
	GCLIM-C64*	2063
	GCLIM-C65*	1319
	GCLIM-C66*	553
	GCLIM-C67*	768
	GCLIM-C68*	647
	GCLIM-C69*	726
	GCLIM-C70*	762
	GCLIM-C71	788
	GCLIM-C72*	1518
	GCLIM-C73*	429
	GCLIM-C74*	413
	GCLIM-C75*	501
	GCLIM-C76*	945
	GCLIM-C77*	663
	GCLIM-C78*	786
	GCLIM-C79*	1246
	GCLIM-C80*	925
	GCLIM-C81	522
	GCLIM-C82*	404
	GCLIM-C83*	869
	GCLIM-C84*	582

	GCLIM-C85	682
	GCLIM-C86*	649
	GCLIM-C87*	844
	GCLIM-C88*	996
	GCLIM-C89	624
	GCLIM-C90*	1010
	<u>GCLIM-C91</u>	864
	GCLIM-C92*	537
	GCLIM-C93*	422
	GCLIM-C94*	842
	GCLIM-C95*	435
	GCLIM-C96*	456
	GCLIM-C97*	294
	GCLIM-C98*	611
	GCLIM-C99*	561
	<u>GCLIM-C100*</u>	817
	GCLIM-C101*	453
	<u>GCLIM-C102*</u>	820
	GCLIM-C103*	774
	GCLIM-C104*	731
	GCLIM-C105*	392
	GCLIM-C106*	805
	GCLIM-C107*	736
	<u>GCLIM-C108*</u>	1622
	GCLIM-C109*	529
	<u>GCLIM-C110*</u>	595
	GCLIM-C111*	487
	GCLIM-C112*	460
	GCLIM-C113*	434
	GCLIM-C114	838
	GCLIM-C115*	800
Conserved <u>Domain of Unknown Function (38)</u>	GCLIM-D1*	461
	GCLIM-D2*	607
	GCLIM-D3*	318
	GCLIM-D4	436
	GCLIM-D5*	439
	GCLIM-D6	431
	GCLIM-D7*	738
	GCLIM-D8*	426
	GCLIM-D9*	469
	GCLIM-D10*	577
	GCLIM-D11*	577
	GCLIM-D12*	1517
	<u>GCLIM-D13*</u>	640
	GCLIM-D14*	623
	GCLIM-D15*	433
	GCLIM-D16*	647
	GCLIM-D17*	661

	GCLIM-D18*	785
	GCLIM-D19*	561
	GCLIM-D20*	464
	GCLIM-D21*	648
	GCLIM-D22*	643
	GCLIM-D23*	569
	GCLIM-D24*	1140
	GCLIM-D25*	755
	GCLIM-D26*	370
	GCLIM-D27*	731
	GCLIM-D28*	774
	GCLIM-D29*	661
	GCLIM-D30*	273
	GCLIM-D31	413
	GCLIM-D32*	502
	GCLIM-D33	673
	GCLIM-D34*	581
	GCLIM-D35*	280
	GCLIM-D36*	1174
	GCLIM-D37*	787
	GCLIM-D38*	932
No ORF (10)		
	GCLIM-N1*	485
	GCLIM-N2*	365
	GCLIM-N3*	244
	GCLIM-N4	219
	GCLIM-N5*	380
	GCLIM-N6	308
	GCLIM-N7*	696
	GCLIM-N8	708
	GCLIM-N9*	131
	GCLIM-N10	519
Unknown function (404)		
	GCLIM-U1*	394
	GCLIM-U2	286
	GCLIM-U3	806
	GCLIM-U4*	578
	GCLIM-U5*	486
	GCLIM-U6*	892
	GCLIM-U7*	310
	GCLIM-U8*	432
	GCLIM-U9*	337
	GCLIM-U10*	383
	GCLIM-U11*	373
	GCLIM-U12*	331
	GCLIM-U13*	391
	GCLIM-U14*	610
	GCLIM-U15*	423

	GCLIM-U16*	541
	GCLIM-U17*	497
	GCLIM-U18*	414
	GCLIM-U19*	368
	GCLIM-U20*	419
	GCLIM-U21*	364
	GCLIM-U22*	441
	GCLIM-U23*	417
	GCLIM-U24*	489
	GCLIM-U25*	563
	GCLIM-U26	438
	GCLIM-U27*	406
	GCLIM-U28*	475
	GCLIM-U29*	437
	GCLIM-U30*	386
	GCLIM-U31*	655
	GCLIM-U32*	660
	GCLIM-U33*	408
	GCLIM-U34*	596
	GCLIM-U35*	543
	GCLIM-U36*	358
	GCLIM-U37*	487
	GCLIM-U38*	724
	GCLIM-U39	312
	GCLIM-U40	456
	GCLIM-U41*	378
	GCLIM-U42*	411
	GCLIM-U43*	881
	GCLIM-U44*	265
	GCLIM-U45*	474
	GCLIM-U46*	271
	GCLIM-U47	594
	GCLIM-U48	334
	GCLIM-U49*	265
	GCLIM-U50*	549
	GCLIM-U51*	430
	GCLIM-U52	304
	GCLIM-U53*	708
	GCLIM-U54*	458
	GCLIM-U55*	640
	GCLIM-U56*	493
	GCLIM-U57	600
	GCLIM-U58	385
	GCLIM-U59	427
	GCLIM-U60	471
	GCLIM-U61	376
	GCLIM-U62	337
	GCLIM-U63	632

	GCLIM-U64	460
	GCLIM-U65	913
	GCLIM-U66*	643
	GCLIM-U67	871
	<u>GCLIM-U68*</u>	839
	GCLIM-U69*	500
	GCLIM-U70	615
	GCLIM-U71*	390
	GCLIM-U72	474
	<u>GCLIM-U73</u>	1119
	GCLIM-U74	313
	GCLIM-U75*	596
	GCLIM-U76*	326
	GCLIM-U77*	334
	GCLIM-U78*	426
	GCLIM-U79*	406
	GCLIM-U80	435
	GCLIM-U81*	466
	GCLIM-U82*	414
	GCLIM-U83	490
	GCLIM-U84*	280
	GCLIM-U85*	570
	GCLIM-U86*	652
	GCLIM-U87*	538
	GCLIM-U88*	646
	GCLIM-U89*	387
	GCLIM-U90*	478
	GCLIM-U91*	385
	GCLIM-U92*	692
	GCLIM-U93*	486
	GCLIM-U94*	253
	GCLIM-U95*	665
	GCLIM-U96*	379
	GCLIM-U97*	971
	GCLIM-U98*	676
	<u>GCLIM-U99*</u>	439
	GCLIM-U100*	355
	GCLIM-U101*	816
	GCLIM-U102*	278
	GCLIM-U103*	302
	GCLIM-U104*	368
	GCLIM-U105	386
	GCLIM-U106*	510
	GCLIM-U107*	385
	GCLIM-U108*	299
	GCLIM-U109*	410
	GCLIM-U110*	254
	GCLIM-U111*	552

	GCLIM-U112	378
	GCLIM-U113*	1335
	GCLIM-U114*	589
	GCLIM-U115*	428
	GCLIM-U116*	436
	GCLIM-U117*	825
	GCLIM-U118*	462
	GCLIM-U119*	381
	GCLIM-U120	431
	GCLIM-U121*	538
	GCLIM-U122*	567
	GCLIM-U123	570
	GCLIM-U124	644
	GCLIM-U125*	492
	GCLIM-U126	333
	GCLIM-U127*	788
	GCLIM-U128*	577
	GCLIM-U129*	485
	GCLIM-U130*	537
	GCLIM-U131*	762
	GCLIM-U132*	577
	GCLIM-U133*	367
	GCLIM-U134*	615
	GCLIM-U135	555
	GCLIM-U136	405
	GCLIM-U137	585
	GCLIM-U138*	325
	GCLIM-U139*	261
	GCLIM-U140*	321
	GCLIM-U141*	450
	GCLIM-U142*	318
	GCLIM-U143*	549
	GCLIM-U144*	524
	GCLIM-U145*	935
	GCLIM-U146*	489
	GCLIM-U147	463
	GCLIM-U148*	440
	GCLIM-U149	450
	GCLIM-U150*	581
	GCLIM-U151*	377
	GCLIM-U152*	658
	GCLIM-U153*	515
	GCLIM-U154*	493
	GCLIM-U155*	701
	GCLIM-U156*	502
	GCLIM-U157*	677
	GCLIM-U158*	356
	GCLIM-U159*	681

	GCLIM-U160*	711
	GCLIM-U161*	386
	GCLIM-U162*	800
	GCLIM-U163*	1194
	GCLIM-U164	761
	GCLIM-U165*	623
	<u>GCLIM-U166*</u>	830
	GCLIM-U167*	560
	GCLIM-U168*	361
	GCLIM-U169*	477
	GCLIM-U170*	693
	GCLIM-U171	461
	GCLIM-U172*	622
	GCLIM-U173*	429
	GCLIM-U174*	632
	<u>GCLIM-U175*</u>	919
	GCLIM-U176*	496
	GCLIM-U177*	539
	GCLIM-U178*	470
	GCLIM-U179	440
	GCLIM-U180*	324
	<u>GCLIM-U181*</u>	831
	GCLIM-U182*	631
	GCLIM-U183*	468
	GCLIM-U184*	566
	GCLIM-U185	308
	GCLIM-U186*	1275
	GCLIM-U187*	725
	GCLIM-U188*	533
	GCLIM-U189	672
	GCLIM-U190*	501
	GCLIM-U191*	364
	GCLIM-U192*	555
	GCLIM-U193*	659
	GCLIM-U194*	630
	GCLIM-U195*	435
	GCLIM-U196*	376
	GCLIM-U197*	635
	GCLIM-U198	384
	GCLIM-U199*	645
	GCLIM-U200*	555
	GCLIM-U201*	429
	GCLIM-U202*	501
	<u>GCLIM-U203*</u>	1013
	GCLIM-U204*	491
	GCLIM-U205*	535
	GCLIM-U206*	1249
	GCLIM-U207*	419

	GCLIM-U208*	631
	GCLIM-U209*	494
	GCLIM-U210	350
	GCLIM-U211	531
	GCLIM-U212*	724
	GCLIM-U213*	511
	GCLIM-U214*	314
	GCLIM-U215	423
	GCLIM-U216*	461
	<u>GCLIM-U217*</u>	798
	GCLIM-U218	777
	GCLIM-U219*	632
	GCLIM-U220*	308
	GCLIM-U221	468
	<u>GCLIM-U222*</u>	1167
	GCLIM-U223*	919
	GCLIM-U224*	836
	GCLIM-U225*	354
	GCLIM-U226*	496
	GCLIM-U227*	310
	GCLIM-U228*	596
	GCLIM-U229*	692
	GCLIM-U230*	270
	GCLIM-U231*	545
	GCLIM-U232*	534
	GCLIM-U233*	540
	GCLIM-U234*	468
	<u>GCLIM-U235*</u>	1832
	GCLIM-U236*	574
	GCLIM-U237*	602
	GCLIM-U238*	1194
	GCLIM-U239*	349
	GCLIM-U240*	634
	GCLIM-U241*	732
	GCLIM-U242*	531
	GCLIM-U243*	369
	GCLIM-U244*	429
	GCLIM-U245*	527
	GCLIM-U246*	320
	GCLIM-U247*	1016
	GCLIM-U248*	583
	GCLIM-U249*	338
	GCLIM-U250*	473
	GCLIM-U251*	443
	<u>GCLIM-U252*</u>	581
	GCLIM-U253*	458
	GCLIM-U254*	571
	GCLIM-U255*	778

	GCLIM-U256*	329
	GCLIM-U257*	476
	GCLIM-U258	526
	GCLIM-U259*	551
	GCLIM-U260*	441
	GCLIM-U261*	827
	GCLIM-U262	324
	GCLIM-U263	331
	GCLIM-U264*	403
	GCLIM-U265*	349
	GCLIM-U266*	412
	GCLIM-U267*	1014
	GCLIM-U268*	714
	GCLIM-U269*	321
	GCLIM-U270*	640
	GCLIM-U271*	298
	GCLIM-U272*	450
	GCLIM-U273*	404
	GCLIM-U274*	254
	GCLIM-U275*	799
	GCLIM-U276*	813
	GCLIM-U277	347
	GCLIM-U278*	373
	GCLIM-U279*	398
	GCLIM-U280*	285
	GCLIM-U281*	362
	GCLIM-U282*	282
	GCLIM-U283*	834
	GCLIM-U284	389
	GCLIM-U285*	713
	GCLIM-U286*	535
	GCLIM-U287*	655
	GCLIM-U288	596
	GCLIM-U289	507
	GCLIM-U290*	589
	GCLIM-U291*	638
	GCLIM-U292*	318
	GCLIM-U293*	557
	GCLIM-U294*	1104
	GCLIM-U295*	523
	GCLIM-U296*	830
	GCLIM-U297*	702
	GCLIM-U298*	977
	GCLIM-U299	346
	GCLIM-U300*	636
	GCLIM-U301*	968
	GCLIM-U302*	446
	GCLIM-U303*	430

	GCLIM-U304*	313
	GCLIM-U305*	514
	GCLIM-U306*	451
	GCLIM-U307*	363
	GCLIM-U308*	836
	GCLIM-U309	1556
	GCLIM-U310*	789
	GCLIM-U311*	511
	GCLIM-U312	933
	GCLIM-U313*	699
	GCLIM-U314*	612
	GCLIM-U315*	513
	GCLIM-U316*	693
	GCLIM-U317*	447
	GCLIM-U318*	373
	GCLIM-U319*	905
	GCLIM-U320*	553
	GCLIM-U321*	535
	GCLIM-U322*	554
	GCLIM-U323*	531
	GCLIM-U324*	472
	GCLIM-U325*	915
	GCLIM-U326*	581
	GCLIM-U327*	523
	GCLIM-U328*	364
	GCLIM-U329*	458
	GCLIM-U330*	444
	GCLIM-U331*	277
	GCLIM-U332*	272
	GCLIM-U333*	564
	GCLIM-U334*	276
	GCLIM-U335*	307
	GCLIM-U336*	451
	GCLIM-U337	669
	GCLIM-U338*	427
	GCLIM-U339*	386
	GCLIM-U340*	512
	GCLIM-U341*	613
	GCLIM-U342*	535
	GCLIM-U343*	609
	GCLIM-U344*	822
	GCLIM-U345*	377
	GCLIM-U346*	573
	GCLIM-U347*	419
	GCLIM-U348	562
	GCLIM-U349*	405
	GCLIM-U350*	596
	GCLIM-U351*	566

	GCLIM-U352*	389
	GCLIM-U353	648
	GCLIM-U354	340
	GCLIM-U355	456
	GCLIM-U356*	307
	GCLIM-U357	391
	GCLIM-U358*	295
	GCLIM-U359	355
	GCLIM-U360	377
	GCLIM-U361*	450
	GCLIM-U362	228
	GCLIM-U363*	366
	GCLIM-U364*	675
	GCLIM-U365*	498
	GCLIM-U366	340
	GCLIM-U367	435
	GCLIM-U368*	926
	GCLIM-U369*	680
	GCLIM-U370*	1152
	GCLIM-U371	1177
	GCLIM-U372*	613
	GCLIM-U373*	566
	GCLIM-U374*	260
	GCLIM-U375*	588
	GCLIM-U376*	303
	GCLIM-U377*	299
	GCLIM-U378*	562
	GCLIM-U379*	288
	GCLIM-U380*	1000
	GCLIM-U381	466
	GCLIM-U382	364
	GCLIM-U383*	364
	GCLIM-U384	548
	GCLIM-U385*	815
	GCLIM-U386	310
	GCLIM-U387*	1128
	GCLIM-U388	322
	GCLIM-U389*	142
	GCLIM-U390	483
	GCLIM-U391	413
	GCLIM-U392	277
	GCLIM-U393	279
	GCLIM-U394	372
	GCLIM-U395	481
	GCLIM-U396*	368
	GCLIM-U397*	456
	GCLIM-U398*	428
	GCLIM-U399	550

	GCLIM-U400*	458
	GCLIM-U401	583
	GCLIM-U402*	277
	GCLIM-U403	963
	GCLIM-U404*	541

Supplementary Table 6: Classification of the 593 novel GCs into five functional groups.

GCLIM group	Number of gene cassettes (%)	Average size (bp)	Number of encoded peptides	Number of clusters (>30% amino-acids identity)
GCLIM-U	404 (68.1%)	536	420	400
GCLIM-C	114 (19.2%)	773	137	123
GCLIM-D	38 (6.4%)	624	41	36
GCLIM-AR	27 (4.6%)	720	30	19
GCLIM-N	10 (1.7%)	406	0	0
TOTAL	593 (100%)	593	628	593

Supplementary Table 7: Features of the 404 GCLIM-U novel GCs identified in this study that encode peptides with no conserved domain.

GCLIM-U	GC size (bp)	UTR size (bp)	TIR	ORF size (bp)	attC e-value	5'/3'-CS
GCLIM-U1	394	14	AGGAA-7-ATG	104	1.8e-08	YES
GCLIM-U2	286	10	GAG-4-ATG	60	1.8e-06	NO
GCLIM-U3	806	58	None	210	N	NO
GCLIM-U4	578	2	None	164	3.4e-09	YES
GCLIM-U5	486	13	GGAGG-5-ATG	124	7.9e-08	YES
GCLIM-U6	892	22	AGGAG-5-ATG	265	N	YES
GCLIM-U7	475	39	AAGA-7-ATG	78	1.3e-06	YES
GCLIM-U8	432	11	AGG-6-ATG	119	5.1e-12	YES
GCLIM-U9	337	9	AGA-4-TTG	65	N	YES
GCLIM-U10	383	23	GGAA-8-GTG	87	N	YES
GCLIM-U11	373	8	None	106	5.9e-07	YES
GCLIM-U12	331	21	AGGAG-6-GTG	84	N	YES
GCLIM-U13	391	12	AGG-7-ATG	105	N	YES
GCLIM-U14	610	13	AGG-7-ATG	130	N	YES
GCLIM-U15	423	28	AAGAG-11-ATG	118	N	YES

GCLIM-U16	541	25	AGGAGAA-4-GTG	151	2.1e-10	YES
GCLIM-U17	497	55	None	83	N	YES
GCLIM-U18	414	24	AAGGA-9-ATG	99	1.2e-06	YES
GCLIM-U19	368	9	AGAG-3-ATG	116	7.9e-10	YES
GCLIM-U20	419	18	None	134	N	YES
GCLIM-U21	364	150	None	46	1.9e-09	YES
GCLIM-U22	441	18	AGG-7-ATG	115	N	YES
GCLIM-U23	417	27	AAGGAG-5-ATG	104	N	YES
GCLIM-U24	489	31	GGAGG-5-ATG	153	N	YES
GCLIM-U25	563	22	AGGAG-6-ATG	155	2.9e-10	YES
GCLIM-U26	438	12	AGG-7-ATG	118	2.7e-08	NO
GCLIM-U27	406	10	AGG-5-ATG	95	2.2e-09	YES
GCLIM-U28	475	39	AAGA-7-ATG	121	5.8e-10	YES
GCLIM-U29	437	29	None	61	2.3e-07	YES
GCLIM-U30	386	53	AAG-5-ATG	89	N	YES
GCLIM-U31	655	64	GGAGG-3-TTG	193	5.2e-08	YES
GCLIM-U32	660	30	GGA-11-ATG	191	N	YES
GCLIM-U33	408	29	GAG-4-GTG	106	3.00E-10	YES
GCLIM-U34	596	15	AGG-10-ATG	152	1.5e-10	YES
GCLIM-U35	543	11	AGG-6-ATG	152	3.5e-07	YES
GCLIM-U36	358	13	AGG-8-TTG	58	5.7e-07	YES
GCLIM-U37	487	24	AGGAG-8-TTG	99	1.2e-08	YES
GCLIM-U38	724	21	AAGGAA-5-ATG	216	1.00E-10	YES
GCLIM-U39	312	56	None	63	1.5e-05	NO
GCLIM-U40	456	19	None	123	9.9e-05	NO
GCLIM-U41	378	9	None	106	N	YES
GCLIM-U42	411	45	AGG-9-ATG	118	3.4e-08	YES
GCLIM-U43	881	42	GGAG-7-ATG	252	N	YES
GCLIM-U44	265	13	AGA-8-ATG	62	2.2e-07	YES
GCLIM-U45	474	24	None	127	4.3e-11	YES
GCLIM-U46	271	22	AAGGAG-6-ATG	64	1.4e-09	YES
GCLIM-U47	594	37	None	156	1.2e-07	NO
GCLIM-U48	334	14	AGG-7-ATG	80	2.7e-07	NO
GCLIM-U49	265	16	None	79	N	YES
GCLIM-U50	549	13	None	75	N	YES
GCLIM-U51	430	22	AAGGAG-5-ATG	117	1.9e-10	YES
GCLIM-U52	304	10	None	81	3.7e-08	NO

GCLIM-U53	708	70	AAGG-6-ATG	213	1.5e-06	YES
GCLIM-U54	458	28; 176	None; None	64;77	2.5e-08	YES
GCLIM-U55	640	25	AAGAGG-5-ATG	187	8.7e-09	YES
GCLIM-U56	493	14	GGAG-7-ATG	160	5.4e-09	YES
GCLIM-U57	600	55	None	139	2.1e-09	NO
GCLIM-U58	385	53	None	75	N	NO
GCLIM-U59	427	100	None	92	8.8e-12	NO
GCLIM-U60	471	33	GGAG-5-ATG	115	N	NO
GCLIM-U61	376	12	AGG-7-ATG	83	8.1e-09	NO
GCLIM-U62	337	24	None	102	N	NO
<u>GCLIM-U63</u>	632	22	AAG-2-TTG	94	1.1e-10	NO
GCLIM-U64	460	31	GGAG-7-GTG	122	1.9e-09	NO
GCLIM-U65	913	58	AAG-7-ATG	210	N	NO
<u>GCLIM-U66</u>	643	25;387	AGG-5-ATG; AGG-5-ATG	119;65	4.4e-10	YES
<u>GCLIM-U67</u>	871	14;327	None; AGG-4-ATG	76; 154	7.4e-08	NO
GCLIM-U68*	839	235	AAGGA-7-ATG	235	N	YES
GCLIM-U69	500	21	AAGGAG-5-ATG	143	5.1e-07	YES
GCLIM-U70	615	13	AGGAG-6-ATG	121	N	NO
GCLIM-U71	390	12	AGG-6-ATG	105	N	YES
GCLIM-U72	474	15	AGG-10-GTG	126	N	NO
<u>GCLIM-U73</u>	1119	40;711	AAG-5-ATG	223;111	N	NO
GCLIM-U74	313	21	AGGA-6-ATG	78	1.3e-12	NO
GCLIM-U75	596	10	AGG-5-ATG	141	N	YES
GCLIM-U76	326	8	None	89	2.6e-11	YES
GCLIM-U77	334	29	None	102	N	YES
GCLIM-U78	426	133	AAG-4-ATG	>97	6.4e-12	YES
GCLIM-U79	406	10	AGG-5-GTG	103	3.7e-12	YES
GCLIM-U80	435	11	AGG-6-ATG	119	8.7e-10	NO
GCLIM-U81	466	73	AAG-3-ATG	121	5.4e-06	YES
GCLIM-U82	414	10	AGG-5-ATG	135	6.7e-09	YES
GCLIM-U83	490	98	None	105	2.9e-06	NO
GCLIM-U84	280	38	None	81	N	YES
GCLIM-U85	570	13	AGG-8-ATG	166	0.00014	YES
GCLIM-U86	652	121	None	160	5.7e-12	YES
GCLIM-U87	538	11	AGG-6-ATG	135	8.2e-12	YES
GCLIM-U88	646	19	AGA-4-ATG	183	1.5e-10	YES
GCLIM-U89	387	232	None	52	7.6e-09	YES

GCLIM-U90	478	9	None	137	4.5e-09	YES
GCLIM-U91	385	12	None	90	3.6e-12	YES
GCLIM-U92	692	47	AAG-6-ATG	198	3.7e-09	YES
GCLIM-U93	486	31	AGA-4-ATG	128	5.4e-10	YES
GCLIM-U94	253	26	None	76	N	YES
GCLIM-U95	665	47	AGGAAG-5-ATG	159	2.00E-12	YES
GCLIM-U96	379	16	None	49	1.3e-05	YES
GCLIM-U97	971	78	AAGG-9-ATG	271	3.00E-09	YES
GCLIM-U98	676	214	GGGA-7-GTG	112	1.4e-08	YES
<u>GCLIM-U99</u>	439	32;154	None; None	61;92	4.4e-08	YES
GCLIM-U100	355	31	AAGGAGAG-6-ATG	82	4.7e-10	YES
GCLIM-U101	816	84	GGAG-7-ATG	213	1.2e-08	YES
GCLIM-U102	278	104	GGAG-7-ATG	56	N	YES
GCLIM-U103	302	11	None	72	1.6e-05	YES
GCLIM-U104	368	22	GGAG-8-ATG	55	1.1e-12	YES
GCLIM-U105	386	16	AGG-11-TTG	107	7.00E-08	NO
GCLIM-U106	510	25	GGAG-3-ATG	88	N	YES
GCLIM-U107	385	36	None	95	4.6e-09	YES
GCLIM-U108	299	19	None	>94	8.3e-10	YES
GCLIM-U109	410	9	None	108	5.7e-09	YES
GCLIM-U110	254	31	None	55	N	YES
GCLIM-U111	552	10	AGG-5-ATG	151	5.3e-05	YES
GCLIM-U112	378	8	AGG-2-ATG	121	N	NO
GCLIM-U113	1335	8	None	424	5.2e-09	YES
GCLIM-U114	589	28	GGAGG-5-ATG	158	2.5e-06	YES
GCLIM-U115	550	73	AAG-7-ATG	132	1.6e-09	YES
GCLIM-U116	436	37	None	96	N	YES
GCLIM-U117	825	144	None	186	1.7e-09	YES
GCLIM-U118	462	15	None	120	7.9e-07	YES
GCLIM-U119	381	17	None	89	N	YES
GCLIM-U120	431	264	GAA-6-ATG	56	N	NO
GCLIM-U121*	538	70	GGAG-6-ATG	125	8.9e-08	YES
<u>GCLIM-U122</u>	567	20;282	None; None	82; >96	1.7e-10	YES
GCLIM-U123	570	21	AAGG-7-ATG	166	6.6e-12	NO
GCLIM-U124	644	10	AAG-5-ATG	197	0.00024	NO
GCLIM-U125	492	24	AGG-9-ATG	94	3.00E-06	YES
GCLIM-U126	333	12	AGG-5-GTG	81	1.3e-06	NO

GCLIM-U127	788	19	None	223	1.3e-11	YES
GCLIM-U128	577	48	None	151	N	YES
GCLIM-U129	485	26	AGGA-8-ATG	126	5.5e-12	YES
GCLIM-U130	537	25	AAG-9-GTG	76	4.4e-09	YES
GCLIM-U131	762	26	None	201	N	YES
GCLIM-U132	577	48	None	151	8.9e-06	YES
GCLIM-U133	537	25	AAG-9-GTG	143	N	YES
GCLIM-U134	573	20	AGGG-5-ATG	157	N	YES
GCLIM-U135	555	14	AGG-9-ATG	146	3.3e-12	NO
GCLIM-U136	405	14	AGA-9-ATG	89	1.00E-08	NO
GCLIM-U137	585	9	None	66	N	NO
GCLIM-U138	325	2	None	108	7.3e-08	YES
GCLIM-U139	261	10	AGG-5-ATG	65	1.2e-08	YES
GCLIM-U140	321	32	None	79	N	YES
GCLIM-U141	450	21	AAGGGAG-5-ATG	119	8.8e-12	YES
GCLIM-U142	318	23	None	94	N	YES
GCLIM-U143	549	15	AAG-2-ATG	146	N	YES
GCLIM-U144	524	23	AAG-9-ATG	147	8.8e-10	YES
GCLIM-U145	935	32	AGGA-6-ATG	262	6.7e-10	YES
GCLIM-U146	489	27	None	134	4.9e-07	YES
GCLIM-U147	463	30	AAGGA-5-ATG	142	5.4e-11	NO
GCLIM-U148	440	11	AAG-6-ATG	76	4.4e-10	YES
GCLIM-U149	450	87	None	101	5.6e-09	NO
GCLIM-U150	581	16	AGG-11-ATG	145	2.2e-09	YES
GCLIM-U151	377	24	AAGGAGAG-4-ATG	96	N	YES
<u>GCLIM-U152*</u>	658	11	AGG-6-ATG	189	4.7e-09	YES
<u>GCLIM-U153</u>	515	28;276	GGA-6-ATG; None	83; 76	1.8e-11	YES
GCLIM-U154	493	14	AGGA-7-ATG	143	2.4e-11	YES
GCLIM-U155	701	17	AGG-12-ATG	189	3.8e-11	YES
GCLIM-U156	502	17	AGGAA-4-ATG	143	9.6e-11	YES
GCLIM-U157	677	19	GGAA-5-ATG	203	1.8e-10	YES
GCLIM-U158	356	51	AGG-3-ATG	98	8.9e-07	YES
GCLIM-U159	681	48	None	194	2.4e-10	YES
GCLIM-U160	711	54	AAGGAG-4-ATG	194	1.3e-09	YES
GCLIM-U161	386	20	AGAA-3-ATG	103	1.1e-09	YES
GCLIM-U162	800	26	GGAG-7-ATG	207	N	YES
GCLIM-U163	1194	40	AAGA-8-ATG	232	1.7e-06	YES

GCLIM-U164	761	18	AGG-11-ATG	221	N	NO
GCLIM-U165	623	33	GAGGA-6-ATG	159	N	YES
GCLIM-U166*	830	37	None	230	N	YES
GCLIM-U167	560	26	GGAG-10-ATG	141	4.9e-11	YES
GCLIM-U168	361	9	None	95	9.7e-11	YES
GCLIM-U169	477	30	AAGGAG-6-ATG	85	3.7e-06	YES
GCLIM-U170	693	33	GGAG-6-ATG	201	3.8e-07	YES
GCLIM-U171	461	17	AAG-4-GTG	144	N	NO
GCLIM-U172	622	11	AGG-6-ATG	155	1.7e-09	YES
GCLIM-U173	429	9	AGG-4-ATG	123	9.7e-10	YES
GCLIM-U174	632	11	None	186	4.6e-08	YES
<u>GCLIM-U175</u>	919	43;637	GAGG-3-ATG;AGAA-4-ATG	184;74	2.7e-10	YES
GCLIM-U176	496	45	AAGGAA-5-ATG	123	8.00E-10	YES
GCLIM-U177	539	14	None	149	N	YES
GCLIM-U178	470	44	GGAG-1-GTG	140	2.8e-09	YES
GCLIM-U179	440	10	None	124	1.5e-05	NO
GCLIM-U180	324	77	GGAG-7-ATG	63	1.00E-07	YES
GCLIM-U181*	831	12	None	248	0.00024	YES
GCLIM-U182	631	28	AGGGAGGGA-2-ATG	148	N	YES
GCLIM-U183	468	28	AAG-2-ATG	127	1.8e-06	YES
GCLIM-U184	566	114	None	114	N	YES
GCLIM-U185	308	33	None	75	N	NO
GCLIM-U186	1275	663	None	187	2.9e-08	YES
GCLIM-U187	725	101	AGAA-11-ATG	185	0.00029	YES
GCLIM-U188	533	16	AAGG-8-ATG	149	2.4e-10	YES
GCLIM-U189	671	60	GGAG-5-ATG	53	8.7e-09	NO
GCLIM-U190	501	111	GGAAG-11-ATG	126	N	YES
GCLIM-U191	364	14	AAG-1-ATG	98	2.1e-06	YES
GCLIM-U192	555	29	None	130	N	YES
GCLIM-U193	659	34	None	186	1.4e-10	YES
GCLIM-U194	630	38	AGG-6-ATG	181	5.5e-10	YES
GCLIM-U195	435	21	AAGGAG-5-ATG	139	6.4e-07	YES
GCLIM-U196	376	10	None	95	5.2e-10	YES
GCLIM-U197	635	42	AAAG-4-ATG	159	1.9e-06	YES
GCLIM-U198	384	24	GGAGG-5-ATG	98	N	NO
GCLIM-U199	645	12	AGG-7-ATG	194	8.00E-11	YES

GCLIM-U200	555	48	AGGA-6-ATG	102	N	YES
GCLIM-U201	429	15	AAG-3-ATG	118	7.4e-10	YES
GCLIM-U202*	501	25	AAGA-7-ATG	155	6.8e-10	YES
<u>GCLIM-U203</u>	1013	74;667	GAA-5-ATG; AAGAGG-5-ATG	132;78	3.8e-08	YES
GCLIM-U204	491	37	AGG-11-ATG	109	N	YES
GCLIM-U205	535	13	None	142	2.3e-08	YES
GCLIM-U206	1249	552	GGAA-4-ATG	213	1.8e-11	YES
GCLIM-U207	419	89	None	77	2.00E-11	YES
GCLIM-U208	631	33	AGGAG-4-ATG	127	N	YES
GCLIM-U209	494	17	None	128	N	YES
GCLIM-U210	350	15	AGG-10-ATG	112	3.4e-09	NO
GCLIM-U211	531	247	AAG-3-GTG	74	N	NO
GCLIM-U212	724	24	None	>234	9.9e-09	YES
GCLIM-U213	511	16	AGG-11-ATG	113	7.9e-09	YES
GCLIM-U214	314	33	AAG-3-ATG	94	0.0002	YES
GCLIM-U215	423	39	AGGAA-8-ATG	99	1.1e-07	NO
GCLIM-U216	461	9	AGG-4-ATG	147	2.6e-12	YES
GCLIM-U217*	798	10	AGG-5-ATG	224	2.5e-12	YES
GCLIM-U218	777	20; 476	None; AAGAGG-7- ATG	121; 64	1.5e-09	NO
GCLIM-U219	632	28	None	161	1.9e-06	YES
GCLIM-U220	308	22	None	96	N	YES
GCLIM-U221	468	9	None	133	N	NO
<u>GCLIM-U222</u>	1167	40;666	AGG-8-ATG; GGA- 12-ATG	196;110	N	YES
GCLIM-U223	919	18	AAG-5-GTG	256	2.1e-09	YES
GCLIM-U224	836	22	AAGGA-6-ATG	207	1.1e-10	YES
GCLIM-U225	354	9	AGG-4-ATG	95	N	YES
GCLIM-U226	496	20	AAGG-8-TTG	125	1.1e-08	YES
GCLIM-U227	310	18	AAGG-7-ATG	78	9.6e-09	YES
GCLIM-U228*	596	73	GGAGA-6-ATG	150	7.7e-10	YES
GCLIM-U229	692	61	AAGAG-8-GTG	130	0.00016	YES
GCLIM-U230	270	100	None	57	1.8e-11	YES
GCLIM-U231	545	37	None	143	N	YES
GCLIM-U232	534	27	AAGGAA-7-ATG	152	2.8e-10	YES
GCLIM-U233	540	16	None	141	1.5e-06	YES
GCLIM-U234	468	26	AGGAG-5-ATG	129	8.7e-09	YES

<u>GCLIM-U235*</u>	1382	42	None	573	N	YES
GCLIM-U236	574	22	GGAG-5-ATG	167	3.2e-08	YES
GCLIM-U237	602	43	AAGG-9-ATG	166	1.6e-08	YES
GCLIM-U238	1191	383	None	241	N	YES
GCLIM-U239	349	22	AGGAG-8-ATG	91	4.3e-06	YES
GCLIM-U240	634	13	AGA-8-ATG	187	3.7e-09	YES
GCLIM-U241	725	24	AAGA-10-ATG	217	3.4e-07	YES
GCLIM-U242	531	22	AAGGA-3-GTG	153	N	YES
GCLIM-U243	369	7	None	117	8.4e-12	YES
GCLIM-U244	429	12	AAG-8-ATG	123	3.2e-09	YES
GCLIM-U245	527	21	GGAGA-6-ATG	149	1.5e-09	YES
GCLIM-U246	320	33	AGG-3-ATG	96	N	YES
GCLIM-U247	1016	23; 453	GGAG-8-ATG; AAG-7-ATG	72; 188	N	YES
GCLIM-U248	583	30	None	149	7.3e-06	YES
GCLIM-U249	338	45	AGG-9-TTG	74	N	YES
GCLIM-U250	473	66	AGGAAG-8-ATG	119	1.6e-07	YES
GCLIM-U251	443	88	None	90	N	YES
<u>GCLIM-U252*</u>	581	28	GGAGA-5-ATG	167	5.3e-09	YES
GCLIM-U253	458	20	None	129	N	YES
GCLIM-U254	571	16	AGG-11-ATG	160	6.7e-10	YES
GCLIM-U255	778	14	AGG-9-ATG	183	1.7e-07	YES
GCLIM-U256	329	12	AGG-6-ATG	67	3.6e-09	YES
GCLIM-U257	476	102	AGGAG-5-ATG	89	2.9e-10	YES
GCLIM-U258	526	58	None	140	N	NO
GCLIM-U259	551	20	None	160	3.3e-10	YES
GCLIM-U260	441	15	None	125	N	YES
GCLIM-U261	827	24	AGGAG-8-ATG	241	5.7e-09	YES
GCLIM-U262	324	32	None	89	1.5e-07	NO
GCLIM-U263	331	12	AGG-7-ATG	53	1.4e-12	NO
GCLIM-U264	403	96	None	103	1.3e-08	YES
GCLIM-U265	349	30	AAGGA-4-ATG	86	N	YES
GCLIM-U266	412	10	None	117	N	YES
GCLIM-U267	1014	22	GGAGG-5-ATG	310	N	YES
GCLIM-U268	714	257	AGGAG-2-ATG	125	N	YES
GCLIM-U269	321	12	AGAA-5-ATG	82	1.5e-08	YES
GCLIM-U270	640	13	AGGG-7-ATG	184	0.0025	YES
GCLIM-U271	298	17	None	94	2.4e-09	YES

GCLIM-U272	450	11	AGG-6-ATG	129	N	YES
GCLIM-U273	404	28	AGGAG-9-ATG	91	1.00E-09	YES
GCLIM-U274	254	21	None	78	N	YES
GCLIM-U275	799	23	None	242	5.1e-08	YES
GCLIM-U276	813	11	AGG-7-ATG	246	1.1e-11	YES
GCLIM-U277	347	26	AAG-2-GTG	109	N	NO
GCLIM-U278	373	10	AGAA-4-ATG	98	3.1e-08	YES
GCLIM-U279	398	20	AAGGAG-6-TTG	105	9.8e-08	YES
GCLIM-U280	285	11	AGG-6-ATG	72	3.8e-11	YES
GCLIM-U281	362	76	None	>96	7.1e-09	YES
GCLIM-U282	282	24	GGAG-7-ATG	69	4.3e-07	YES
GCLIM-U283	834	117	AAG-6-ATG	186	1.3e-09	YES
GCLIM-U284	389	11	AGAA-5-GTG	106	N	NO
GCLIM-U285	713	25	GAA-9-ATG	209	2.5e-10	YES
GCLIM-U286	535	15	None	145	N	YES
GCLIM-U287	655	25	None	189	6.5e-08	YES
GCLIM-U288	596	76	AAG-11-ATG	152	N	NO
GCLIM-U289	507	20	AAGGAG-5-ATG	134	N	NO
GCLIM-U290	589	50	None	150	6.00E-08	YES
GCLIM-U291	638	83	AGAA-10-ATG	125	7.1e-08	YES
GCLIM-U292	318	10	AGAA-4-ATG	103	7.8e-07	YES
GCLIM-U293	557	26	AGGAGA-10-ATG	142	1.9e-07	YES
GCLIM-U294	1104	10	None	195	1.00E-08	YES
GCLIM-U295	523	12	None	143	3.4e-09	YES
GCLIM-U296	830	74	None	219	1.5e-08	YES
GCLIM-U297	702	9	AGA-4-ATG	205	N	YES
GCLIM-U298	977	425; 625	AGAGG-5-ATG; None	67; 100	1.8e-05	YES
GCLIM-U299	346	15	AAG-2-ATG	90	2.5e-10	NO
GCLIM-U300	636	25	GAGGG-8-ATG	179	2.5e-11	YES
GCLIM-U301	968	19	None	290	1.5e-09	YES
GCLIM-U302	446	24	AAGG-8-GTG	121	3.4e-09	YES
GCLIM-U303	430	22	AGG-10-ATG	119	N	YES
GCLIM-U304	313	27	None	80	4.1e-08	YES
GCLIM-U305	514	13	AGG-8-ATG	142	1.6e-11	YES
GCLIM-U306	451	21	AGGA-6-GTG	124	7.4e-08	YES
GCLIM-U307	363	18	AAGGA-5-ATG	93	5.1e-09	YES
GCLIM-U308	836	70	AAGGAA-6-ATG	233	2.1e-08	YES

GCLIM-U309*	1556	30;948	AGGAG-5-ATG; AAGAG-9-ATG	276;176	N	NO
GCLIM-U310	789	257	None	137	4.00E-11	YES
GCLIM-U311	511	19	AAGGAG-5-ATG	160	7.4e-11	YES
GCLIM-U312	933	6	AGG-1-ATG	284	1.1e-05	NO
GCLIM-U313	699	79	GGAG-6-ATG	168	8.1e-12	YES
GCLIM-U314	612	40	GGA-4-ATG	167	3.4e-09	YES
GCLIM-U315	513	13	AGG-8-ATG	135	1.2e-11	YES
GCLIM-U316	693	33	AAGGGAG-5-ATG	180	3.3e-09	YES
GCLIM-U317	447	32	GAGG-4-ATG	72	1.4e-10	YES
GCLIM-U318	373	14	AGA-9-ATG	120	6.9e-10	YES
GCLIM-U319	905	19	AGGAG-4-ATG	272	2.3e-12	YES
<u>GCLIM-U320</u>	553	18; 278	AAGGAG-5-GTG; None	87;88	N	YES
GCLIM-U321	535	16	None	146	0.00027	YES
GCLIM-U322	554	9	AGG-4-ATG	145	2.8e-11	YES
GCLIM-U323	531	11	AGG-6-ATG	141	1.1e-09	YES
GCLIM-U324	472	9	AGA-4-ATG	129	1.2e-07	YES
GCLIM-U325	915	187	AGGA-7-ATG	146	1.2e-10	YES
<u>GCLIM-U326</u>	581	22; 267	GGAGG-6-ATG; AGG-7-ATG	76; 85	8.9e-10	YES
GCLIM-U327	523	54	GGAGA-5-ATG	111	1.1e-09	YES
GCLIM-U328	364	12	AGGAG-5-ATG	101	1.2e-07	YES
GCLIM-U329	458	17	None	123	1.3e-06	YES
GCLIM-U330	444	9	AGAA-4-ATG	116	N	YES
GCLIM-U331	277	21	None	63	8.8e-06	YES
GCLIM-U332	272	72	None	67	N	YES
GCLIM-U333	564	60	GGAGA-6-ATG	149	6.4e-09	YES
GCLIM-U334	276	13	GGAGA-6-ATG	53	N	YES
GCLIM-U335	307	30	None	75	9.00E-07	YES
GCLIM-U336	451	9	AGG-4-ATG	>148	1.6e-12	YES
GCLIM-U337	669	20	GGAG-5-ATG	196	N	NO
GCLIM-U338	427	12	None	96	3.00E-10	YES
GCLIM-U339	386	17	GGA-7-ATG	106	N	YES
GCLIM-U340	512	59	None	125	N	YES
GCLIM-U341	613	74	GGAG-7-ATG	66	N	YES
GCLIM-U342	535	21	GGAGG-4-ATG	149	6.2e-12	YES
GCLIM-U343	609	18	GGAA-5-ATG	180	2.5e-12	YES

GCLIM-U344	822	14	AAGG-8-ATG	162	2.2e-05	YES
GCLIM-U345	377	67	AGG-7-ATG	82	6.00E-09	YES
GCLIM-U346	573	39	None	157	2.3e-08	YES
GCLIM-U347	419	29	None	106	2.1e-10	YES
GCLIM-U348	562	19	AAGGA-4-ATG	164	2.1e-10	NO
GCLIM-U349	405	17	None	79	N	YES
GCLIM-U350	596	16	AGG-11-ATG	157	N	YES
GCLIM-U351	566	13	AGG-8-ATG	128	N	YES
GCLIM-U352	389	106	AAG-3-ATG	72	1.6e-12	YES
GCLIM-U353	648	14	AGG-9-ATG	175	3.5e-09	NO
GCLIM-U354	340	23	AAGG-1-ATG	106	N	NO
GCLIM-U355	456	9	None	124	2.9e-10	NO
GCLIM-U356	307	33	AGGAG-7-ATG	71	1.3e-12	YES
GCLIM-U357	391	9	None	95	N	NO
GCLIM-U358	295	63	AGGA-6-ATG	74	2.6e-07	YES
GCLIM-U359	355	22	AGGAA-4-ATG	89	N	NO
GCLIM-U360	377	32	AGAA-4-ATG	95	1.7e-09	NO
GCLIM-U361	450	11	AGG-5-ATG	100	1.9e-10	YES
GCLIM-U362	228	13	GGAG-4-ATG	72	2.8e-06	NO
GCLIM-U363	366	12	AGG-7-ATG	85	N	YES
GCLIM-U364	675	33	AAGG-8-GTG	195	7.7e-11	YES
GCLIM-U365	498	32	None	139	5.7e-10	YES
GCLIM-U366	340	19	None	103	1.3e-09	NO
GCLIM-U367	435	6	None	109	1.3e-09	NO
GCLIM-U368	926	33	GGAG-4-ATG	269	5.9e-11	YES
GCLIM-U369	680	26	None	201	1.2e-07	YES
GCLIM-U370	1152	288	AAGGG-10-GTG	259	N	YES
GCLIM-U371	1177	64	AAGGAG-9-ATG	332	1.1e-08	NO
GCLIM-U372	613	245	None	106	2.5e-09	YES
GCLIM-U373	566	18	AAGA-3-ATG	145	2.1e-09	YES
GCLIM-U374	260	63	AGGAG-6-ATG	39	N	YES
GCLIM-U375	588	9	AGAA-3-ATG	167	N	YES
GCLIM-U376	303	12	None	72	N	YES
GCLIM-U377	299	13	None	75	N	YES
GCLIM-U378	562	16	AGG-11-ATG	152	2.4e-12	YES
GCLIM-U379	288	127	None	54	6.7e-08	YES
GCLIM-U380	1000	8	AGG-3-ATG	288	N	YES

GCLIM-U381	466	21	AGGAA-5-ATG	129	2.00E-12	NO
GCLIM-U382	364	7	None	98	N	NO
GCLIM-U383	364	13	AGG-1-ATG	81	8.8e-09	YES
GCLIM-U384	548	182	None	72	1.3e-05	NO
GCLIM-U385	815	10	AGA-5-ATG	243	N	YES
GCLIM-U386	310	30	None	71	N	NO
GCLIM-U387	1128	6	None	282	8.9e-07	YES
GCLIM-U388	322	20	AGAA-4-ATG	97	N	NO
GCLIM-U389	142	2	None	23	N	YES
GCLIM-U390	483	41	None	124	2.7e-10	NO
GCLIM-U391	413	13	AGG-7-ATG	117	6.9e-10	NO
GCLIM-U392	277	31	AAG-2-ATG	83	1.3e-07	NO
GCLIM-U393	279	33	AGG-3-ATG	83	1.8e-06	NO
GCLIM-U394	372	53	AAAG-2-GTG	59	N	NO
GCLIM-U395	481	253	None	74	2.6e-08	NO
GCLIM-U396	368	54	None	64	N	YES
GCLIM-U397	456	42	None	108	4.00E-10	YES
GCLIM-U398	428	9	None	120	1.5e-09	YES
GCLIM-U399	341	10	AGG-4-GTG	>112	2.00E-09	NO
GCLIM-U400	458	34	None	117	6.8e-11	YES
GCLIM-U401	583	232	AAG-3-ATG	98	2.00E-07	NO
GCLIM-U402	277	32	AGG-2-ATG	82	N	YES
GCLIM-U403	615	14	None	174	N	NO
GCLIM-U404	541	175	AGAA-5-ATG	123	7.4e-06	YES

Supplementary Table 8: Features of the 38 GCLIM-D novel GCs identified in this study that encode peptides with conserved domains of unknown functions (DUF).

GCLIM-D	GC size (bp)	UTR size (bp)	TIR	<i>attC</i> e-value	5'/3'-CS
GCLIM-D1	461	63	None	4.2e-08	YES

GCLIM-D2	607	84	AAG-3-ATG	0.00036	YES
GCLIM-D3	318	73	AAAGG-7-TTG	1.2e-09	YES
GCLIM-D4	436	22	GGAGAG-4-ATG	4.5e-12	NO
GCLIM-D5	439	28	AGG-6-ATG	2.2e-09	YES
GCLIM-D6	431	38	GGAG-6-ATG	2.2e-10	NO
GCLIM-D7	738	6	AGG-1-ATG	0.0022	YES
GCLIM-D8	426	55	GGAAG-11ATG	2.1e-11	YES
GCLIM-D9	469	25	GGAG-6-ATG	1.6e-08	YES
GCLIM-D10	577	16	AGA-11-ATG	1.8e-10	YES
GCLIM-D11	577	16	AGG-11-ATG	1.4e-09	YES
<u>GCLIM-D12</u>	1517	19; 476	GAG-7-ATG; None	5.3e-08	YES
<u>GCLIM-D13</u>	640	16; 236	AGG-11-ATG; GGAG-10-ATG	2.4e-09	YES
GCLIM-D14	623	36	AAG-5-ATG	N	YES
GCLIM-D15	433	12	AGGAA-5-ATG	3.3e-08	YES
GCLIM-D16	647	151	None	2.8e-10	YES
GCLIM-D17	661	24	AGGA-4-ATG	1.5e-10	YES
GCLIM-D18	785	39	None	6.3e-07	YES
GCLIM-D19	561	22	GAGG-5-ATG	N	YES
GCLIM-D20	464	29	AAGGAG-6-ATG	5.2e-10	YES
GCLIM-D21	648	19	None	3.5e-09	YES
GCLIM-D22	643	33	GGAA-4-ATG	N	YES
GCLIM-D23	569	16	AGG-11-ATG	N	YES
GCLIM-D24	1140	47	AAGG-9-ATG	2.9e-08	YES
GCLIM-D25	755	34	GAGA-2-ATG	3.7e-10	YES
GCLIM-D26	370	33	GAGGA-5-ATG	N	YES
GCLIM-D27	731	20	AAGGA-5-ATG	3.5e-11	YES
GCLIM-D28	774	48	AAGAA-5-ATG	4.00E-11	YES
GCLIM-D29	661	33	GGAGG-6-ATG	N	YES
GCLIM-D30	273	34	AAG-3-ATG	N	YES
GCLIM-D31	413	40	AAG-3-ATG	N	NO
GCLIM-D32	502	65	GGAG-5-ATG	1.5e-10	YES
GCLIM-D33	673	13	AGA-8-ATG	N	NO
GCLIM-D34	581	21	GGAGA-6-TTG	0.0024	YES
GCLIM-D35	280	32	AAGGAG-8-ATG	1.3e-07	YES
GCLIM-D36	1174	234	AAG-3-ATG	1.2e-10	YES
<u>GCLIM-D37</u>	787	22; 521	AAGGAA-6-ATG; None	7.2e-10	YES
GCLIM-D38	932	81	GGA-6-ATG	N	YES

Supplementary Table 9: Features of the 114 GCLIM-C novel GCs identified in this study that encode peptides with conserved domains.

GC-LIM	GC size (bp)	UTR size (bp)	TIR	<i>attC</i> e-value	5'/3'-CS
<u>GCLIM-C1</u>	772	77;328	None; AGGAG-7-ATG	N	YES
<i>GCLIM-C2</i>	1015	37;359;628	None; None; GGAG-6-ATG	N	YES
GCLIM-C3	446	20	AAGGA-6-ATG	9.2e-10	YES
<u>GCLIM-C4</u>	732	34;356	GGA-5-GTG; AAGGAA-7-ATG	N	YES
GCLIM-C5	487	30	AGG-5-ATG	4.5e-09	YES
GCLIM-C6	600	41	None	9.3e-08	YES
GCLIM-C7	519	50	GGAG-6-ATG	N	YES
GCLIM-C8	818	22	GAGG-5-ATG	1.4e-10	YES
GCLIM-C9	580	13	None	6.8e-11	Non
GCLIM-C10	318	34	None	1.4e-08	YES
<u>GCLIM-C11</u>	686	74;367	GGAG-7-ATG; AAGG-7-ATG	N	YES
GCLIM-C12	543	93	None	N	NO
GCLIM-C13	632	38	None	2.7e-11	YES
GCLIM-C14	603	20	GGAGG-4-GTG	1.7e-10	YES
<u>GCLIM-C15</u>	1763	24; 1008	GAGG-5-ATG; None	N	YES
GCLIM-C16	444	27	AAGGA-6-ATG	2.3e-09	YES
GCLIM-C17	659	8	None	2.5e-10	YES
GCLIM-C18	858	38	AGGAG-7-ATG	1.3e-10	YES
GCLIM-C19	550	34	None	3.3e-09	NO
GCLIM-C21	466	35	AAGGA-6-ATG	5.9e-09	YES
GCLIM-C22	529	15	AGG-10-ATG	7.7e-08	NO
<u>GCLIM-C23</u>	863	9; 415	GGA-3-ATG; None	4.6e-05	YES
GCLIM-C24	1355	116	AGGA-8-ATG	1.9e-08	YES
<u>GCLIM-C25</u>	989	29; 463	GGAGG-4-ATG; None	8.2e-09	YES
GCLIM-C26	465	25	GGAG-10-ATG	N	NO
<u>GCLIM-C27</u>	530	22;292	AAGGAG-8-ATG; AAGG-11-ATG	2.3e-08	YES
GCLIM-C28	560	26	AAGGAG-5-ATG	5.2e-06	YES
GCLIM-C29	1629	415	AAG-8-ATG	7.3e-10	YES

GCLIM-C30	541	21	AAGG-8-ATG	8.2e-09	YES
GCLIM-C31	381	94	None	6.7e-06	YES
GCLIM-C32	598	21	None	3.1e-09	YES
GCLIM-C33	511	12	None	1.1e-05	YES
GCLIM-C34	651	40	None	3.5e-05	YES
GCLIM-C35	1355	43	None	2.1e-07	YES
GCLIM-C36	750	20	AGAG-7-ATG	3.3e-08	YES
GCLIM-C37	699	47	AGGAG-6-ATG	N	YES
GCLIM-C38	1353	11	AGA-6-ATG	4.3e-05	YES
<u>GCLIM-C39</u>	1305	22;573	None; AAGA-10-ATG	4.8e-08	YES
<u>GCLIM-C40</u>	1772	59;1422	GGAG-6-ATG; None	1.1e-09	YES
GCLIM-C41	696	11	None	8.4e-11	NO
<u>GCLIM-C42</u>	1228	33;668	GAGG-7-ATG; AAGGA-7-ATG	N	YES
GCLIM-C43	693	10	None	1.8e-07	YES
GCLIM-C44	698	20	AAGG-8-ATG	6.7e-07	YES
GCLIM-C45	901	22	GGAG-5-ATG	1.1e-11	YES
GCLIM-C46	757	56	GGA-11-ATG	2.9e-09	YES
<i>GCLIM-C47</i>	2306	23;639;1291	GGA-8-ATG; AAGG- 10-ATG; AGAA-8- ATG	1.7e-10	YES
<u>GCLIM-C48</u>	933	32;351	AGG-8-ATG; AAG-6- ATG	N	YES
GCLIM-C49	372	9	None	N	YES
GCLIM-C50	1199	58	AAG-9-ATG	5.00E-12	YES
GCLIM-C51	753	52	GGAGA-6-ATG	2.6e-12	YES
GCLIM-C52	1037	25	AAGAG-8-ATG	1.3e-07	YES
GCLIM-C53	353	32	GGAG-6-ATG	N	NO
GCLIM-C54	651	41	None	N	YES
GCLIM-C55	873	14	AGA-9-ATG	7.5e-08	NO
GCLIM-C56	504	21	AGGAG-6-GTG	1.7e-08	YES
GCLIM-C57	477	17	AGAA-4-ATG	N	NO
GCLIM-C58	740	29	GAGG-5-ATG	5.1e-07	NO
GCLIM-C59	406	12	AGG-7-ATG	1.5e-08	YES
GCLIM-C60	962	311	AGAA-4-ATG	2.1e-10	YES
GCLIM-C61	672	36	GGAG-7-ATG	2.5e-11	YES
GCLIM-C62	1143	100	GAGG-7-GTG	2.2e-09	NO
GCLIM-C63	881	35	AGGAG-8-ATG	6.3e-10	YES

<u>GCLIM-C64</u>	2063	39;1384	AGG-7-ATG; None	6.6e-10	YES
<u>GCLIM-C65</u>	1319	85; 868	GGAGA-6-ATG; None	7.4e-09	YES
GCLIM-C66	553	13	AGG-8-ATG	2.00E-09	YES
<u>GCLIM-C67</u>	768	11	None	7.6e-08	YES
<u>GCLIM-C68</u>	647	50;316	AAGGAG-7-ATG; AAGG-8-ATG	1.00E-09	YES
GCLIM-C69	726	63	None	6.00E-11	YES
GCLIM-C70	762	17	AAGGAA-7-ATG	5.2e-07	YES
GCLIM-C71	788	29	GGAG-5-GTG	6.3e-09	NO
<u>GCLIM-C72</u>	1518	55;457	AAGGGAG-6-ATG; AGGA-2-ATG	5.00E-09	YES
GCLIM-C73	429	26	AAGAG-6-ATG	8.4e-10	YES
GCLIM-C74	413	11	AGG-6-ATG	1.00E-11	YES
GCLIM-C75	501	50	AAGGG-7-ATG	9.00E-09	YES
GCLIM-C76	945	38	AAGGAA-9-ATG	6.5e-11	YES
GCLIM-C77	663	15	AGG-9-ATG	5.00E-10	YES
GCLIM-C78	786	16	AGAG-10-ATG	4.6e-06	YES
GCLIM-C79	1246	208	None	7.2e-08	YES
GCLIM-C80	925	24	None	N	YES
GCLIM-C81	522	14	AGG-9-ATG	1.6e-12	NO
GCLIM-C82	404	22	AAGGAG-5-ATG	1.2e-09	YES
<u>GCLIM-C83</u>	869	41;404	None; AGGAA-6-ATG	6.8e-11	YES
GCLIM-C84	582	9	None	9.9e-10	YES
GCLIM-C85	682	79	AGGGAGAA-9-ATG	1.7e-08	NO
GCLIM-C86	649	21	AGGAG-5-GTG	1.00E-10	YES
GCLIM-C87	844	52	AAGGAAG-8-ATG	3.5e-12	YES
GCLIM-C88	996	24	AGGGAAG-4-ATG	1.8e-06	YES
GCLIM-C89	624	18	AGG-6-ATG	2.1e-08	NO
GCLIM-C90	1010	22	AGA-8-ATG	N	YES
<u>GCLIM-C91</u>	864	22	GGAG-4-ATG	3.7e-11	NO
GCLIM-C92	537	26	AAGGA-6-ATG	3.3e-11	YES
GCLIM-C93	422	29	GGAGA-7-GTG	0.00047	YES
GCLIM-C94	842	31	AAGGAG-6-ATG	N	YES
GCLIM-C95	435	9	None	1.5e-08	YES
GCLIM-C96	456	52	AAGGAG-7-ATG	7.1e-09	YES
GCLIM-C97	294	18	AAGGA-7-ATG	4.2e-06	YES
GCLIM-C98	611	10	None	1.1e-09	YES
GCLIM-C99	561	19	AAGGAA-6-ATG	2.7e-07	YES

GCLIM-C100	817	9	AGA-4-ATG	N	YES
GCLIM-C101	453	10	AGG-5-ATG	1.3e-12	YES
<u>GCLIM-C102</u>	820	9;304	None; AAGGA-7-ATG	5.6e-11	YES
GCLIM-C103	774	288	None	N	YES
GCLIM-C104	731	23	None	7.6e-09	YES
GCLIM-C105	392	10	AGAG-4-ATG	3.1e-08	YES
GCLIM-C106	805	31	None	8.7e-07	YES
GCLIM-C107	736	34	GGAG-6-ATG	N	YES
<u>GCLIM-C108</u>	1622	39;968	GGAGAG-6-ATG; AGG-9-ATG	8.9e-11	YES
GCLIM-C109	529	35	AAGGA-10-ATG	4.2e-11	YES
<u>GCLIM-C110</u>	595	35;302	AGGA-7-ATG; GGAG-1-ATG	1.4e-06	YES
GCLIM-C111	487	19	None	1.4e-12	YES
GCLIM-C112	460	24	AGGAG-7-ATG	0.00017	YES
GCLIM-C113	434	43	None	6.3e-07	YES
GCLIM-C114	838	44	GGAG-13-ATG	N	NO
GCLIM-C115	800	26	AGAA-7-ATG	1.2e-09	YES

Supplementary Table 10: Features of the 27 GCLIM-AR novel GCs identified in this study that encode proteins related to antibiotic resistance.

GCLIM-AR	GC size (bp)	UTR size (bp)	TIR	<i>attC</i> e-value	5'-/3'-CS
GCLIM-AR1	718	57	AAG-6-ATG	2.2e-09	YES
GCLIM-AR2	926	20	AGGA-4-ATG	5.6e-08	YES
GCLIM-AR3	449	29	AGGA-10-ATG	1.9e-12	NO
GCLIM-AR4	451	25	AGGAG-6-GTG	3.3e-11	YES
GCLIM-AR5	887	20	AGGAG-6-ATG	5.6e-10	YES
GCLIM-AR6	462	41	GGAGGA-5-ATG	9e-09	YES
GCLIM-AR7	437	140	AAGG-7-ATG	2.1e-10	YES
GCLIM-AR8	560	79	AGAA-3-ATG	5.2e-09	YES
GCLIM-AR9	695	22	None	6.4e-11	NO
GCLIM-AR10	444	20	GGAG-5-ATG	4e-11	NO
GCLIM-AR11	864	27	None	1.1e-06	YES
GCLIM-AR12	559	110	AAG-4-ATG	3e-10	YES
GCLIM-AR13	478	39	AGAG-4-ATG	1.1e-10	NO
GCLIM-AR14	552	39	GGAG-7-ATG	2e-08	YES

GCLIM-AR15	1458	67	GAA-7-ATG	N	YES
GCLIM-AR16	598	37	AAGGA-1-ATG	2.3e-08	YES
GCLIM-AR17	493	41	AGGAG-7-ATG	N	YES
GCLIM-AR18	877	13	AGG-8-ATG	3.5e-09	YES
GCLIM-AR19	542	106	GGAGA-6-ATG	N	YES
<u>GCLIM-AR20</u>	1591	34; 531	AGAGAA-4-ATG ; AGG-7-ATG	N	YES
<u>GCLIM-AR21</u>	1232	73;644	None; AAGA-10-ATG	N	YES
<u>GCLIM-AR22</u>	771	24; 451	AAGGAG-7-ATG; GGAGG-5-ATG	4.8e-07	YES
GCLIM-AR23	397	24	GGAG-6-GTG	1.1e-10	YES
GCLIM-AR24	921	18	AAGG-7-ATG	8.9e-09	YES
GCLIM-AR25	862	21	GGAGG-4-GTG	1.7e-09	YES
GCLIM-AR26	565	9	AGG-4-ATG	3.6e-08	YES
GCLIM-AR27	529	35	AAGGA-10-ATG	4.2e-11	YES

Supplementary Table 11: Features of the 10 GCLIM-N with no ORF identified in this study.

GC name	GC size	<i>attC</i> e-value	5'-/3'-CS
GCLIM-N1	485	N	YES
GCLIM-N2	365	N	YES
GCLIM-N3	244	1.4e-11	YES
GCLIM-N4	219	7.3e-05	NO
GCLIM-N5	380	3.5e-09	YES
GCLIM-N6	308	5.8e-08	NO
GCLIM-N7	696	N	YES
GCLIM-N8	708	3.8e-10	NO
GCLIM-N9	131	N	YES
GCLIM-N10	519	4.5e-08	NO

Supplementary Table 12: Number and proportions of mapped GCs shared with other MIs in each effluent.

A) Absolute numbers of unique and shared GC in each sample for each MI

	MI1	MI2	MI3	MI1 U MI2	MI1 U MI3	MI2 U MI3	MI1 U MI2 U MI3	Total MI1	Total MI2	Total MI3
All effluents	201	8	269	31	251	17	107	590	163	644
HF1a	145	7	119	9	61	1	9	224	26	190
HF1b	233	7	45	18	44	1	26	321	52	116
HF2	119	13	93	6	26	0	8	159	27	127
HS1	112	8	57	19	30	1	12	173	40	100
HS2	84	11	29	13	26	3	5	128	32	63
HS3	76	11	38	10	22	1	9	117	31	70
HG1	129	8	92	7	31	3	14	181	32	140
HG2	108	9	89	22	33	6	9	167	46	137
HN1	149	8	76	13	41	0	7	210	28	124
HL1	122	7	59	13	21	4	9	165	33	93
UF1	157	6	246	12	114	8	29	312	43	385
UF2	178	7	200	25	98	8	34	335	51	340
SF1	86	9	175	9	25	4	10	130	32	214
SF2	81	18	237	12	44	6	12	149	38	299
WF1	108	18	272	11	68	13	19	206	61	372
WF2	148	13	202	18	63	9	19	248	59	293
RF1	173	--	163	--	51	--	--	224	--	214
RF2	199	--	258	--	107	--	--	306	--	365

B) Proportions of shared GC in each sample for each MI

	% of shared MI1 GC	% of shared MI2 GC	% of shared MI3 GC
All effluents	66	95	58
HF1a	35	73	37
HF1b	27	87	61
HF2	25	52	27
HS1	35	80	43
HS2	34	66	54
HS3	35	65	46
HG1	29	75	34
HG2	35	80	35
HN1	29	71	39
HL1	26	79	37
Hospital	31	73	41
UF1	50	86	36
UF2	47	86	41
Urban	48	86	39
SF1	34	72	18
SF2	46	53	21
Slaughterhouse	40	62	20
WF1	48	71	27
WF2	40	78	31
WWTP	44	74	29
RF1	23	--	24
RF2	35	--	29
River	29	--	27

Supplementary Table 12: Relative proportions GCs types in MI3 detected in each effluent (M2 mapping).

	HF1a	HF1b	HF2	HS1	HS2	HS3	HG1	HG2	HN1	HL1
<i>Hospital effluents</i>										
AG resistance	48.2	46.4	28.8	55.2	63.1	83.6	3.4	42.7	49.5	35.1
BL resistance	44.3	38.6	32.9	2.4	36.1	16.2	8.0	41.1	49.3	64.3
QAC resistance	4.8	13.5	0.2	0.1	0.0	0.0	0.6	0.1	0.0	0.0
Other resistance	0.1	0.0	0.1	0.0	0.8	0.2	0.3	0.2	0.3	0.0
Unknown function	0.6	0.1	2.4	0.3	0.0	0.0	2.9	0.6	0.1	0.1
GCLIM-AR	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2	0.4	0.6	0.0
GCLIM-C	0.3	0.1	0.9	0.0	0.0	0.0	9.3	1.5	0.0	0.0
GCLIM-D	0.1	0.0	10.3	34.9	0.0	0.0	12.2	5.6	0.1	0.0
GCLIM-N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
GCLIM-U	1.7	0.9	24.3	7.0	0.0	0.0	63.2	8.0	0.1	0.4
<i>Other effluents</i>										
	UF1	UF2	SF1	SF2	WF1	WF2	RF1	RF2		
AG resistance	9.4	1.3	3.9	32.7	6.8	10.4	10.1	18.9		
BL resistance	1.0	1.4	0.2	2.3	2.7	14.9	2.3	2.5		
QAC resistance	0.7	1.1	0.2	2.5	0.4	6.6	28.1	4.8		
Other resistance	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.3	0.1	0.1		
Unknown function	6.2	3.6	55.2	5.4	1.7	5.4	2.2	1.0		
GCLIM-AR	0.5	0.3	0.0	1.3	0.4	0.2	0.2	0.1		
GCLIM-C	3.8	10.3	1.2	3.7	5.8	9.6	2.1	4.2		
GCLIM-D	0.6	2.9	0.7	2.3	8.7	2.0	1.7	34.5		
GCLIM-N	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7	2.7	0.8		
GCLIM-U	77.6	79.0	38.6	49.8	73.4	42.8	50.7	33.1		

Supplementary Table 14: Relative proportion of each of the MI1 GC type according effluent types (M2 mapping).

	Hospitals	Urban	Slaughterhouses	WWTP	Rivers
<i>Aminoglycosides</i>	65.6	60.0	88.6	45.5	69.8
<i>β-lactams</i>	14.4	18.5	3.7	15.3	10.4
<i>Trimetoprim</i>	11.0	5.6	3.5	8 ;4	3.4
<i>Fosfomycin</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Quaternary ammonium compounds</i>	2.3	4.7	0.6	14.3	11.8
<i>Others</i>	1.8	0.9	1.1	3.5	0.8

<i>gcu</i>	2.6	7.4	1.4	2.6	1.8
<i>GCLIM GCs</i>	2.2	2.9	1.1	10.4	2.0

Supplementary Table 15: Relative proportions of aminoglycosides resistance GC in MI1 detected in each effluent (M2 mapping).

	HF1a	HF1b	HF2	HS1	HS2	HS3	HG1	HG2	HN1	HL1
<i>Hospital effluents</i>										
<i>aacA3</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	4.1	--
<i>aacA4</i>	45.2	42.5	35.3	8.2	49.5	49.4	12.5	4.7	25.1	35.8
<i>aacA7</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1.5
<i>aacA52</i>	1.0	1.6	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>aacC1</i>	--	--	--	--	1.2	1.3	--	--	--	--
<i>aacC2</i>	--	--	16.8	--	--	--	6.3	--	--	--
<i>aacC3</i>	--	--	--	3.4	--	--	--	--	--	--
<i>aadA1</i>	5.7	5.5	3.4	44.2	3.8	4.4	6.4	3.4	6.0	37.4
<i>aadA2</i>	4.1	4.3	7.1	0.6	1.5	1.9	26.6	4.6	7.5	--
<i>aadA5</i>	--	--	--	--	--	--	--	47.8	--	0.9
<i>aadA6</i>	--	--	--	--	--	--	--	0.4	--	--
<i>aadA9</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	4.4	--
<i>aadA24</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.3
<i>aadB</i>	12.2	7.1	0.7	4.4	1.2	1.5	32.2	--	--	--
<i>Other effluents</i>	UF1	UF2	SF1	SF2	WF1	WF2	RF1	RF2		
<i>aacA3</i>	--	--	--	--	--	--	--	--		
<i>aacA4</i>	34.7	--	--	--	--	1.1	17.2	3.0		
<i>aacA7</i>	--	2.7	--	--	--	--	--	--		
<i>aacA42</i>	--	--	--	--	--	17.4	--	--		
<i>aacA43</i>	--	--	--	--	--	4.7	--	--		
<i>aacA46</i>	--	--	--	--	--	1.2	--	--		
<i>aacA56</i>	--	--	--	--	--	1.3	--	--		
<i>aadA1</i>	--	32.3	55.0	24.7	30.7	--	16.1	23.2		
<i>aadA2</i>	11.9	6.4	23.1	38.3	12.1	--	25.0	21.0		
<i>aadA4</i>	--	--	--	1.9	4.5	--	--	--		
<i>aadA5</i>	4.4	4.0	2.0	5.0	2.1	--	--	1.4		
<i>aadA6</i>	4.6	6.7	--	--	8.6	--	--	2.0		
<i>aadA9</i>	--	--	3.8	16.1	--	--	9.6	--		
<i>aadA13</i>	2.4	--	--	--	--	--	--	--		
<i>aadA16</i>	--	--	1.5	--	--	--	--	--		
<i>aadB</i>	--	--	--	--	--	--	13.8	--		

Supplementary Table 16: Relative proportions of β -lactam resistance GC in MI1 detected in each effluent (M2 mapping).

	HF1a	HF1b	HF2	HS1	HS2	HS3	HG1	HG2	HN1	HL1
<i>Hospital effluents</i>										
<i>bla</i> _{BEL-1}	--	--	--	--	<0.1	<0.1	--	--	--	--
<i>bla</i> _{CARB-1}	--	--	--	--	--	--	--	0.1	--	--
<i>bla</i> _{GES-1}	--	--	--	--	1.3	1.4	0.5	0.1	0.2	3.4
<i>bla</i> _{GIM-1}	--	--	--	--	--	--	0.3	--	--	--
<i>bla</i> _{OXA-1}	--	0.8	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	--	0.8	1.0	0.2
<i>bla</i> _{OXA-2}	0.7	1.1	0.3	2.2	1.2	1.2	1.4	0.5	3.2	0.8
<i>bla</i> _{OXA-9}	--	--	--	0.1	--	--	--	--	--	--
<i>bla</i> _{OXA-10}	13.2	9.8	5.5	<0.1	33.9	32.0	1.6	0.7	6.8	11.9
<i>bla</i> _{OXA-20}	0.4	0.7	<0.1	<0.1	--	--	--	--	--	0.4
<i>bla</i> _{OXA-21}	--	--	--	--	--	--	0.3	--	--	--
<i>bla</i> _{OXA-118}	1.2	1.0	--	--	--	--	--	--	0.3	--
<i>bla</i> _{OXA-129}	0.3	--	<0.1	--	--	--	--	--	--	--
<i>Other effluents</i>	UF1	UF2	SF1	SF2	WF1	WF2	RF1	RF2		
<i>bla</i> _{BEL-1}	--	--	--	--	2.8	--	--	0.3		
<i>bla</i> _{CARB-1}	0.8	--	<0.1	--	--	4.3	0.1	--		
<i>bla</i> _{GES-1}	--	--	--	--	--	0.6	--	--		
<i>bla</i> _{GIM-1}	--	--	--	--	--	--	--	--		
<i>bla</i> _{OXA-1}	2.0	5.6	0.1	0.2	4.0	0.6	0.1	1.4		
<i>bla</i> _{OXA-2}	3.3	4.7	0.1	6.1	3.6	2.7	0.6	2.2		
<i>bla</i> _{OXA-9}	--	--	--	--	--	--	--	--		
<i>bla</i> _{OXA-10}	4.9	9.3	0.8	0.1	4.7	4.3	6.4	9.0		
<i>bla</i> _{OXA-20}	1.3	1.0	<0.1	<0.1	1.5	--	--	--		
<i>bla</i> _{OXA-21}	--	--	--	--	--	--	--	--		
<i>bla</i> _{OXA-53}	--	2.7	--	--	--	--	--	0.3		
<i>bla</i> _{OXA-118}	--	--	--	<0.1	--	--	--	--		
<i>bla</i> _{OXA-129}	--	--	--	--	--	--	0.1	--		
<i>aadA9</i>										
<i>aadA13</i>										
<i>aadA16</i>										
<i>aadB</i>										

Supplementary Table 17: Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotides	DNA sequences (5'-3')	Integron class	Annealing region
------------------	-----------------------	----------------	------------------

CAL-1L	CGTGGGTCGATGTTTGATGTTA	MI1	5'-CS
CAL-1R	GAAGGAGTCCTCGGTGAGATTC	MI1	3'-CS
CAL-2L	GGTGACAAAACGAGCATGCT	MI2	5'-CS
CAL-2R	GATGCCATCGCAAGTACGAG	MI2	3'-CS
CAL-3L	GGTATCCGGTGTTTGGTCAG	MI3	5'-CS
CAL-3R	CGTCAAACGGGTAAGCAGTC	MI3	3'-CS

Supplementary Table 18: Conservation of CAL3 primers binding sites in MI3.

“Y” stands for the presence of the matching region and “?” indicates this region is not available so that its conservation is not known.

Accession Numbers	Conserved CAL3-L	Conserved CAL3-R
AB070224	+	+
AF416297	+	+
AY219651	+	+
D50438	+	?
DQ282196	?	?
DQ282199	?	?
DQ282200	?	?
EF467661	+	+
EF469602	+	+
FJ696404	+	+
HE616889	+	+
KF745070	+	+
KJ631731	+	+
KM194584	?	?
KT736121	+	?
KT984195	+	?
KX349207	?	?
KX946994	+	+
LC331665	+	+
LC589061	+	+
LC589062	+	+
LC589064	+	+
LN877969	+	?
LR594660	+	+
LR594665	+	+
LR594670	+	+
LR594674	+	+

MH569711	+	+
MN180807	+	+
MN340020	+	+
MT231818	+	+
MT231822	+	+
MT720902	+	+

I.2. CALYPSO Nouvelle-Aquitaine

Le travail principal de ma thèse a porté sur le projet « **CALYPSO Nouvelle-Aquitaine** », projet pour lequel mon allocation doctorale était financée par la région Nouvelle-Aquitaine et l'Inserm. Ce projet avait pour objectif principal de faire de la cassettomique sur des effluents de différents types de centres de soins de la Région Nouvelle-Aquitaine et de voir s'il existait une signature propre à chaque centre de soins ou s'il existait des similarités permettant de distinguer chaque type de centre de soins. A noter que j'ai présenté ce projet lors de communications orale en anglais en 2019, premièrement au 10^{ème} séminaire international *Water and Health* à Cannes puis aux *Journées d'animation scientifique* de la *FéRI* (*Fédération de Recherche Infectieuse*) à Joué-les-Tours la même année.

Au total, grâce à l'aide du CPIAS Nouvelle-Aquitaine, ce sont 34 établissements de soins qui ont accepté de participer à ce projet : cinq prélèvements issus des trois CHU de la région, seize hôpitaux généraux, cinq cliniques, cinq Soins de suites et réhabilitation (SSR), deux Établissements d'hébergements pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) et un centre de cure thermale. Il existe une grande variabilité des établissements de soins dans ce projet allant du plus grand hôpital de la région avec une capacité de 3070 lits (CHU Bordeaux, Gironde) à un petit hôpital de campagne de 90 lits (CH Saint-Astier, Dordogne) et un centre thermal qui ne délivre des antibiotiques qu'en de très rares exceptions.

L'analyse des « cassettones » des effluents des centres de soins de la région Nouvelle-Aquitaine a montré que le contenu en cassettes des intégrons de classe 1 et 3 était principalement constitué de gènes de résistance aux aminosides et aux β -lactamines. Certains « cassettones » de classe 1 présentaient une petite proportion des nouvelles cassettes GCLIM mais c'est essentiellement dans les « cassettones » des intégrons de classe 3 que l'on retrouvait ces nouvelles cassettes décrites lors du projet CALYPSO historique. Les « cassettones » des intégrons de classe 2 étaient quant à eux composés principalement des trois mêmes gènes : *dfrA1*, *sat2* et *aadA1* qui confèrent des résistances respectivement au

triméthoprime, à la streptothricine et à la streptomycine. Quelque soit la classe d'intégron, les « cassetomes » n'ont pas permis de distinguer les différents types de centres de soins entre eux.

Le deuxième objectif principal était de savoir s'il existait une certaine stabilité de ces « cassetomes ». Pour répondre à cette question, deux campagnes de prélèvements ont été réalisées. La première campagne a eu lieu au printemps 2019 et initialement la deuxième campagne aurait dû se faire à un an d'intervalle. Suite à la pandémie du COVID-19, la deuxième campagne a été décalée à l'automne 2020 amenant à un intervalle d'un an et demi entre les deux prélèvements. Les résultats obtenus ont montré une stabilité des « cassetomes » pour la majorité des centres de soins avec une similarité des dix cassettes prédominantes et de leurs proportions.

Les objectifs secondaires de ce projet étaient de regarder s'il existait une association entre la présence de taxons bactériens et la présence de certaines cassettes, entre la présence de deux cassettes entre elles et enfin entre la proportion relative de certaines cassettes et la consommation d'antibiotiques des centres de soins. Des corrélations de Spearman ont montré une association positive au sein des intégrons de classe 1 entre les cassettes *drfA12* et *gcuF*, qui est une association déjà connue mais également avec le gène *fosL* qui n'a jamais été décrit auparavant. D'autres corrélations précédemment décrites ont également été trouvées dans les « cassetomes » des intégrons de classe 3 avec les cassettes *gcu45*, *gcu47* et *gcu48*. En ce qui concerne la corrélation entre la consommation en antibiotiques des établissements de soins et la présence de certains gènes de résistance, la cassette *aacA4* a été retrouvée à des proportions significativement plus élevées dans les « cassetomes » des intégrons de classe 1 et 3 des établissements fortement consommateurs d'antibiotiques, que dans ceux des établissements peu ou non consommateurs d'antibiotiques, ce qui était également le cas pour le gène *bla_{OXA-10}* dans les « cassetomes » des intégrons de classe 3. Enfin, l'analyse du microbiote des effluents de centres de soins n'a montré aucune association significative avec des cassettes.

Ce travail fait l'objet d'un article dont je suis 1^{er} auteure et qui sera soumis au journal *ISME Journal*, une fois l'article CALYPSO historique accepté.

Integrans gene cassettes are stable signatures of health care facilities effluents

Lucie Laval¹, Thomas Jové¹, Nadia Gaïa³, Valentin Tilloy², Marie-Cécile Ploy¹, Jacques Schrenzel³, Vladimir Lazarevic³, Pierre Parneix⁴, Christophe Dagot¹, Olivier Barraud^{1,*}

¹ INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Université Limoges, Limoges, France

² CNR Herpesvirus, UF9481 Bioinformatics, CHU Limoges, Limoges, France

³ Genomic Research Lab and Service of Infectious Diseases, Geneva University Hospitals and University of Geneva, Geneva, Switzerland.

⁴ CPIAS Nouvelle-Aquitaine, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

*Corresponding author. Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, 2 Ave. Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France. E-mail: olivier.barraud@unilim.fr

Keywords

Hospital effluents, integrans, gene cassettes, antibiotics, antimicrobial resistance

Abstract

Since multidrug resistant (MDR) bacteria are found in the human, animal and environmental settings, we need to fight antimicrobial resistance (AMR) in a global way following the “*One Health*” approach. Effluents from urban communities and, more specifically, from hospitals can impact the environment and constitute a reservoir of MDR bacteria. The evaluation of AMR in effluents is complex and requires the use of biomarkers. Mobile integrons are bacterial genetic elements that are widely involved in the spread of AMR. Three main classes are described and they express and disseminate antibiotic resistance genes embedded within gene cassettes (GCs). In the environmental setting, several studies report that quantification of integrons is a good proxy of anthropic pollution but their GCs content (“cassettome”) is less studied.

Our laboratory has developed a novel NGS-based methodology that is able to characterize mobile integron-associated GCs from environmental samples. Here, we applied this “*cassettomics*” methodology from effluents of 34 healthcare facilities, that were sampled at two time periods and for which we evaluated their antibiotic consumption. Whatever the integron class, the cassettome, mainly composed of aminoglycosides and β -lactams resistance GCs for class 1 and class 3 integrons, did not allow us to differentiate effluents but cassettome signatures were quite stable over times for most healthcare facilities. Even if more studies are needed, the proportions of some GCs seem related to antibiotic consumption.

Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a major public health issue that needs to be tackled following a “*One Health*” approach. It is well known that many environmental matrices are the source of antibiotic resistance genes (ARG) [1–3], such as anthropic effluents. Effluents are water discharges from cities, hospitals, slaughterhouses and industries and they carry ARGs along the sewers to the municipal wastewater treatment plants (WWTP). Hospital effluents are well known to carry thousands of multidrug resistant bacteria and ARGs such as ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamases) or carbapenemases [4–7] but their contribution in the spread of antibiotic resistance remains little assessed [8].

To evaluate anthropogenic pollution and AMR dissemination in the environment and notably in hospital effluents, different markers are used, such as class 1 integrons for which quantification has been identified as a good proxy [9, 10]. Mobile integrons are bacterial genetic elements able to capture and express ARGs embedded within gene cassettes (GCs) [11]. Integrons are composed of a 5' conserved segment (5'CS) and a variable GC array. The 5'CS contains (i) an *intI* integrase gene coding for a site-specific tyrosine recombinase able to integrate or excise GCs ; (ii) an *attI* recombination site, and (iii) a Pc promoter which controls the expression of the genes embedded within the GCs. GCs are mobilizable units that constitute the variable part of integrons. More than one thousand different GCs exist and each GC array can contain up to ten GCs [12]. Genes embedded within GCs encode antibiotic resistance and other antiseptic resistance proteins but most of them encode proteins of unknown function [12–14]. Integrase amino acid sequences determine the integron class, currently five classes have been described [15], class 1 to 3 being the most common and studied ones.

Quantification of class 1 integrons is now commonly used to evaluate AMR in effluents and notably in hospital effluents where they are highly prevalent [10, 16–18] but few studies have investigated the GCs composition of integrons. Some authors [19–21] showed that GCs of class

1 integrons conferring resistance to aminoglycosides and β -lactams are the most common in WWTP and hospital effluents [22]. In a recent work, Jové *et al.* developed a novel NGS-based amplicon-sequencing methodology that is able to characterize integron-associated GCs from environmental samples [12]. Close to 600 new GCs (GCLIMs) were described from urban, hospital, slaughterhouse and WWTP effluents, which increased the number of known GCs to 1019.

Here, to go deeper in the knowledge of GCs from hospital effluents, we performed the “cassettomic” methodology applied to effluents from different healthcare facilities across the Nouvelle-Aquitaine Region, France. Our primary objectives were to determine if GCs composition could be specific from one given effluent and to assess if this cassette was stable over times. Secondary objectives were to investigate if some GCs were often associated with other GCs, to determine if some GCs were associated with some bacterial taxa, and finally, if a correlation between some GCs and antibiotic consumption was observed.

Methods

Healthcare facilities effluents

Thirty-four healthcare facilities effluents from the Nouvelle-Aquitaine Region (France) were sampled in this study (Figure S1). The name of each effluent is based on the type of healthcare facility (University hospital, n=5; general Hospital, n=16; private Clinic, n=5; Follow-up care and rehabilitation, n=5; Long term care facilities home, n=2; Thermal station, n=1). Two liters of raw effluents were sampled in a sterile glass bottle. Each effluent was sampled twice (spring 2019 and autumn 2020) at the exact same location (Table S1), samples being called a and b respectively. Weather conditions were not taken into account during the sampling campaign because it was done directly at the output of the building, independent of any rainy dilution.

The 2019 antibiotic consumption of healthcare facilities was collected thanks to the national antibiotic surveillance network ConsoRes (<https://www.consores.net/>). Healthcare facilities were categorized as high or low consumers, globally and for each antibiotics, according to their antibiotic consumptions.

Filtration and DNA extraction

Water filtration was performed until saturation directly on the site of sampling with a mobile Sentino[®] pump (Pall[™]) (Table S1) using a 0.45µm filter. The filters were kept at +4°C during transport and then stored at -80°C. The total DNA was extracted from filters using the DNeasy PowerWater Kit (Qiagen[®]) following manufacturer's instructions. An extraction with a sterile filter was also done to use it as a negative control for all the following steps.

NGS sequencing of gene cassette arrays

Except for class 2 integrons GC arrays that were only sequenced from the first sampling campaign, the GC arrays of class 1 and class 3 integrons were sequenced from the 34 effluent samples collected in 2019 and 2020, following the method described by Jové *et al.* [12]. Briefly, amplification of GC arrays was performed at least eight times per effluent to have the requested quantity of DNA required for NGS library preparation (1000 ng in 50µL). Magnetic beads Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter[™]) were used to purify the amplicons and Qubit[™] dsDNA BR Assay Kits (Invitrogen[™]) to quantify them. The NGS library preparation was performed with the AB Library builder[™] using the Ion Xpress Library kit following manufacturer's instructions. Each effluent library was identified by a specific barcode and the quality controls and quantifications were performed with Agilent Bioanalyzer 2100. Libraries were loaded onto an Ion 540[™] chip and NGS was performed using the Ion S5 technology (Ion

Torrent™, ThermoFisher®). Two chips were used for each integron class and for each sampling campaign.

Microbiota analysis

Microbiota was determined on the 34 effluents obtained during the first 2019 sampling campaign. The 16S rRNA gene was amplified from total DNA of each effluent using the Ion 16S™ Metagenomics Kit (ThermoFisher), following manufacturer's instructions. Amplicons were purified using Magnetic beads Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter™) and quantified by Qubit™ dsDNA BR Assay Kits (Invitrogen™). Libraries were built using the Ion Plus Fragment Library Kit for AB Library Builder™ System (Ion Torrent™) following manufacturer's instructions and quality controls and quantifications were performed by Agilent Bioanalyzer 2100. Libraries were loaded onto Ion 530™ chips and sequencing was performed using the Ion S5 technology (Ion Torrent™, ThermoFisher®).

Data analysis

For both GCs and microbiota, rarefaction curves were generated for each effluent sample using vegan R package v2.5-6. A raw read mapping against the 1019 known GCs was performed and the relative proportion of each GC was determined, as previously described by Jové *et al.* [12]

Alpha diversity using Shannon index and richness were determined for all samples.

Microbiota composition was determined with the EZBiocloud 16S database using the V3 variable region.

Principal Coordinate Analysis (PCoA) for GCs and microbiota were performed using PRIMERE software. The associations between two GCs and between GCs and bacterial taxa were performed using Spearman correlation with PRIMERE software. A Mann-Whitney test was used to determine link between antibiotic consumption and proportion of some GCs.

Results

Gene cassettes analysis (“cassettomes”)

Between 1.10^6 and 8.10^6 reads per effluent were obtained. Rarefaction curves showed that GCs diversity was fully captured for integron class 1 and 3 of both sampling campaign (Figure S2). The large majority of reads were mapped against the 1019 GCs with an average of 62%, 60% and 78% for class 1, class 2 and class 3 integrons respectively. Shannon indexes showed that class 1 GCs diversity was the highest followed by class 3 and class 2 (Figure S3A). Richness was also the highest for class 1 integron GCs with a mean of 187 GCs per effluent, followed by class 3 GCs with a mean of 101 GCs and class 2 GCs with a mean of 15 GCs (Figure S3B).

The 10 most frequent GCs, hereafter named “Top10”, are presented for the 34 healthcare facilities effluents, campaigns 2019 and 2020, for class 1, class 2 and class 3 integrons in Figures 1, 2 and 3, respectively. In all effluents, GCs conferring resistance to aminoglycosides followed by GCs conferring resistance to β -lactams were the most prevalent. For class 1 integrons (Figure 1), GCs conferring resistance to aminoglycosides were the most prevalent with an average of 51.6% of the Top10 of all the healthcare facilities effluents. The main genes were *aacA4*, *aadA1*, *aadA2* and *aadB*. The *aacA4* GC was the only GC present in all the 34 effluents and found in all the Top10, except for L2 effluent. This GC is an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase that confers resistance to tobramycin and amikacin. Resistance to β -lactams were the second most prevalent genes (*bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-2}*, *bla_{GES-1}*) with an average of 21.9% of the Top10 of all the healthcare facilities effluents. The third most frequent GC was *dfrB1* that confers resistance to trimethoprim, present in 13/34 effluents (average of 3.9%). Other notable GCs were present in class 1 Top10 such as GCs conferring resistance to chloramphenicol, *catB3*, *cmlA1* and notably *catB2* that represented 8.0% of the GCs of C2a effluent. Rifampicin resistance with the *arr2* GC was also present in some Top10, especially in

F2 (8.9%) and U2S1 (5.8%) effluents. GCs conferring resistance to quaternary ammonium compounds (notably *qacF*) were found in the majority of Top10 samples (30/34). It represented an average of 7.8% of total mapped GCs and up to 47.8% for F3a. Some GCLIM GCs were also present in the Top10 of three different healthcare facilities effluents. F5a and F5b had 11.2% and 6.1% of GCLIM-AR6 respectively and GCLIM-U140 was present in H1a, H1b, H8a and H8b effluents at 1.2%, 3.0%, 1.4% and 3.5% respectively. Spearman correlation (Figure S4) revealed associations between *dfrA12* and *gcuF* GCs, as well as with *fosL*. GCLIM GCs showed also positive correlation: GCLIM-AR6 with *gcu89* and GCLIM-AR23 with GCLIM-U74.

For class 2 integrons, less than 5% of all the 1019 GCs were mapped. Class 2 Top10 (Figure 2) showed a different composition with systematic presence of GCs conferring resistance to trimethoprim (*dfrA1*), streptomycin/spectinomycin (*aadA1*) and streptothricin (*sat2*) and absence of GCs conferring resistance to β -lactams. The GC diversity was low, *dfrA1*, *sat2* and *aadA1*, representing the majority of the GCs (73.50% to 99.47%). The *estX* GC was present in 25/34 healthcare facilities effluents with an average of 0.3%. Non-functional GCs were also present but in a very low proportion. Some GCLIM GCs were found in many healthcare facility effluents: GCLIM-U387 in 21/34 effluents with a low average of 0.01% and GCLIM-C36 in 19/34 effluents with an average of 0.5%. Association between *gcuE14* and both *gcuE24* and *gcuE3* were determined by Spearman correlation (Figure S4).

Like class 1 integrons, the Top10 of class 3 GCs was largely composed by GCs conferring resistance to aminoglycosides and β -lactams but some healthcare facilities effluents were composed of GCs of unknown function (Figure 3). There was less diversity in β -lactams resistances genes with mainly three GCs: *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-2}* and *bla_{GES-1}*. The *aacA4* GC was the most frequent aminoglycosides resistance GC (33/34). Only few other aminoglycosides resistance GCs were present: *aadA1* and *aadA6*. GCLIM GCs were highly represented with an

average of 19.6%. Effluent H10b exhibited the highest proportion of GCLIM GCs with 94.9% of GCs, with GCLIM-U178 alone accounting 77.8% of the whole cassette. Ammonium quaternary resistance GCs (*qac*, *smr*) were present with an average of 2.9%. The *qacF* gene was highly present in H9 effluent (5.6% in 2019 and 30.5% in 2020) but the most frequent ammonium quaternary resistance GCs were *smr2* (9/34) and *qacG* (12/34). At least one GCLIM was found in the Top10 of all effluents. Interestingly, GC *ereA* variants, *ereA1* and *ereA2* that confer resistance to macrolides, were found in high proportions in H2a (31.6%) and H2b (30.5%). High proportions of *gcu45*, *gcu46*, *gcu47* and *gcu48* were found in F1, F3, F4 and L2 effluents (19.5% to 93.7%). F1 had the highest proportion of these GCs (93.7% in 2019 and 90.8% in 2020). Spearman correlation showed also strong associations between GCs from class 3 integrons: *gcu45* and *gcu47*, *gcu45* and *gcu48*, as well as *gcu47* and *gcu48* (Figure S4).

Whatever the integron class, PCoA of GCs (Figure 4) showed a non-separate distribution between effluents whatever their origin was (university hospital, general hospital, long term care facilities home, follow-up care and rehabilitation, private clinic and thermal station). It is noteworthy that most of GCs compositions was stable between the two sampling campaigns (28/34 for class 1 GCs, 26/34 for class 3 GCs), the most prevalent GCs being present in both samples with comparable proportions. PCoA confirmed Top10 data with a comparable cassette signature of most effluents between the 2019 and 2020 sampling campaigns.

Microbiota analysis

The composition of the microbiota in healthcare facilities effluents was determined with the 2019 sampling campaign samples. In all effluents, microbiota was composed of a large variety of bacteria from different orders (Figure 5A). Microbiota of healthcare facilities effluents were comparable: they contained high levels of anaerobic bacteria with an average of 24.4% of Clostridiales and 12.4% of Bacteroidales. Enterobacterales, Pseudomonales and

Burkholderiales were also present in high proportions with 9.3%, 10.7% and 11.7% respectively. Thermal effluent T1 was the only one with Cyanobacteria in its microbiota analysis (35.8%). PCoA confirmed that thermal effluent contained a different microbiota compared to all the other healthcare facilities (Figure 5B).

Spearman correlation did not revealed significant associations between taxa and GCs.

Antibiotic consumption

Significant links between total antibiotic consumption of healthcare facilities and presence of some GCs are presented in Figure 6. Mann-Whitney test showed that class 1 integron-associated *aacA4* GC was present in higher proportions when healthcare facilities were high consumers of antibiotics ($p < 0.001$) compared to healthcare facilities that were low consumers. Same significant link was observed for class 3 integron-associated *aacA4* ($p < 0.001$) and *bla_{OXA-10}* ($p < 0.01$) GCs. On the other hand, some GCs were present in higher proportions in effluents of healthcare facilities that were low antibiotics consumers: *qacF*, *gcu89*, GCLIM-AR6, *aadA4*, *bla_{CARB-1}*, *bla_{OXA-118}*, *aadA1* and *aadA5* for class 1 integron GCs and *gcu47* for class 3 integron GCs. A statistical link between GCs and consumption of different antibiotic classes was also investigated. Only the class 3 integron-associated *aacA4* GC was present at a significant proportion in healthcare facilities that were high consumers of β -lactams ($p < 0.001$) (Figure S5A). Low users of β -lactams presented higher proportions of the class 1 integron-associated *gcu89*, GCLIM-AR6 and *aadA4* GCs and of the class 3 integron-associated *gcu47* GC ($p < 0.01$) (Figure S5A). Healthcare facilities with heavy aminoglycosides use had a higher proportion of the class 2 integron-associated *estX* GC and of the class 1 integron-associated *aacA4* GC ($p < 0.01$) (Figure S5B). In low users of aminoglycosides, class 1 integron-associated GCs GCLIM-AR6, *gcu89* and *bla_{CARB-1}* were present in higher proportions ($p < 0.01$) (Figure S5B). Heavy users of fluoroquinolones had a higher proportion of the class 1 integron-associated

aacA4 ($p < 0.001$) GC and of the class 2 integron-associated *estX* GC ($p < 0.01$) (Figure S5C). For low users of fluoroquinolones, the class 1 integron-associated *aadA5* GC was highly present ($p < 0.01$) (Figure S5C). Finally, for low users of sulfonamides, the class 1 integron-associated *bla_{CARB-1}*, GCLIM-AR6 ($p < 0.001$), *aadA13* and *aadA4* ($p < 0.01$) GCs were present in higher proportions (Figure S5D).

Discussion

This study analyzed the composition of integron-associated GCs using a NGS-based methodology from 34 effluents from different types of health care facilities distributed all over the Nouvelle-Aquitaine Region and sampled at two time points. Main results revealed first that aminoglycosides and β -lactams resistance GCs were the most prevalent and second that the cassette signatures were stable over times for most effluents.

Types and diversities of GCs were different between integrons classes. Cassettomics of class 1 integrons revealed GCs were mainly composed by aminoglycosides and β -lactams resistance GCs. The *aacA4* GC, also named *aac(6')-Ib*, was the predominant GC in all the healthcare facilities of this study except for E2 facility. This gene that encodes an aminoglycoside acetyltransferase, was previously described in hospital effluents [22–24] and is classically described from many integron-positive bacterial strains [25–27]. The *aacA4* gene confers resistance to tobramycin and amikacin, which are the only aminoglycosides delivered in French hospital with gentamicin and netilmicin [28, 29]. A significant association between *aacA4* and aminoglycoside consumption was showed but proportion of this GC was also significantly higher in healthcare facilities that are high users of β -lactams and fluoroquinolones, meaning that a co-selection may occur. Other aminoglycosides resistance GCs were present like *aadA1* and *aadA2*. They are known to be part of class 1 integrons in hospital effluents [30] and are

also very frequently described from bacterial isolates. The second main resistance was against β -lactams with predominance of *bla_{OXA}* GCs and mostly *bla_{OXA-10}*. Oxacillinases genes were also previously described in hospital effluents [31, 32]. Metallo- β -lactamases genes like *bla_{VIM}* were also present but in low proportion in our class 1 integron cassette. These genes were mainly detected from class 1 integron GCs arrays in clinical strains [33, 34] and in effluents [30, 35]. In both case, *bla_{VIM}* is often associated with the *aacA4* GC in a same GCs array. The *dfrA12* GC was also found in class 1 cassette in many healthcare facilities effluents with a positive correlation found with the non-functional *gcuF*. This is in agreement with the GC array *dfrA12-gcuF* that is already known and frequently found [13]. Class 1 integrons are known to carry both antibiotic resistance GCs and ammonium quaternary resistance GCs [36]. In this study, *qac* genes constitute an important part of the class 1 integron cassette, especially the *qacF* GC. In environmental samples, *qacE* GCs are the main *qac* GCs detected in high proportions (43% to 95%) [37, 38] but it was not the case of *qacF* GCs which are rarely present or not detected in class 1 integrons [39].

The low diversity observed for GCs of class 2 integrons was not surprising, the *IntI2* integrase being known to be mostly nonfunctional [40] and unable to integrate or excise GCs. Cassettomics of class 2 integrons reflects previous studies with presence of the 3 GCs: *dfrA1*, *sat2* and *aadA1* [40, 41]. Surprisingly, the *dfrA1* GC had the lowest proportion but many class 2 integron GC arrays harboring only *sat2* and *aadA1* have been already described [13]. Ramirez *et al* also described a singular GC array with only the *sat2* gene [42], which can also increase the proportion of this GC compared to the two others.

Like class 1 integron, class 3 integron cassettes showed important proportion of β -lactams and aminoglycosides resistance GCs with a predominance of *bla_{OXA-10}* and *aacA4* genes. Indeed, a class 3 integron called In3-6, carrying both *bla_{OXA-10}* and *aacA4* GCs was previously described from a French hospital effluent [43]. Class 3 integron GC arrays in hospital effluents

are poorly described even if Stalder *et al.* revealed the high quantities (superior to class 2 integrons) of this integron class in hospital effluents [22]. Our class 3 integron cassette reflects GC arrays previously described from strains [44–48] with notably the highly frequent *bla_{GES}* GC [49]. H2a and H2b effluents were the only ones with *ereA* GCs in the Top10 cassette. This is the first description of these GCs in class 3 integrons; it was previously described in class 1 integrons [13] and only once in a class 2 integron [50]. High proportions of *gcu45*, *gcu46*, *gcu47* and *gcu48* were found in some follow-up care and rehabilitation facilities (F1, F3 and F4) and in long-term care facilities (L2). Spearman correlation showed a positive association between these different GCs which is in total agreement with what has been previously described: these GCs of unknown function are indeed also known as *orfA*, *orfB*, *orfC-orfD* and *orfE* and have been already described in *Delftia* strains isolated from activated sludge [51]. Nonetheless, no correlation between this genus and these GCs has been detected, meaning that these GCs are not systematically associated with *Delftia* species.

To analyze the stability of healthcare effluent cassette, two sampling campaigns have been carried out. For most effluents, our study confirmed the stability of GCs, as recently described for other ARGs [17], meaning that whatever the activity within a hospital is, its cassette does not change significantly. The second sampling campaign took place during the COVID-19 crisis (autumn 2020); even if the impact of the pandemic on AMR has been reported [52], this study showed that integron cassette was not impacted for most healthcare facilities. Investigations were lead for C2 effluent that showed a complete different cassette but this clinic declared no change in the building or wastewater circuit.

In this study, link between antibiotic use and presence of some GCs was investigated. Our study revealed several GCs were significantly present at higher proportions in healthcare facilities with high antibiotic consumptions (notably aminoglycosides, β -lactams and fluoroquinolones), and that other GCs were also present at higher proportions in healthcare

facilities with low antibiotic consumption. This has to be weighted. First, antibiotic consumptions were only discriminated by a semi-quantitative scale (very high/high users versus low/very low users of antibiotics). Second, previous studies showed a correlation between antibiotic concentration and antibiotic resistance genes in hospital effluents [53] but in this study it was antibiotic consumption that was used, it does not reflect the antibiotic concentrations in effluents. Third, correlation was made on ARGs strictly carried by integrons and we know bacteria can carry many other ARGs outside the integrons, on their chromosome or on other mobile genetics elements like plasmids.

No association between bacterial taxa and GCs was retrieved meaning that GCs are not specific from one bacterial species or genus and are probably hosted by different bacterial species. We have also to keep in mind that a significant correlation can be observed only if presence of a GC is systematic within a bacterial taxa. If not all strains from a given species carry a GC, correlation is negative. Anaerobic bacteria (Clostridiales and Bacteroidales) mainly composed healthcare facilities effluent microbiota. These bacteria are found in the human gut [54] and it is well known that hospital effluents are contaminated by fecal matter [55]. Thermal station effluent microbiota was the only one clearly different. This type of healthcare facility uses thermal water to treat several types of diseases and Cyanobacteria are naturally present in several agro-ecosystems even in Antarctica [56] and they are also present in water including thermal water but in low proportion (1%) [57]. Even if the microbiota of thermal effluent is different from the other healthcare facilities effluents, the cassette of T1 effluent was not different meaning there is no specificity of a given microbiota in terms of GCs, with different taxa that can carry the same integrons.

Our study presents two main limits. First, for all integron classes, the proportion of mapped reads against the 1019 known GCs were around two thirds, meaning that many GCs remain to be described. Analysis of unmapped reads is currently ongoing and we can expect novel GCs

will be identified. Second, as it was previously notified by Jové *et al.*, this “cassettomic” approach cannot show the entire cassettome of the 3 main integron classes due to the choice of primers [12]. The reverse primers target the 3’CS regions of each integron class but integrons without 3’CS have already been described [58–61], implying the loss of these types of integrons during the GCs array amplification step. Finally, one other limitation is the fact that our data are mostly descriptive with difficult hypothesis to be emitted, notably those dealing with microbiota and antibiotic consumption, even if they provide some new reflective elements.

Conclusions

Whatever the integron class, the cassettome, mainly composed of aminoglycosides and β -lactams resistance GCs for class 1 and class 3 integrons, did not allow us to differentiate effluents but cassettome signatures were quite stable over times for most healthcare facilities. Even if more studies are needed, the proportions of some GCs seem related to antibiotic consumption.

Funding

This study has been founded by CPAM Haute-Vienne, Nouvelle-Aquitaine Region and Inserm.

Acknowledgments

We would like to thank all the general directors and managers of the hygiene units of the 34 healthcare facilities who agreed we performed effluents samplings, as well as the technicians who gave us access to the waste water networks and without who this work would not have been possible.

References

1. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; **11**: 771510.
2. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 2018; **6**.
3. Sikkema R, Koopmans M. One Health training and research activities in Western Europe. *Infect Ecol Epidemiol* 2016; **6**: 33703.
4. Blaak H, Lynch G, Italiaander R, Hamidjaja RA, Schets FM, de Roda Husman AM. Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *PLoS One* 2015; **10**: e0127752.
5. Bréchet C, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P, et al. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014; **58**: 1658–1665.
6. Harris S, Morris C, Morris D, Cormican M, Cummins E. The effect of hospital effluent on antimicrobial resistant *E. coli* within a municipal wastewater system. *Environ Sci Process Impacts* 2013; **15**: 617–622.
7. Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 2013; **91**: 96–102.
8. Hassoun-Kheir N, Stabholz Y, Kreft J-U, de la Cruz R, Romalde JL, Nesme J, et al. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Sci Total Environ* 2020; **743**: 140804.
9. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu Y-G. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J* 2015; **9**: 1269–1279.
10. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front Microbiol* 2012; **3**.

11. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989; **3**: 1669–1683.
12. Jové T, Tilloy V, Laval L, Da Silva C, Gaschet M, Guérin E, et al. Integrons gene cassettes in effluents: from integrons to “cassetomics”. 2022.
13. INTEGRALL. <http://integrall.bio.ua.pt/?>. <http://integrall.bio.ua.pt/?> Accessed 19 Apr 2022.
14. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; **33**: 757–784.
15. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4**: 608–620.
16. Amos GCA, Ploumakis S, Zhang L, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EMH. The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. *ISME J* 2018; **12**: 681–691.
17. Buelow E, Rico A, Gaschet M, Lourenço J, Kennedy SP, Wiest L, et al. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res X* 2020; **7**: 100045.
18. Rodríguez EA, Ramirez D, Balcázar JL, Jiménez JN. Metagenomic analysis of urban wastewater resistome and mobilome: A support for antimicrobial resistance surveillance in an endemic country. *Environ Pollut* 2021; **276**: 116736.
19. An X-L, Abass OK, Zhao C-X, Xu M-R, Pan T, Pu Q, et al. Nanopore sequencing analysis of integron gene cassettes in sewages and soils. *Sci Total Environ* 2022; **817**: 152766.
20. Gatica J, Tripathi V, Green S, Manaia CM, Berendonk T, Cacace D, et al. High Throughput Analysis of Integron Gene Cassettes in Wastewater Environments. *Environ Sci Technol* 2016; **50**: 11825–11836.
21. Yang Y, Zhang A-N, Che Y, Liu L, Deng Y, Zhang T. Underrepresented high diversity of class 1 integrons in the environment uncovered by PacBio sequencing using a new primer. *Sci Total Environ* 2021; **787**: 147611.

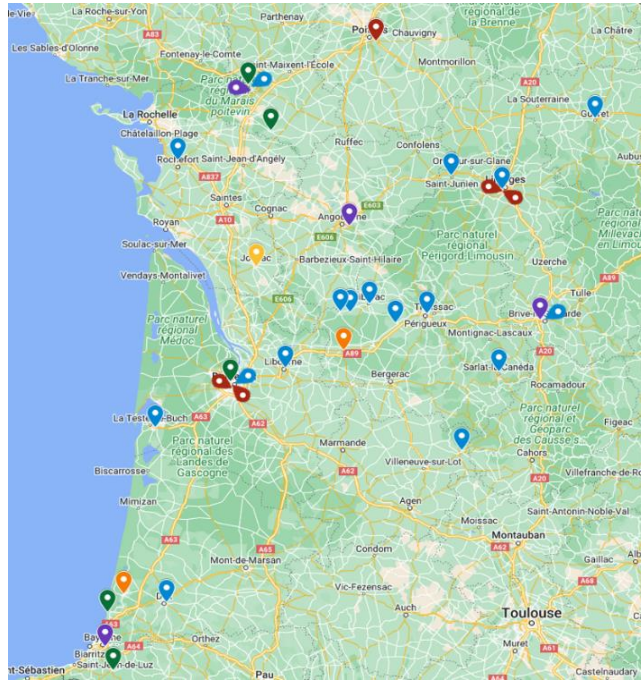
22. Stalder T, Barraud O, Jové T, Casellas M, Gaschet M, Dagot C, et al. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J* 2014; **8**: 768–777.
23. Anssour L, Messai Y, Derkaoui M, Alouache S, Estepa V, Somalo S, et al. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. *J Chemother Florence Italy* 2014; **26**: 74–79.
24. Guo X, Xia R, Han N, Xu H. Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett Appl Microbiol* 2011; **52**: 667–675.
25. Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm. *Front Microbiol* 2013; **4**: 121.
26. Pérez-Moreno MO, Estepa V, Sáenz Y, Cortell-Ortolá M, Fort-Gallifa I, Ruiz J, et al. Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(DHA-1) and qnrB4 genes within a novel complex class 1 integron. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **73**: 210–211.
27. Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 886–897.
28. Robert J, Péan Y, Alfandari S, Bru J-P, Bedos J-P, Rabaud C, et al. Application of guidelines for aminoglycosides use in French hospitals in 2013–2014. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; **36**: 1083–1090.
29. Société de Pathologie, Infectieuse de Langue Française. Mise au point sur le bon usage des aminosides administrés par voie injectable. 2011.
30. Vaz-Moreira I, Varela AR, Pereira TV, Fochat RC, Manaia CM. Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microb Drug Resist Larchmt N* 2016; **22**: 155–163.

31. Marathe NP, Berglund F, Razavi M, Pal C, Dröge J, Samant S, et al. Sewage effluent from an Indian hospital harbors novel carbapenemases and integron-borne antibiotic resistance genes. *Microbiome* 2019; **7**: 1–11.
32. Surleac M, Czobor Barbu I, Paraschiv S, Popa LI, Gheorghe I, Marutescu L, et al. Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PLoS ONE* 2020; **15**.
33. Villa J, Arana DM, Viedma E, Perez-Montarelo D, Chaves F. Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid. *Int J Med Microbiol IJMM* 2017; **307**: 340–345.
34. Villa J, Viedma E, Brañas P, Orellana MA, Otero JR, Chaves F. Multiclonal spread of VIM-1-producing *Enterobacter cloacae* isolates associated with In624 and In488 integrons located in an IncHI2 plasmid. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **43**: 451–455.
35. Pérez-Viso B, Hernández-García M, Ponce-Alonso M, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Del Campo R, et al. Characterization of carbapenemase-producing *Serratia marcescens* and whole-genome sequencing for plasmid typing in a hospital in Madrid, Spain (2016-18). *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**: 110–116.
36. Gillings MR, Xuejun D, Hardwick SA, Holley MP, Stokes HW. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J* 2009; **3**: 209–215.
37. Gaze WH, Abdousslam N, Hawkey PM, Wellington EMH. Incidence of Class 1 Integrons in a Quaternary Ammonium Compound-Polluted Environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1802–1807.
38. Rosser SJ, Young H-K. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**: 11–18.
39. Ploy MC, Courvalin P, Lambert T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2557–2563.

40. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH. IntI2 Integron Integrase in Tn7. *J Bacteriol* 2002; **184**: 1712–1721.
41. Xu Z, Li L, Shirtliff ME, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. Occurrence and Characteristics of Class 1 and 2 Integrons in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients in Southern China. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 230–234.
42. Ramírez MS, Quiroga C, Centrón D. Novel Rearrangement of a Class 2 Integron in Two Non-Epidemiologically Related Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 5179–5181.
43. Simo Tchuinte PL, Stalder T, Venditti S, Ngandjio A, Dagot C, Ploy M-C, et al. Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **48**: 431–434.
44. Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2013; **19**: E306-308.
45. Cao X, Xu X, Zhang Z, Shen H, Chen J, Zhang K. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; **13**: 16.
46. Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, et al. Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2838–2843.
47. Papagiannitsis CC, Dolejska M, Izdebski R, Dobiasova H, Studentova V, Esteves FJ, et al. Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 β -Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 5065–5068.
48. Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Bruderer T, Frei R, Nordmann P. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1594–1598.

49. Takizawa S, Soga E, Hayashi W, Sakaguchi K, Koide S, Tanabe M, et al. Genomic landscape of blaGES-5- and blaGES-24-harboring Gram-negative bacteria from hospital wastewater: emergence of class 3 integron-associated blaGES-24 genes. *J Glob Antimicrob Resist* 2022; **31**: 196–206.
50. Biskri L, Mazel D. Erythromycin esterase gene ere(A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3326–3331.
51. Xu H, Davies J, Miao V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J Bacteriol* 2007; **189**: 6276–6283.
52. Rizvi SG, Ahammad SZ. COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. *Sci Total Environ* 2022; **807**: 150873.
53. Fischer MM, Bild M. Hospital use of antibiotics as the main driver of infections with antibiotic-resistant bacteria – a reanalysis of recent data from the European Union. 2019. Microbiology.
54. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2020; **113**: 2019–2040.
55. Karkman A, Pärnänen K, Larsson DGJ. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat Commun* 2019; **10**: 80.
56. Pandey KD, Shukla SP, Shukla PN, Giri DD, Singh JS, Singh P, et al. Cyanobacteria in Antarctica: ecology, physiology and cold adaptation. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr* 2004; **50**: 575–584.
57. Zeichner J, Seite S. From Probiotic to Prebiotic Using Thermal Spring Water. *J Drugs Dermatol JDD* 2018; **17**: 657–662.
58. Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1545–1548.
59. Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J Bacteriol* 1994; **176**: 6286–6294.

60. Kholodii GYa, Mindlin S z., Bass I a., Yurieva O v., Minakhina S v., Nikiforov V g. Four genes, two ends, and a res region are involved in transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a mer operon or an integron. *Mol Microbiol* 1995; **17**: 1189–1200.
61. Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 761–768.

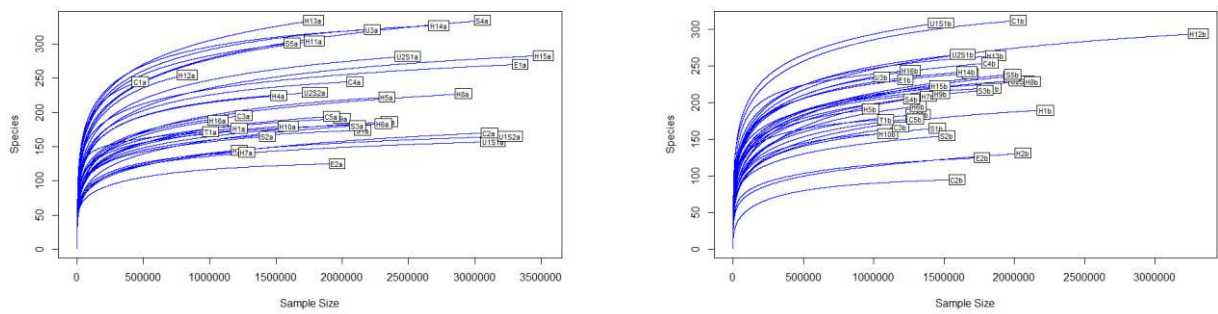


Supplementary figure 1 Geographic location of all healthcare facilities over the Nouvelle-Aquitaine Region, France (adapted from Mymaps). University hospital are shown in red, general hospital in blue, private clinics in purple, follow-up care and rehabilitation in green, long term care facilities in orange and thermal station in yellow.

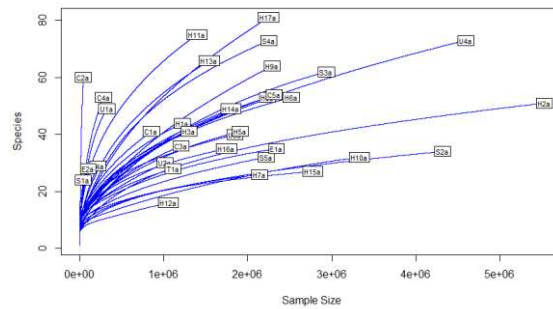
Facilities	Acronym	Filtrated volume (mL)	
		2019	2020
CHU Dupuytren 1	U1S1	120	55
CHU Dupuytren 2	U1S2	95	10
CHU Bordeaux	U2S1	50	65
Hôpital des enfants Bordeaux	U2S2	40	35
CHU Poitiers	U3	45	70
CH Libourne	H1	50	75
CH St Junien	H2	20	15
Pôle santé Arcachon	H3	110	40
CH Brive	H4	45	110
CH Gueret	H5	70	100
CH Sarlat	H6	80	80
CH Fumel	H7	80	100
CH St Astier	H8	75	70
CHICRDD Riberac	H9	25	55
CHICRDD La Meynardie	H10	45	35
CHICRDD St Aulaye	H11	50	35
CH Périgueux	H12	60	55
CH Niort	H13	50	40
CH Dax	H14	15	40
CH Rochefort	H15	45	60
CH Esquirol	H16	100	170
CMC Les cèdres Brive	C1	45	80
Polyclinique Inkermann	C2	150	200
Centre clinique Angoulême-Soyaux	C3	45	15
Clinique Tivoli Ducos Bordeaux	C4	80	65
Clinique Belharra Bayonne	C5	50	30
MDS Marie Galène Bordeaux	F1	50	15
Centre Grancher Cyrano Cambo-les-bains	F2	25	40
SSR Château de Parsay	F3	50	15
SSR Mélioris Le grand feu	F4	40	35
SSR Primerose Hossegor	F5	40	80
EHPAD Soustons	L1	40	30
EHPAD Montpon Ménestérol	L2	10	35
Thermes de Jonzac	T1	60	170

Supplementary table 1 Acronyms and filtration volume of the 34 health care facilities effluent for the 2019 and 2020 sampling campaign samples.

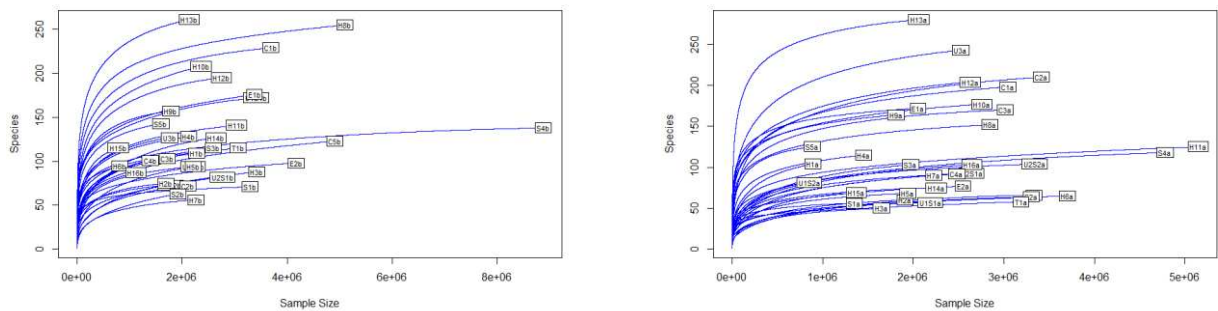
(A)



(B)

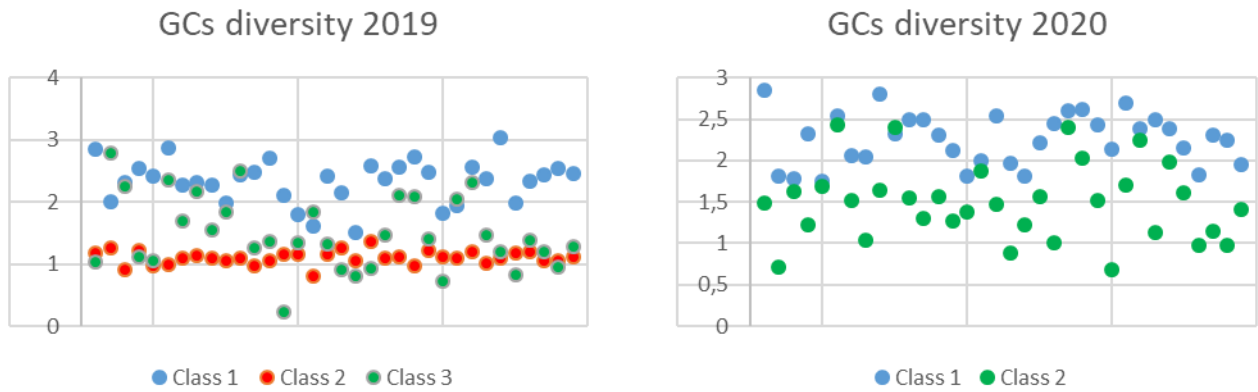


(C)

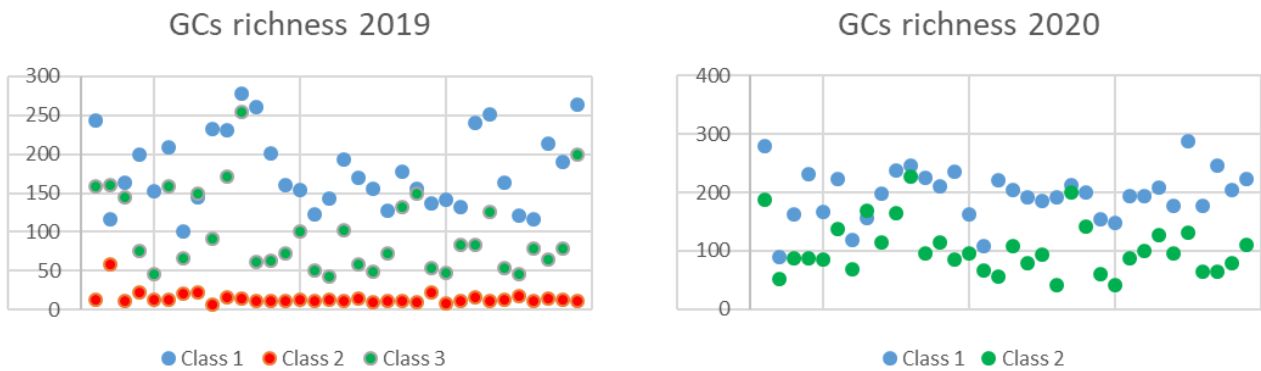


Supplementary figure 2 Rarefaction curves of gene cassettes of the 34 healthcare facilities for (A) class 1 integrons , (B) class 2 integrons and (C) class 3 integrons. The different types of healthcare facilities effluents are indicated by U for University hospital, H for Hospital, C for Clinic, F for Follow-up care and rehabilitation, L for Long term care facilities and T for Thermal station.

(A)



(B)



Supplementary figure 3 (A) Shannon diversity of gene cassettes in all 34 healthcare facilities effluents from the two sampling campaigns (B) Richness of gene cassettes in all 34 healthcare facilities effluents from the two sampling campaigns. The class 1 integrons are represented in blue, class 2 integrons in red and class 3 integrons in green.

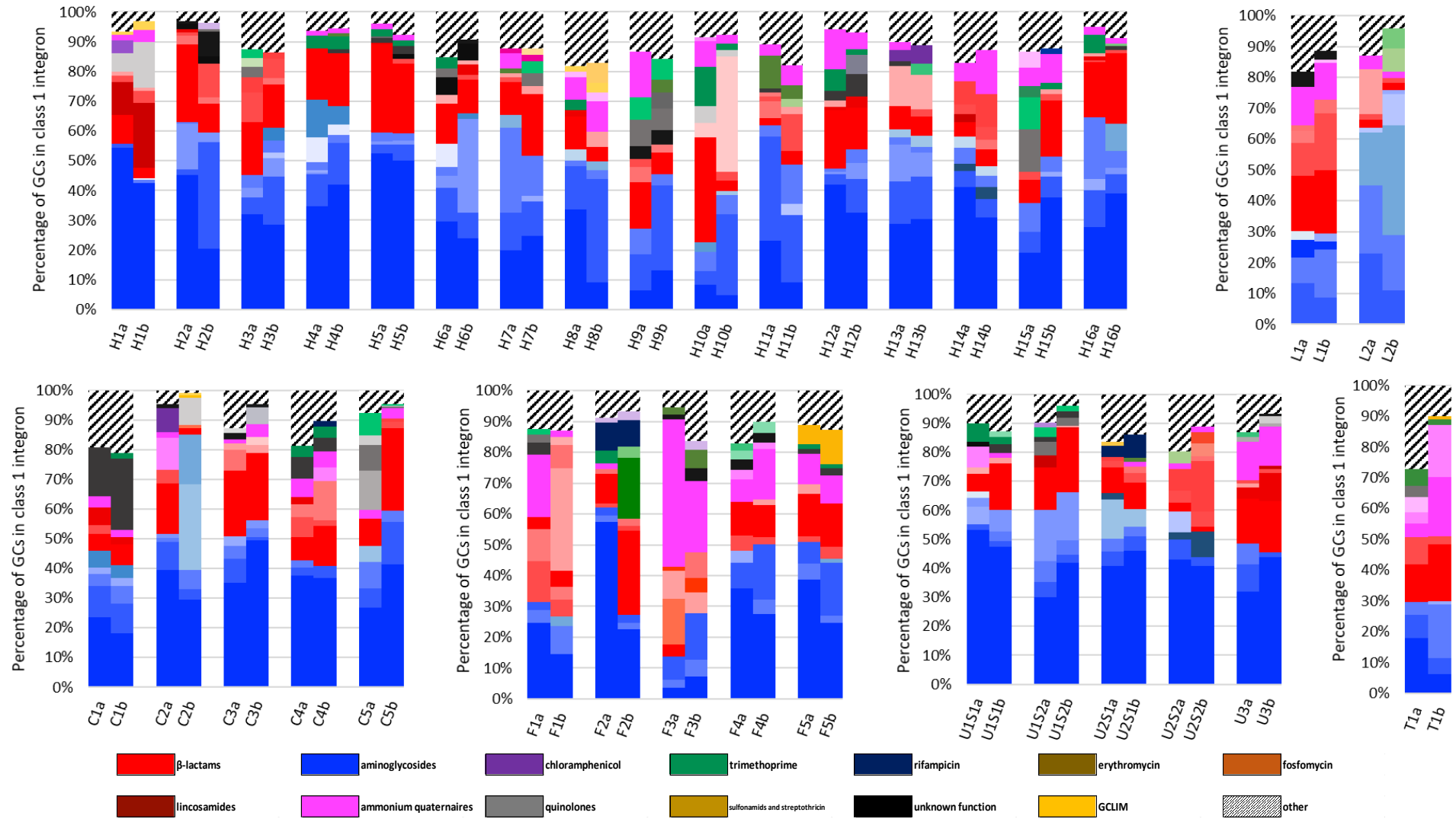


Figure 1 Relative abundance of the 10 most dominant gene cassettes (GC) of class 1 integrons in the 34 healthcare facilities effluents and the rest of the GCs are represented in black and white. Gene abundances were normalized to the average number of total reads and the GC size for each sample. Genes conferring resistance to aminoglycosides are represented by variation of blue, genes conferring resistance to β -lactams are represented by variation of red, genes conferring resistance to trimethoprim are represented by variation of green, genes conferring resistance to chloramphenicol are represented by variation of purple, genes conferring resistance to rifampicin are represented by variation of navy blue, genes conferring resistance to erythromycin are represented by variation of brown, genes conferring resistance to fosfomicin are represented by variation of orange, genes conferring resistance to lincosamides are represented by variation of burgundy, genes conferring resistance to quinolones are represented by variation of grey, genes conferring resistance to other antibiotic resistance (sulfonamids and streptothricin) are represented by variation of gold, genes conferring resistance to quaternary ammonium are represented by variation of pink, unknown function genes are represented by variation of black and new GCLIM are represented by variation of yellow. The different types of healthcare facilities effluents are indicated by U for University hospital; H for Hospital; C for Clinic; F for Follow-up care and rehabilitation; L for Long term care facilities home and T for Thermal station.



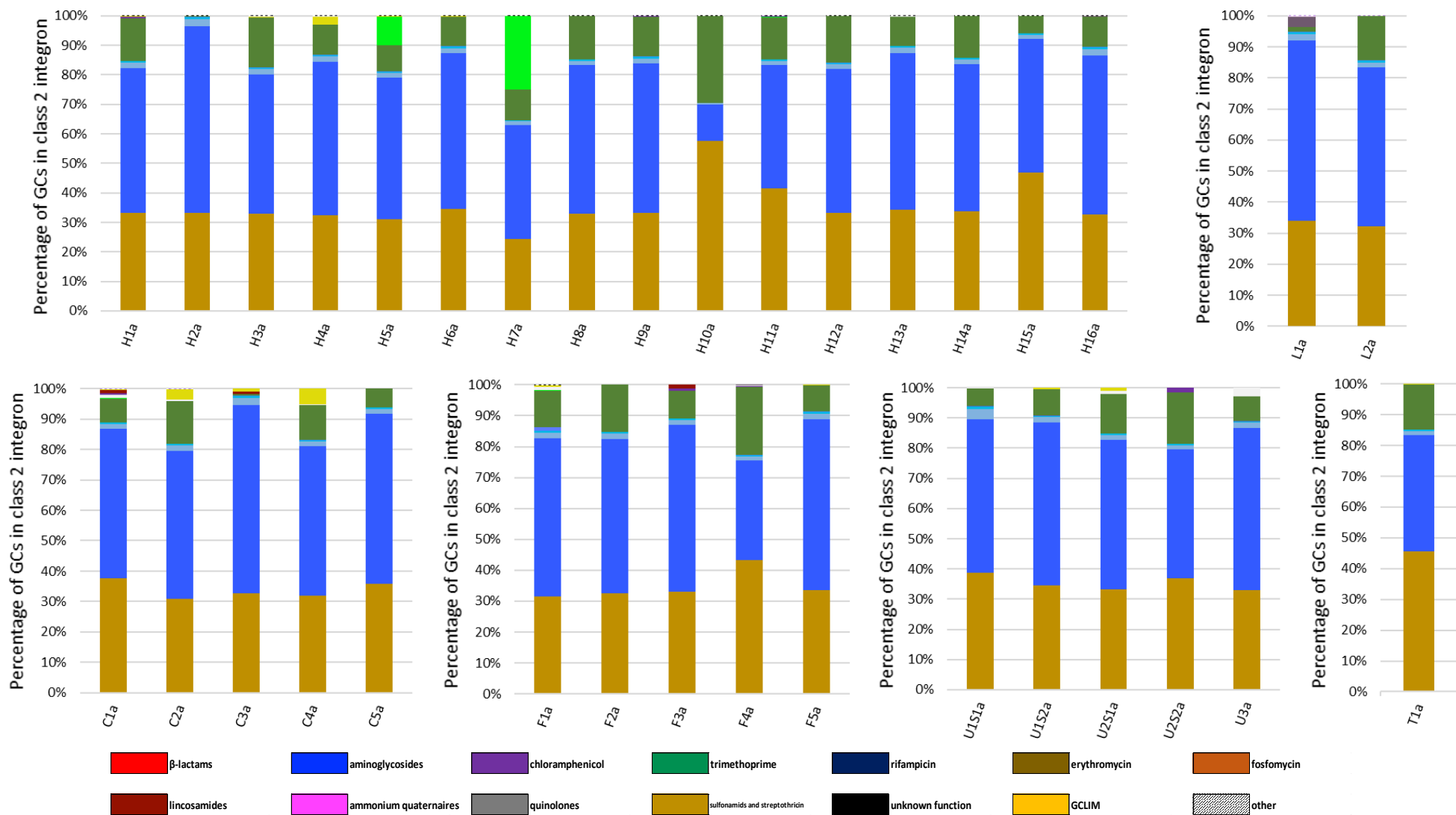


Figure 2 Relative abundance of the 10 most dominant gene cassettes (GC) of class 2 integrons in the 34 healthcare facilities effluents and the rest of the GCs are represented in black and white. Gene abundances were normalized to the average number of total reads and the GC size for each sample. Genes conferring resistance to aminoglycosides are represented by variation of blue, genes conferring resistance to β -lactams are represented by variation of red, genes conferring resistance to trimethoprim are represented by variation of green, genes conferring resistance to chloramphenicol are represented by variation of purple, genes conferring resistance to rifampicin are represented by variation of navy blue, genes conferring resistance to erythromycin are represented by variation of brown, genes conferring resistance to fosfomycin are represented by variation of orange, genes conferring resistance to lincosamides are represented by variation of burgundy, genes conferring resistance to quinolones are represented by variation of grey, genes conferring resistance to other antibiotic resistance (sulfonamids and streptothricin) are represented by variation of gold, genes conferring resistance to quaternary ammonium are represented by variation of pink, unknown function genes are represented by variation of black and new GCLIM are represented by variation of yellow. The different types of healthcare facilities effluents are indicated by U for University hospital; H for Hospital; C for Clinic; F for Follow-up care and rehabilitation; L for Long term care facilities home and T for Thermal station.



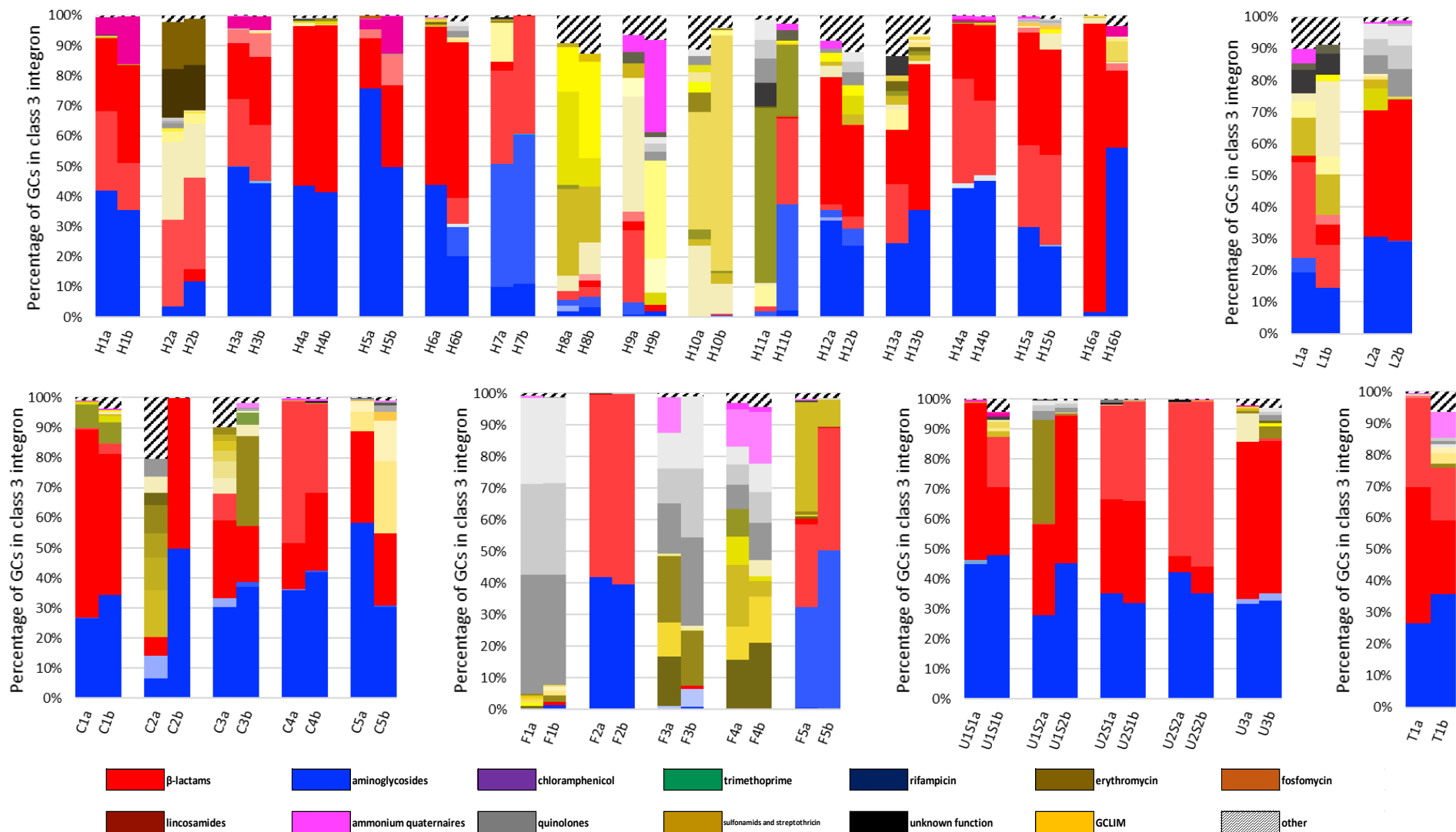


Figure 3 Relative abundance of the 10 most dominant gene cassettes (GC) of class 3 integrons in the 34 healthcare facilities effluents and the rest of the GCs are represented in black and white. Gene abundances were normalized to the average number of total reads and the GC size for each sample. Genes conferring resistance to aminoglycosides are represented by variation of blue, genes conferring resistance to β -lactams are represented by variation of red, genes conferring resistance to trimethoprim are represented by variation of green, genes conferring resistance to chloramphenicol are represented by variation of purple, genes conferring resistance to rifampicin are represented by variation of navy blue, genes conferring resistance to erythromycin are represented by variation of brown, genes conferring resistance to fosfomycin are represented by variation of orange, genes conferring resistance to lincosamides are represented by variation of burgundy, genes conferring resistance to quinolones are represented by variation of grey, genes conferring resistance to other antibiotic resistance (sulfonamids and streptothricin) are represented by variation of gold, genes conferring resistance to quaternary ammonium are represented by variation of pink, unknown function genes are represented by variation of black and new GCLIM are represented by variation of yellow. The different types of healthcare facilities effluents are indicated by U for University hospital; H for general Hospital; C for private Clinic; F for Follow-up care and rehabilitation; L for Long term care facilities home and T for Thermal station.



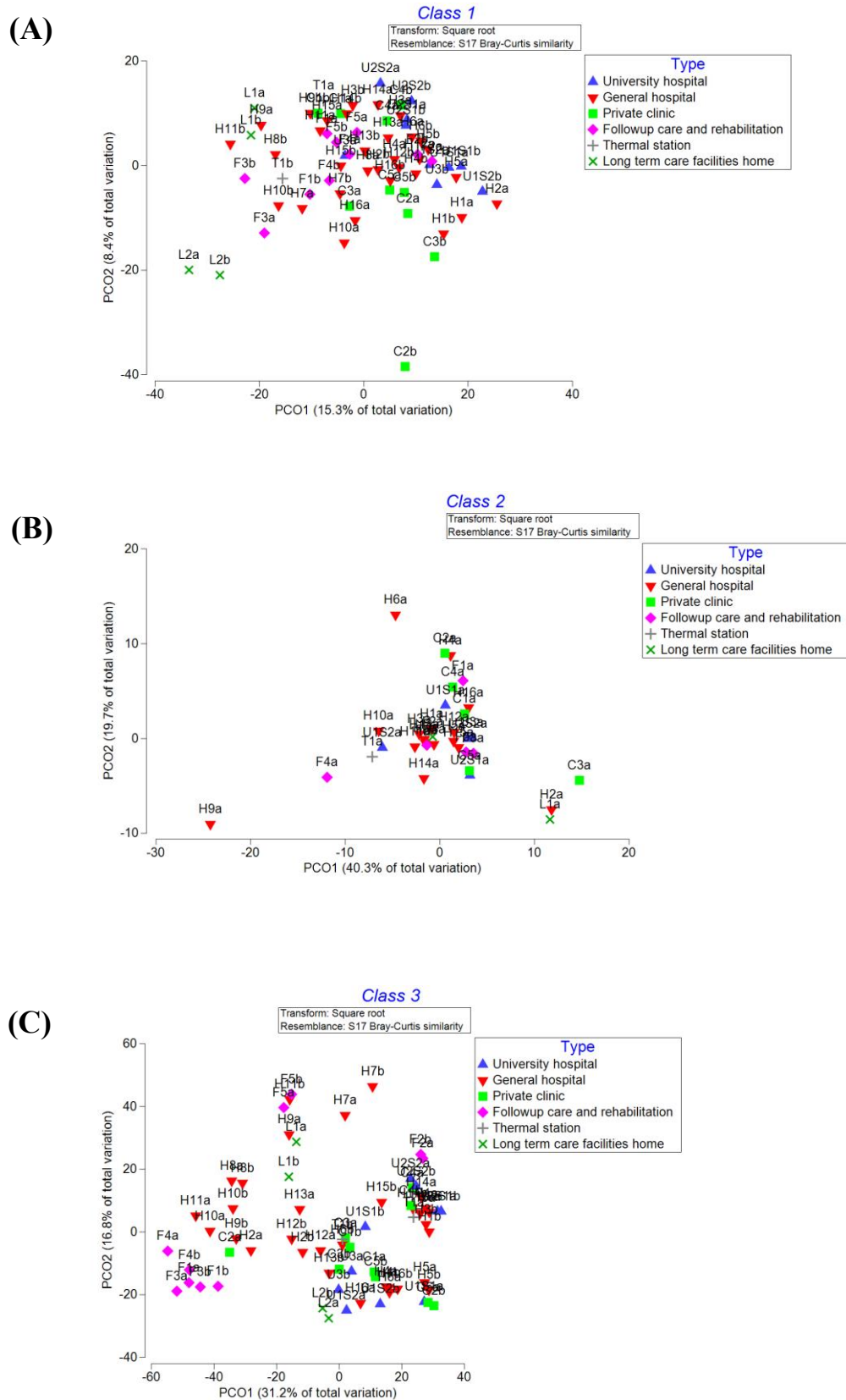
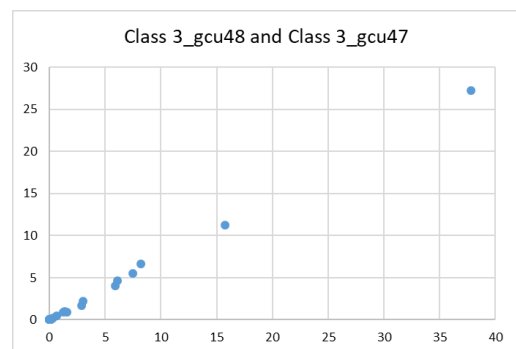
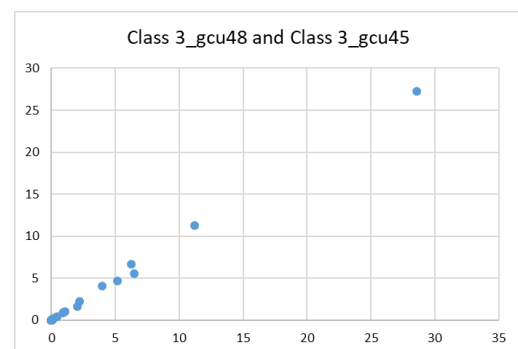
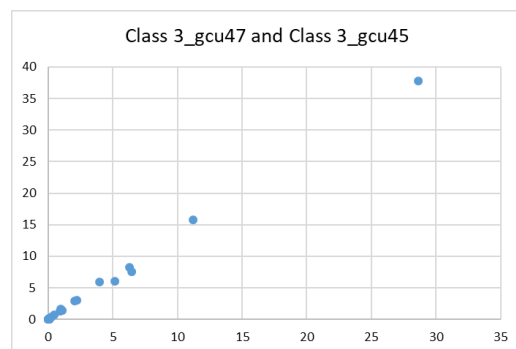
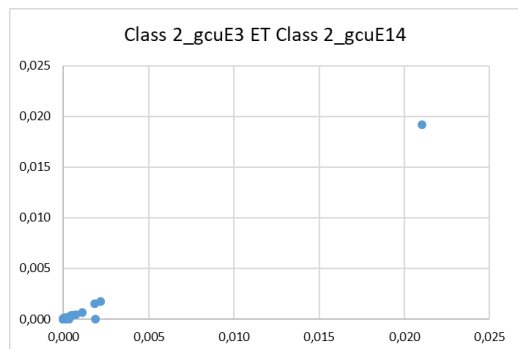
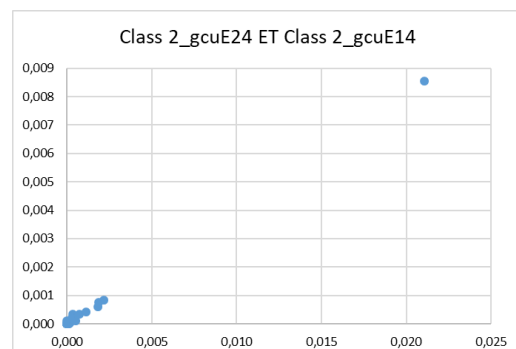
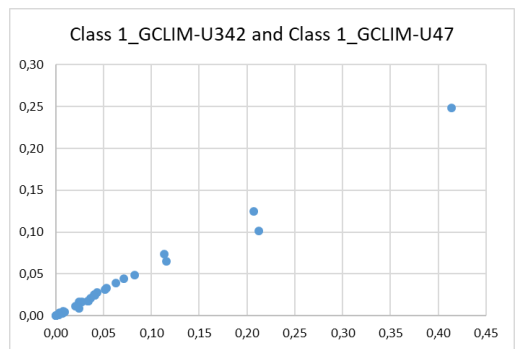
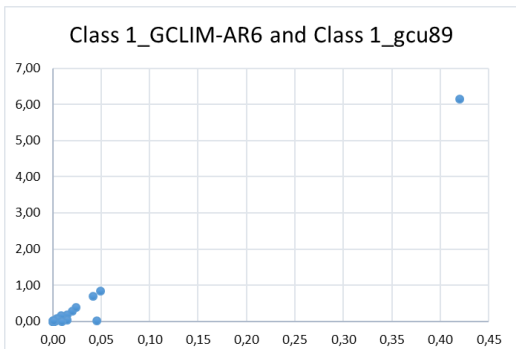
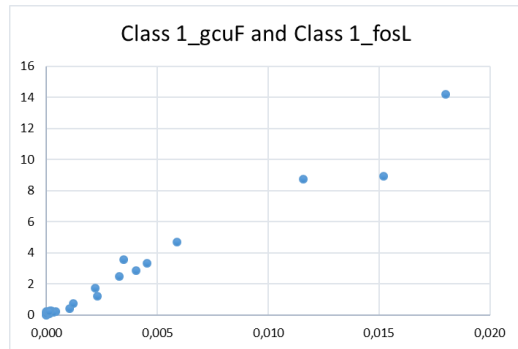
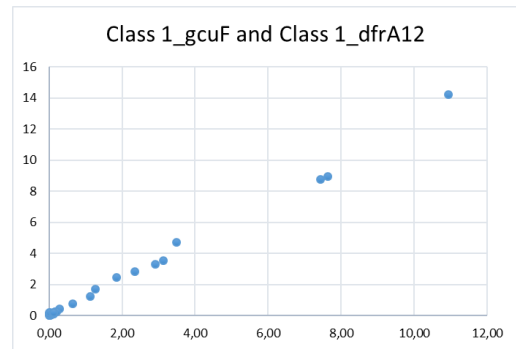
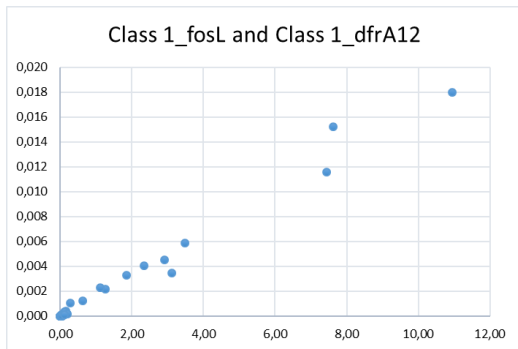


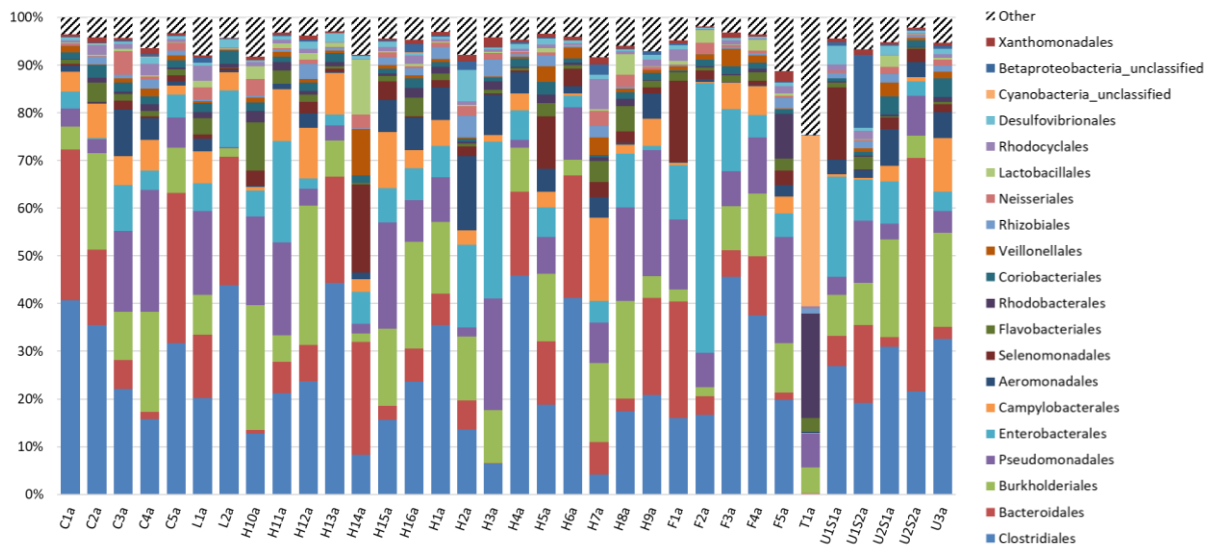
Figure 4 Principal coordinates analysis (PCoA) of cassetteome of (A) class 1 integrons, (B) class 2 integrons and (C) class 3 integrons of the 34 healthcare facilities effluents and for the 2 sampling campaigns. The distance between different points depicts the differences in cassetteomes. The different types of healthcare facilities effluents are indicated by U for University hospital (blue triangle) ; H for Hospital (red triangle) ; C for Clinic (green square) ; F for Follow-up care and rehabilitation (pink square) ; L for Long term care facilities home (green cross) and T for Thermal station (grey cross). A: effluents sampled in 2019; b: effluents sampled in 2020.





Supplementary table 2 Significant Spearman correlations between GCs.

(A)



(B)

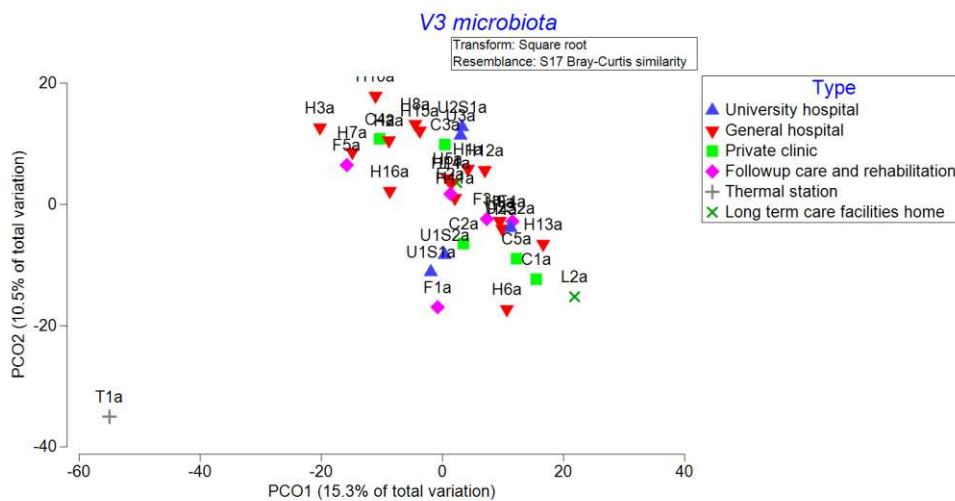


Figure 5 Microbiota composition of healthcare facilities effluents. **(A)** Relative abundance of bacteria at the order level in the 34 healthcare facilities as detected by 16S rRNA sequencing using Ion Torrent technology. The 20 most abundant bacteria at the order level for all samples are shown and the “others” represents percentage of the remaining taxa. **(B)** Principal coordinates analysis (PCoA) of microbiota composition for all the 34 healthcare facilities samples. The different types of healthcare facilities effluents are indicated by U for University hospital (blue triangle); H for Hospital (red triangle); C for Clinic (green square); F for Follow-up care and rehabilitation (pink square); L for Long term care facilities home (green cross) and T for Thermal station (grey cross).

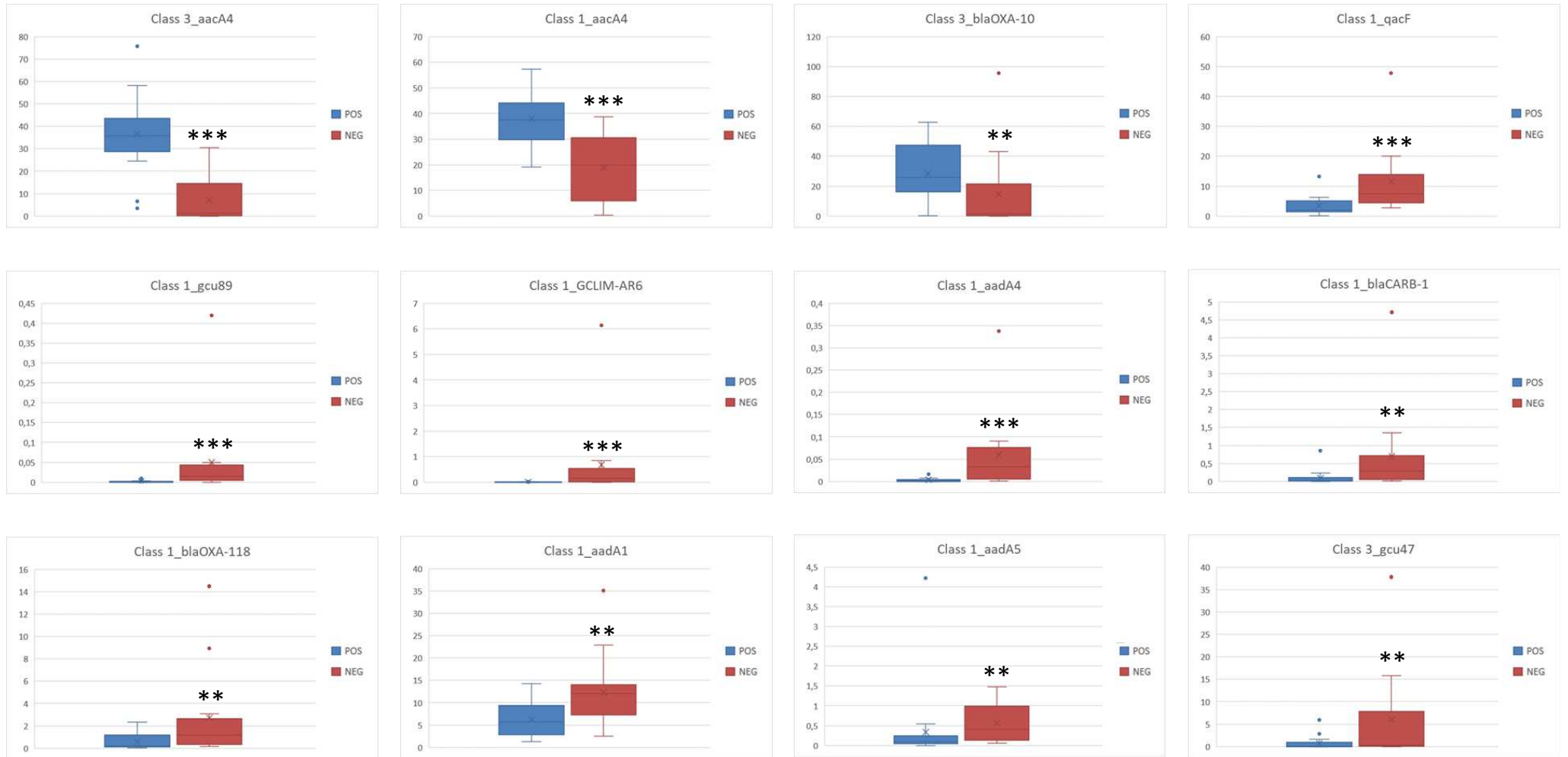
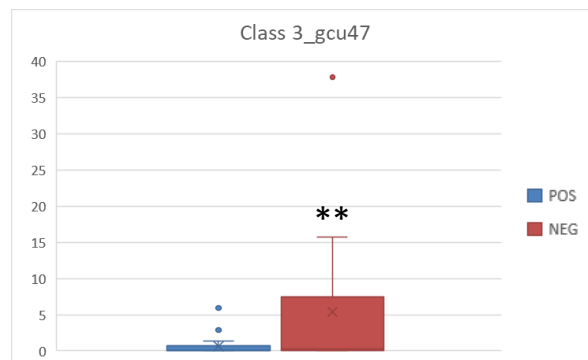
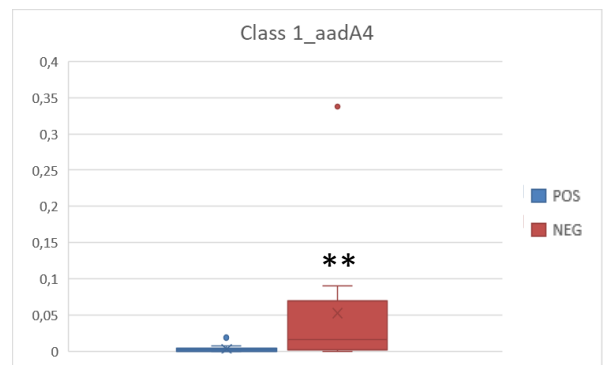
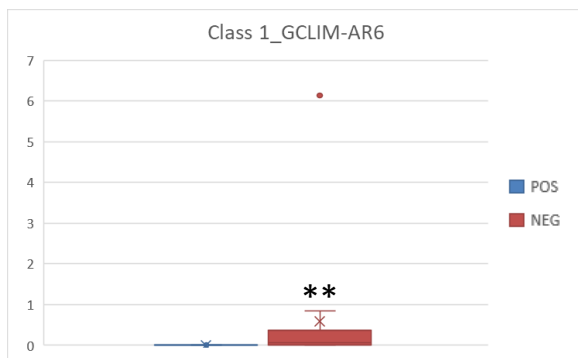
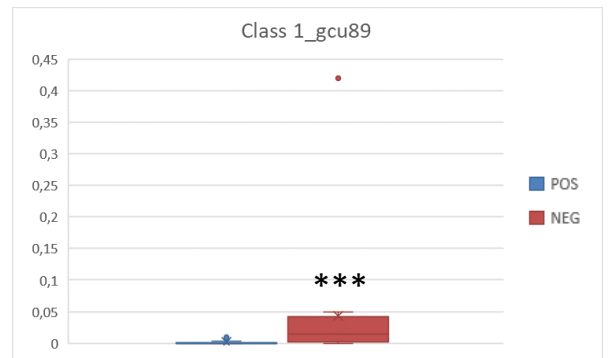
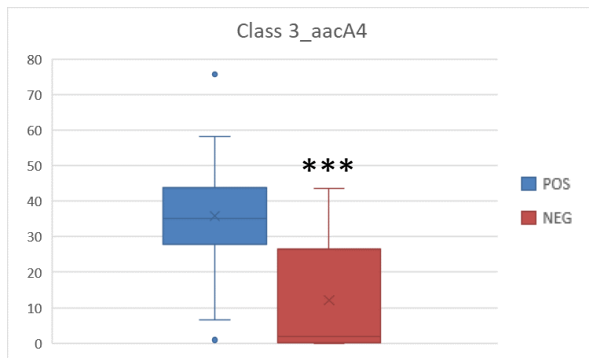


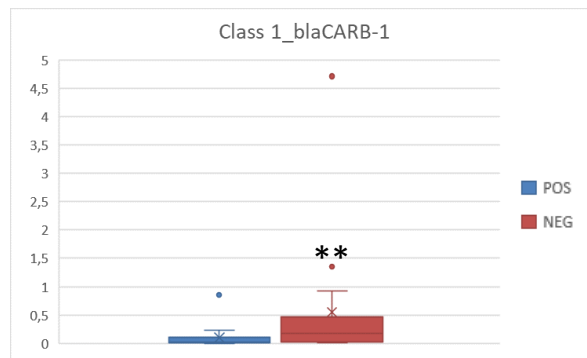
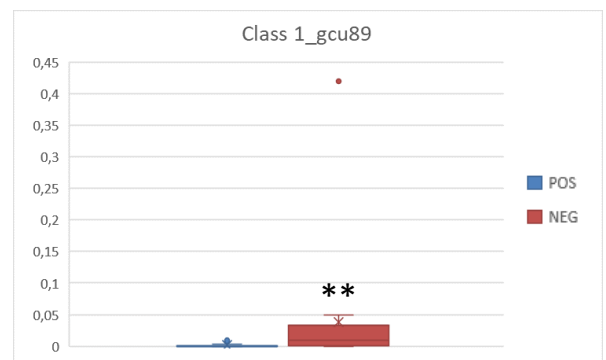
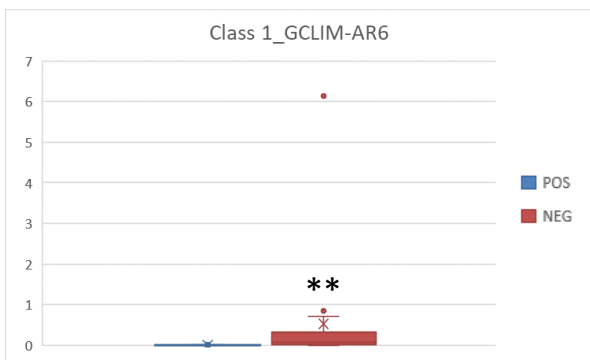
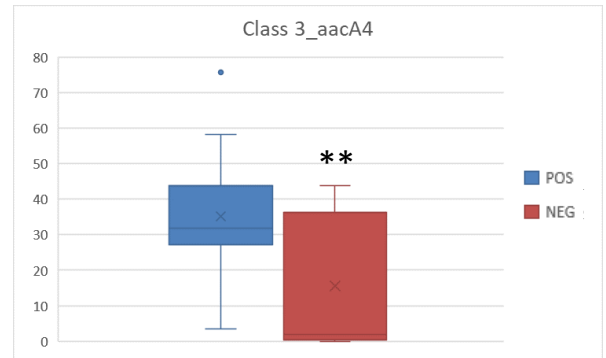
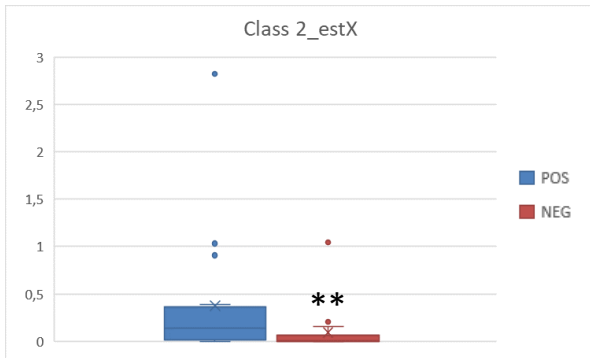
Figure 6 Correlation between total antibiotic consumption and GCs.
Mann-Whitney test was performed ** p-value <0,01 statistically significant *** p-value <0,001 statistically highly significant
POS: healthcare facilities highly users of antibiotics and NEG: healthcare facilities not or only slightly users of antibiotics



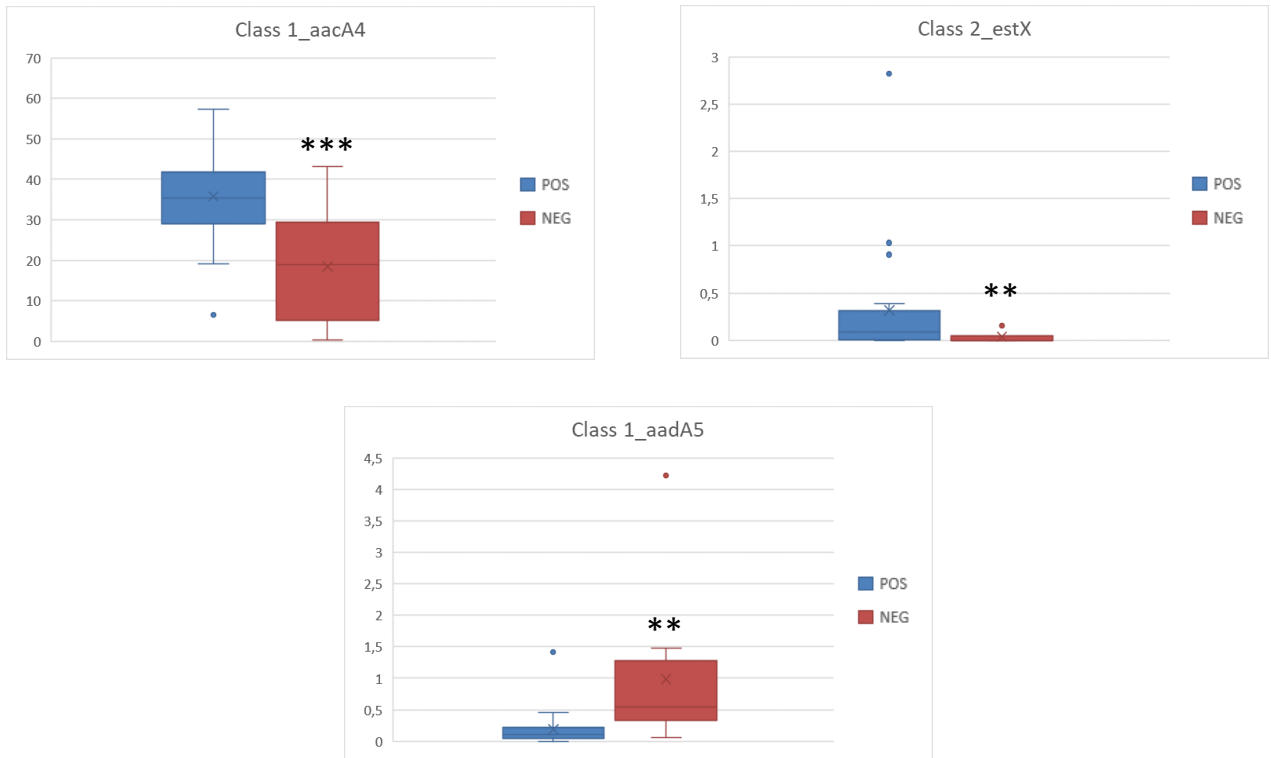
(A)



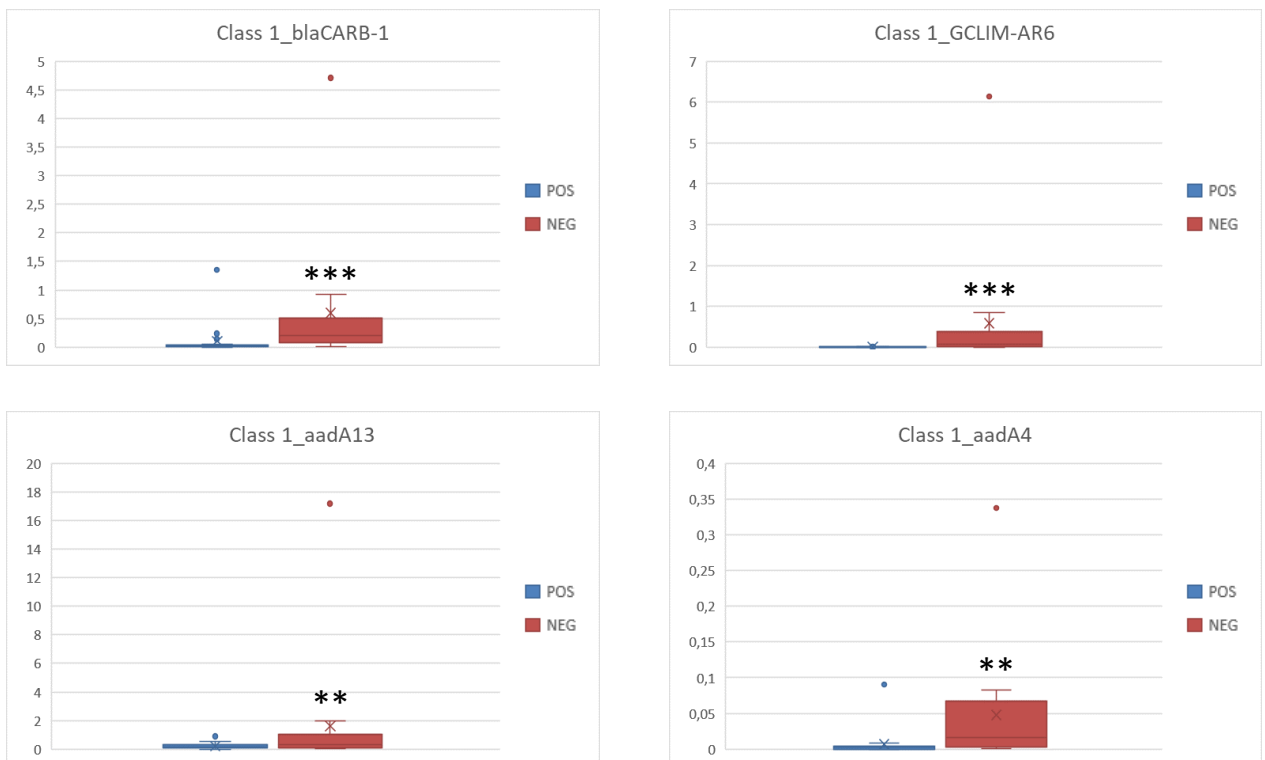
(B)



(C)



(D)



Supplementary figure 5 (A) Correlation between β -lactams consumption and GCs ; **(B)** correlation between aminoglycosides consumption and GCs ; **(C)** correlation between fluoroquinolones consumption and GCs and **(D)** correlation between sulfonamides consumption and GCs.

Mann-Whitney test was performed ** p-value <0,01 statistically significant *** p-value <0,001 statistically highly significant
POS: healthcare facilities highly users of antibiotics and NEG: healthcare facilities not or only slightly users of antibiotics

I.3. ROSETA

A ce jour, très peu de travaux se sont intéressés au contenu en cassettes d'intégrons dans les effluents d'abattoirs (Lopes et al., 2016; Moura et al., 2007; Um et al., 2016), qui à l'image des effluents hospitaliers et urbains, sont souvent déversés dans les STEU municipales et participent également à la dissémination des résistances dans l'environnement. Les animaux qui y sont abattus ont pu bénéficier durant leur vie de traitements antibiotiques divers et différents des antibiothérapies administrées chez l'homme et il est probable que les cassettes retrouvées dans ces effluents soient de nature différente de celles retrouvées dans les effluents hospitaliers. Le projet CALYPSO historique a investigué ceci mais seulement pour deux effluents issus d'abattoirs, montrant une différence certaine du contenu en cassettes entre les effluents hospitaliers et d'abattoirs pour les intégrons de classe 1.

Le projet « **ROSETA** » (Recherche de cassettes d'intégrons Spécifiques des Effluents d'Abattoirs), soutenu financièrement par le plan EcoAntibio2, avait pour but de séquencer l'entièreté des réseaux de cassettes des intégrons de classe 1, 2 et 3 présents dans les effluents de plusieurs abattoirs. La même méthodologie utilisée sur les effluents de centres de soins avec le projet CALYPSO Nouvelle-Aquitaine a été appliquée sur les effluents d'abattoirs. Les parties matériels et méthodes et résultats sont ici présentés en français. Une partie de ce travail a été valorisée à travers un poster présenté à l'*Annual scientific meeting 2021 du One Health European Joint Programme*, poster pour lequel je suis en 2^e auteure (**Annexe 1**).

I.3.1. Matériels et méthodes

I.3.1.1. Participants au projet ROSETA

Quatre abattoirs et un centre de découpe en gros ont été prélevés pour participer au projet. Deux effluents d'abattoirs issus du projet CALYPSO historique ont également été intégrés à cette étude. Pour des raisons de confidentialité, ni leurs noms, ni leurs situations

géographiques ne seront dévoilés. Les acronymes qui leur ont été attribués ainsi que le type d'activité se trouvent dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 Participants au projet ROSETA

Nom	Animaux	Type établissement	Date prélèvement	Vol filtré (mL)
A1	ND	Découpe en gros	13/03/2020	30
A2	Bovins	Abattoir	14/05/2020	40
A3	ND	Découpe en gros	25/09/2020	25
A4	Ovins - caprins – bovins	Abattoir	20/11/2020	6
A5	Ovins	Abattoir	23/11/2020	6
A6	Bovins	Abattoir	11/12/2020	8
A7	Veaux	Abattoir	05/2011	NR
A8	Bovins	Abattoir	05/2011	NR

ND : non déterminé

NR : non renseigné

L'abattage est le fait de mettre à mort un animal, un abattoir est donc par définition le lieu de mise à mort des animaux. Un centre de découpe en gros est quant à lui un établissement recevant des animaux déjà morts pour en extraire la viande (activité également réalisée au sein des abattoirs). Dans les deux cas, les eaux usées qui sortent de ces établissements sont contaminées par les bactéries commensales et/ou pathogènes présentes chez les animaux.

I.3.1.2. Campagne de prélèvements

Contrairement à l'analyse des effluents de centre de soins, une seule campagne de prélèvement a été réalisée au cours de l'année 2020 (**Tableau 3**).

A noter que deux prélèvements réalisés à plusieurs mois d'intervalle proviennent du même centre de découpe en gros (A1 et A3). L'activité très changeante au sein de ce centre de découpe en gros (ce ne sont pas les mêmes animaux qui y sont amenés pour y être découpés) nous permet d'avoir deux points de prélèvements considérés comme différents.

Au total, en incluant les abattoirs A7 et A8 issus du projet CALYPSO historique, nous considérons que nous avons huit prélèvements différents pour les effluents d'abattoirs.

I.3.1.2.1. Prélèvements

Les prélèvements d'eaux usées d'abattoirs ont été réalisés par des techniciens des différents centres d'abattages. En effet, les réglementations très strictes dans ce type d'établissement ne nous ont pas permis d'effectuer le prélèvement par nous-même. Grâce à l'intermédiaire de deux vétérinaires, nous avons reçu directement au laboratoire l'eau conditionnée dans des bouteilles stériles de 2L et conservée à +4°C à l'aide de pains de glace.

I.3.1.2.2. Filtration

La filtration des eaux usées a été réalisée au sein de notre laboratoire dès la réception des bouteilles à l'aide d'une rampe de filtration (Sartorius®). Elle a l'avantage de permettre l'utilisation de trois filtres en même temps, ce qui est un gain de temps comparé à la pompe mobile utilisée lors des déplacements dans les centres de soins qui permet uniquement d'utiliser un seul filtre à chaque fois. Des entonnoirs stériles Microsart® Filtration Funnel (Sartorius™) contenant des filtres de 0,45 µm de porosité ont été utilisés avec cette rampe de filtration.

Les filtrations ont été réalisées en sextuple et les volumes de chaque filtration sont renseignés dans le **Tableau 3**. L'ensemble des filtres a été conservé au sein du laboratoire à -80°C.

I.3.1.3. Biologie moléculaire

I.3.1.3.1. Recherche des cassettes d'intégrons

L'extraction d'ADN total, l'amplification des réseaux de cassettes des trois classes d'intégrons ainsi que le séquençage de ces régions variables ont été réalisés selon le même

protocole appliqué avec les effluents hospitaliers (I.2 CALYPSO Nouvelle-Aquitaine page 173).

Les librairies issues des amplicons des trois classes d'intégrons ont été chargées dans la même puce de séquençage en plus des témoins négatifs. Les « cassettes » étudiés pour les huit effluents d'abattoirs ont été comparés avec les « cassettes » des trente-quatre effluents de centres de soins (CALYPSO Nouvelle-Aquitaine) par une analyse en coordonnées principales (PCoA) afin de voir si les « cassettes » étaient similaires ou éloignés entre eux.

I.3.1.3.2. Analyse du microbiote

Le microbiote des effluents d'abattoirs a été également investigué. Les mêmes techniques d'amplification et de séquençage des régions variables du gène codant l'ARNr 16S ont été réalisées (I.2 CALYPSO Nouvelle-Aquitaine page 173). Une analyse PCoA a été réalisée afin de comparer la composition du microbiote des effluents d'abattoirs et des effluents d'établissements de soins.

Les 24 librairies (huit librairies pour chaque classe d'intégrons) correspondant aux différents abattoirs ont été chargées sur la même puce de séquençage avec un témoin négatif.

I.3.2. Résultats

I.3.2.1. Analyse des cassettes des effluents d'abattoirs

I.3.2.1.1. Analyse des cassettes associées aux intégrons de classe 1

Les signatures des effluents d'abattoirs présentaient un profil comparable entre eux avec une prédominance nette de cassettes impliquées dans la résistance aux aminosides de type streptomycine-spectinomycine (*aadA1*, *aadA2*, *aadA9*) entre 71,7 et 91,8% (**Figure 25**).

La cassette la plus prévalente se trouvait être *aadA1* qui confère une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine. C'est une cassette qui est très souvent retrouvée, que ce soit chez l'Homme, chez l'animal ou dans l'environnement. Les gènes de résistance aux β -lactamines étaient peu présents avec en moyenne seulement 2,3% des cassettes constituant le Top10 contre en moyenne 21,2% pour les effluents hospitaliers. De plus, seulement trois gènes de résistance aux β -lactamines (*bla_{OXA-1}* ; *bla_{OXA-10}* et *bla_{OXA-2}*) étaient présents dans les Top10 de près de la moitié (5/8) des effluents d'abattoirs (A1, A3, A5, A7 et A8). Des cassettes GCLIM ont été retrouvées dans le Top10 de deux abattoirs : GCLIM-C6 (3,5%), GCLIM-U51 (1,3%) et GCLIM-C114 (0,8%) pour l'établissement A1 et GCLIM-C6 (1,8%) et GCLIM-U51 (1,4) pour l'établissement A3.

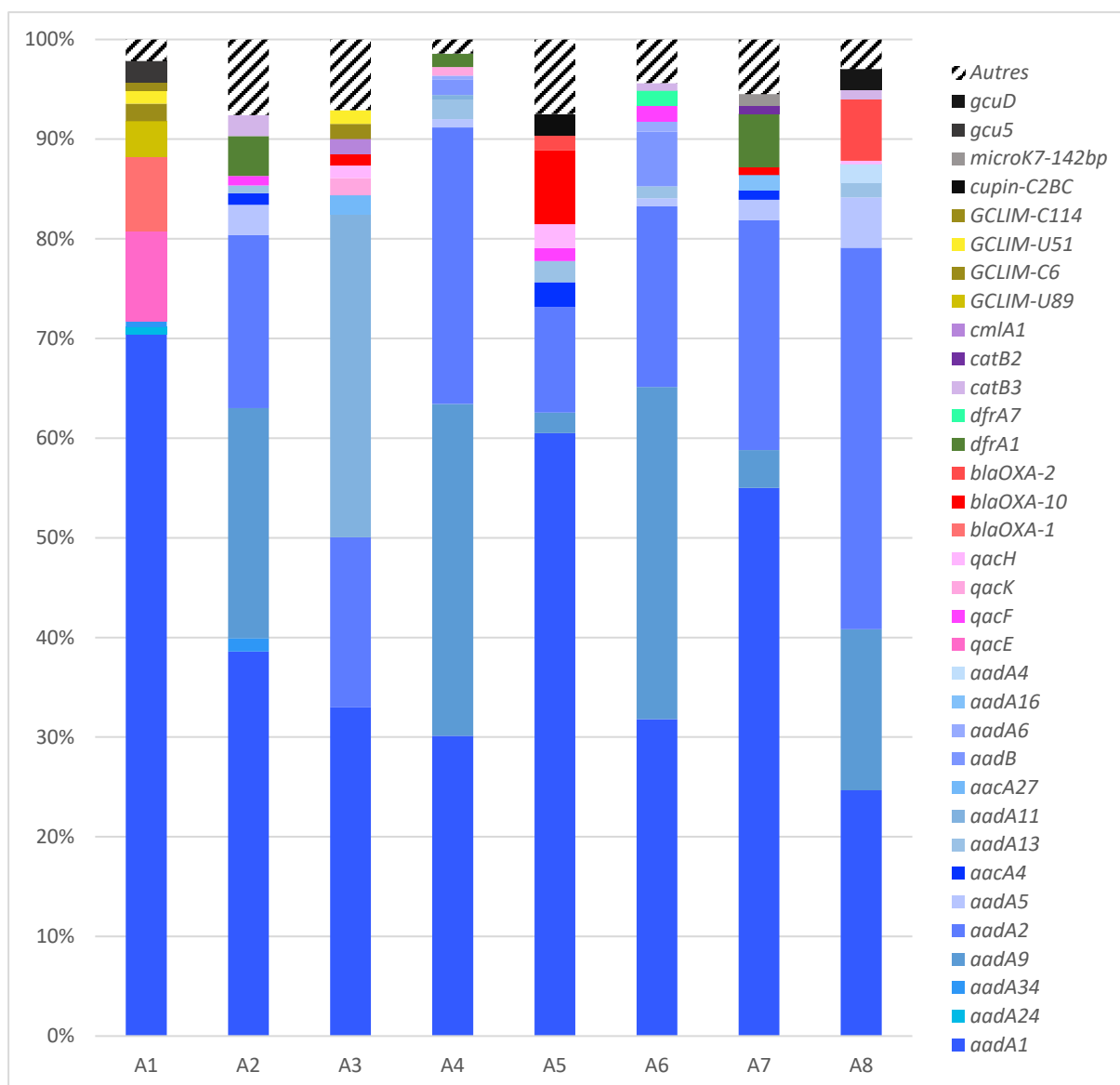


Figure 25 Principales cassettes des intégrons de classe 1 présentes dans les effluents d'abattoirs

Graphique représentant le Top10 des cassettes présentes au sein des intégrons de classe 1. Les cassettes en bleu confèrent une résistance aux aminosides, celles en rose aux ammoniums quaternaires, celles en rouge aux β -lactamines, celles en vert au triméthoprime, celles en violet au chloramphénicol, celles en jaune sont les nouvelles GCLIM et en noir ce sont les cassettes de fonctions inconnues. Les autres cassettes sont représentées en hachuré noir et blanc.

I.3.2.1.2. Analyse des cassettes associées aux intégrons de classe 2 classe 2

A l'image des effluents de centres de soins, les cassettes des intégrons de classe 2 étaient très similaires avec les trois cassettes *dfrA1*, *sat2* et *aadA1* majoritaires retrouvées dans tous les effluents d'abattoirs (6/6) (**Figure 26**).

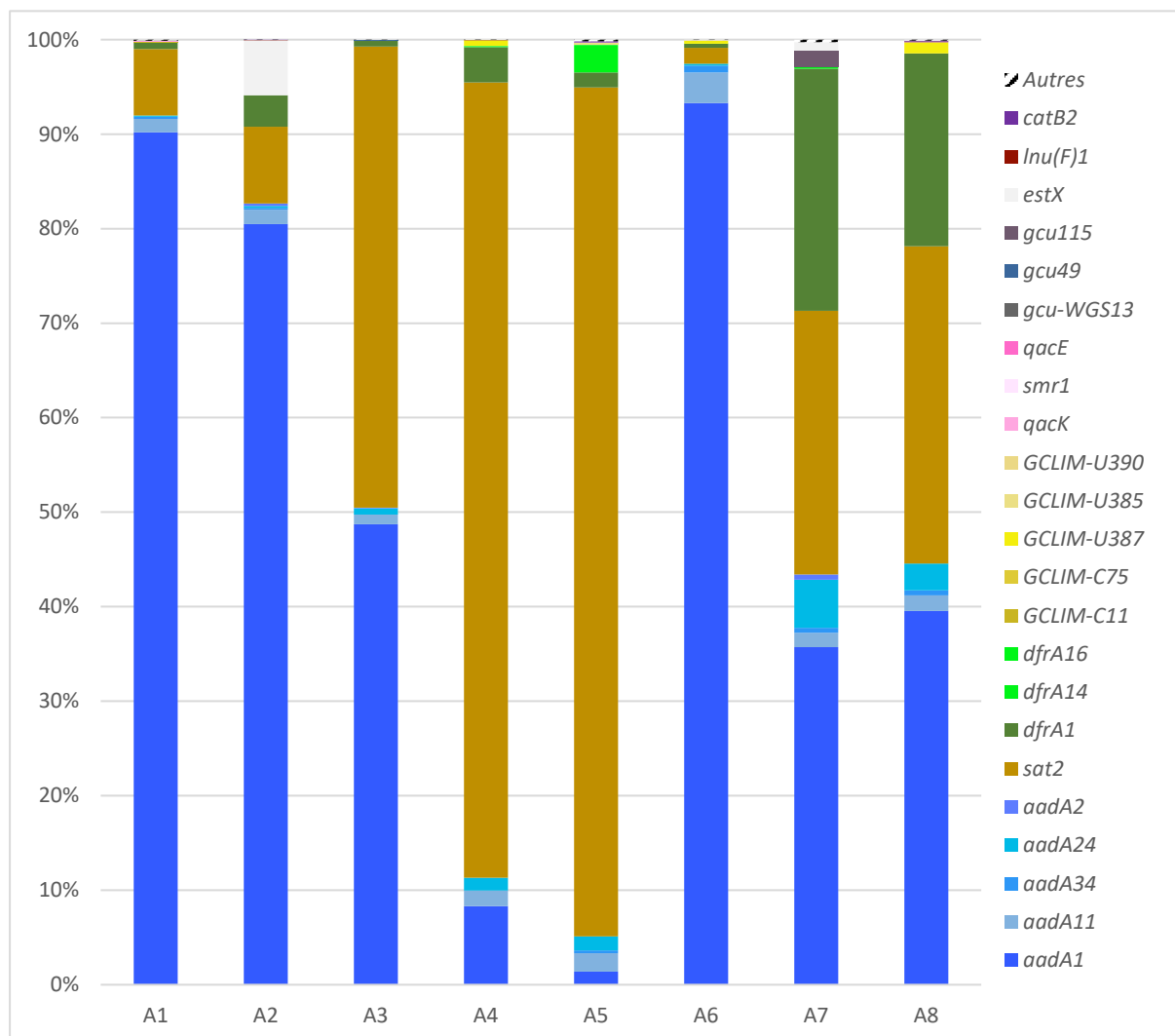


Figure 26 Principales cassettes des intégrons de classe 2 présentes dans les effluents d'abattoirs

Graphique représentant le Top10 des cassettes associées aux intégrons de classe 2 des effluents d'abattoirs.

Les cassettes en bleu confèrent une résistance aux aminosides, celles en doré à la streptothricine, celles en vert au triméthoprime, celles en rose aux ammoniums quaternaires, celles en bordeaux aux lincosamides, celles en violet au chloramphénicol, celles en jaune sont les nouvelles GCLIM et en noir ce sont les cassettes de fonctions inconnues. Les autres cassettes qui ont mappé sont représentées en hachuré noir et blanc.

La diversité des cassettes est très faible, les trois cassettes majoritaires *dfrA1*, *sat2* et *aadA1* représentant environ 94,4% de l'ensemble des cassettes retrouvées.

Quelques autres cassettes étaient présentes dans le Top10. C'est le cas de certaines GCLIM (GCLIM-C11, GCLIM-C75, GCLIM-U387, GCLIM-U385 et GCLIM-U390) mais avec une très faible proportion (en moyenne 0,3%). De plus les gènes de résistance aux ammoniums quaternaires *qacK*, *qacE* et *smr1* étaient également présents dans le Top10 des établissements A1 (0,04%), A3 (0,01%) et A5 (0,07%) respectivement. Le gène de résistance aux lincosamides, *Inu(F)1*, était présent dans le Top10 des abattoirs A2, A4 et A8 avec respectivement des proportions de 0,03%, 0,06% et 0,06%.

I.3.2.1.3. Analyse des cassettes associées aux intégrons de classe 3

L'analyse a montré pour tous les effluents d'abattoirs que les cassettes associées aux intégrons de classe 3 étaient très différentes de celles associées aux intégrons de classe 1 et 2 (**Figure 27**).

De plus, hormis pour les effluents A1 et A3, le Top10 des cassettes n'était pas aussi prédominant que pour celui des cassettes des intégrons de classe 1 et 2. En effet, pour les établissements A2 et A4, le Top10 ne représentait respectivement que 54,2% et 51,3% de toutes les cassettes.

Les cassettes majoritairement retrouvées étaient des GCLIM (GC nouvellement décrites dans le projet CALYPSO historique) avec en moyenne 41,2% du « cassetome » total si l'établissement A3 est exclu. Ce dernier n'est principalement composé que de trois cassettes déjà décrites auparavant dans les intégrons de classe 3 chez des souches de *Delftia* environnementales (*gcu45*, *gcu47* et *gcu48*) (Xu et al., 2007). La GCLIM la plus détectée dans les effluents d'abattoirs était la GCLIM-U162 avec une présence moyenne de 6,0% dans 7/8 établissements.

Le gène *aadA1* n'était pas ou peu présent, tout comme les autres cassettes de résistance aux aminosides (représentées en bleu). Seul l'établissement A4 contenait la cassette *aadA1* dans son Top10 (4,4%).

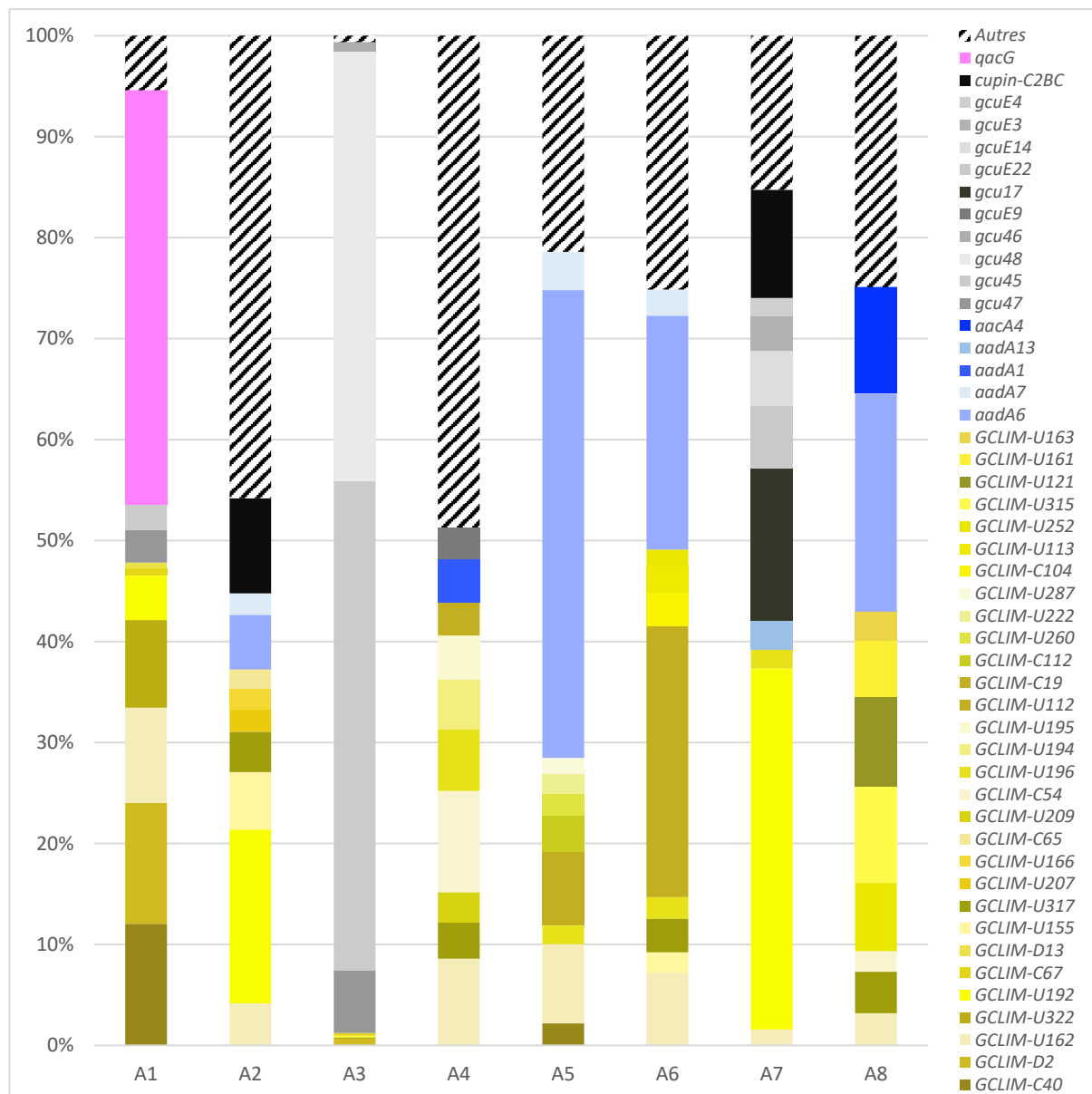


Figure 27 Principales cassettes des intégrons de classe 3 présentes dans les effluents d'abattoirs

Graphique représentant le Top10 des cassettes connues à ce jour pour les intégrons de classe 3 des effluents d'abattoirs.

Les cassettes en bleu confèrent une résistance aux aminosides, celles en rose aux ammoniums quaternaires, celles en jaune sont les nouvelles GCLIM et celles en noir/gris sont les cassettes de fonctions inconnues. Les autres cassettes sont représentées en hachuré noir et blanc.

I.3.2.2. Microbiote des effluents abattoirs

La composition du microbiote des effluents d'abattoirs a été déterminée à partir de la région V3 du gène codant l'ARNr 16S par mapping avec la base de données EZbiocloud.

Les effluents A1 et A3 étaient les établissements avec la plus faible richesse avec respectivement 53 et 52 ordres détectés. Pour tous les autres effluents d'abattoirs, on détectait en moyenne 82 ordres bactériens. Les principaux ordres bactériens détectés étaient des Bacteroidales, des Clostridiales et des Pseudomonadales avec en moyenne respectivement 29,2% ; 19,2% et 12,3% du microbiote total (**Figure 28**).

Pour l'ensemble des effluents d'abattoirs, les Bacteroidales constituaient l'ordre bactérien principal, allant de 20,8% à 49,5%) sauf pour deux effluents. L'établissement A3 était majoritairement composé de bactéries de l'ordre des Aeromonadales avec une proportion de 34,4% alors que pour les autres abattoirs, ces bactéries n'étaient présentes qu'en moyenne à 6,0%. L'établissement A1 était quant à lui majoritairement composé de bactéries de l'ordre des Pseudomonadales avec une proportion de 39,6%. Les autres effluents d'abattoirs ne contenaient qu'en moyenne 8,3% de Pseudomonadales dans leur microbiote total. D'autres ordres bactériens étaient présents en proportion non négligeable dans certains établissements, c'était le cas pour les Campylobacterales qui étaient présents dans les établissements A4, A5 et A6 avec des proportions de 11,8%, 14,3% et 8,4% respectivement.

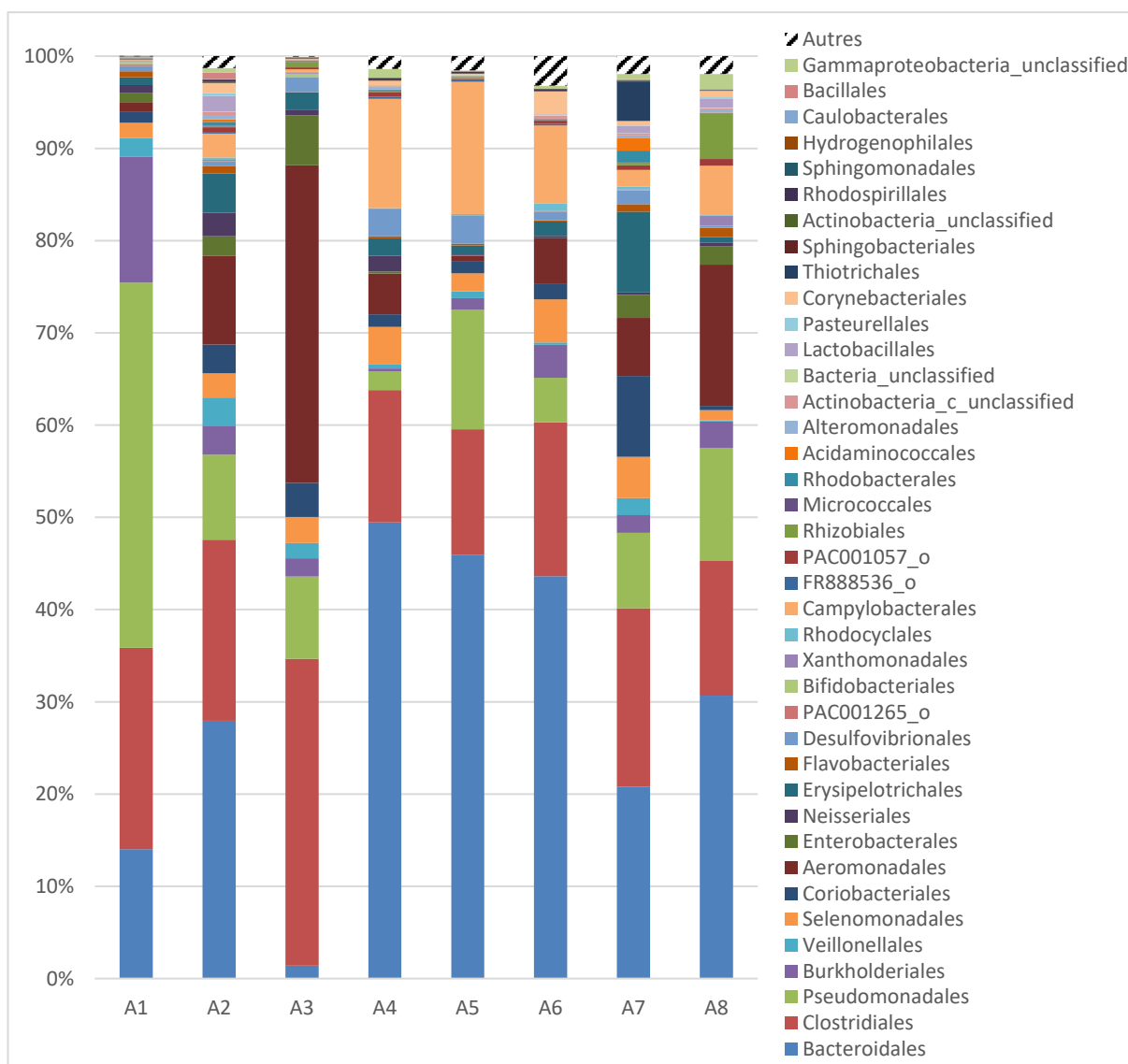


Figure 28 Microbiote des effluents d'abattoirs

Graphique représentant la composition des microbiotes présents dans les effluents de huit abattoirs. Les quarante premiers ordres bactériens les plus prédominants sont représentés, les autres sont hachurés en noir et blanc.

Le microbiote des effluents d'abattoirs est principalement composé de Bacteroidales, de Clostridiales et de Pseudomonadales.

I.4. Comparaison entre les effluents de centres de soins et d'abattoirs

I.4.1. Comparaison des cassettes d'intégrons

I.4.1.1. Analyse des « cassettes » d'abattoirs et de centres de soins pour les intégrons de classe 1

Les signatures des « cassettes » de classe 1 sont différentes entre les centres de soins et les abattoirs. Au niveau des résistances prédominantes, dans les effluents hospitaliers c'est la cassette *aacA4* qui est largement majoritaire avec une moyenne de 30,6% et une présence constante (34/34). Dans les effluents d'abattoirs c'est la cassette *aadA1* qui est prédominante avec une moyenne de 43,0% et elle est présente au sein de tous les effluents d'abattoirs (8/8). Dans les deux cas, les gènes de résistance aux aminosides sont majoritaires. Les résistances aux β -lactamines sont en forte présence dans les effluents hospitaliers avec une moyenne de 21,2% pour tous les établissements (34/34), ce qui n'est pas le cas pour les effluents d'abattoirs qui comptent peu de gènes de résistance aux β -lactamines avec en moyenne 3,1% sur seulement la moitié des effluents (5/8).

En ce qui concerne les nouvelles cassettes GCLIM, plusieurs d'entre elles (GCLIM-U140 et GCLIM-AR6) étaient retrouvées dans les « cassettes » des intégrons de classe 1 des effluents hospitaliers. Pour les effluents d'abattoirs, ce sont d'autres GCLIM qui ont été retrouvées en plus fortes proportions (GCLIM-U89 ; GCLIM-C6 et GCLIM-U51).

L'analyse PCoA des « cassettes » des intégrons de classe 1 d'effluents, montre des regroupements ou « clusters » (**Figure 29**). Nous pouvons distinguer deux clusters, un pour les effluents issus de centres de soins et un pour les effluents d'abattoirs. Ceci indique que le contenu en cassettes des intégrons de classe 1 de ces deux types d'effluents est différent. Les abattoirs ont leur propre signature qui est différente de la signature des centres de soins

pour les « cassetomes » de classe 1. L'EHPAD E2 est le seul centre de soin ne possédant pas la cassette *aacA4* au sein de son Top10, ce qui explique pour partie sur le graphique de PCoA un rapprochement des deux prélèvements E2a et E2b avec le « cluster » des abattoirs.

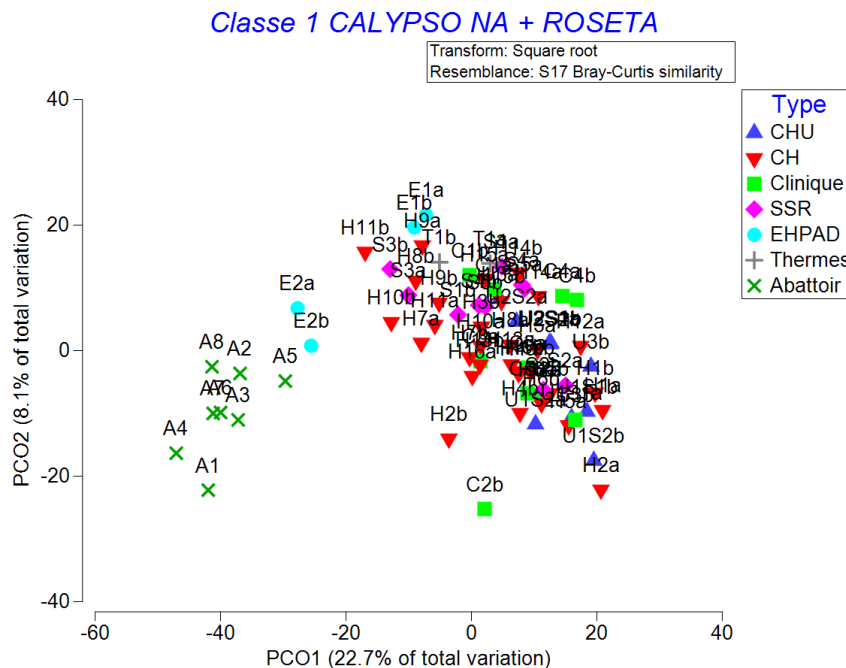


Figure 29 Analyse PCoA des « cassetomes » des intégrons de classe 1

Analyse multivariée de l'ensemble des cassettes de chaque effluent de centre de soins (CHU : triangle bleu ; CH : triangle rouge ; cliniques : carré vert ; SSR : losange rose ; EHPAD : rond turquoise ; thermes : croix grise) et d'abattoirs (croix verte).

Deux groupes, appelés « clusters », se forment permettant de distinguer les deux types d'effluents à l'exception de l'établissement E2 qui présente un « cassetome » proche des « cassetomes » des effluents d'abattoirs pour les intégrons de classe 1.

I.4.1.2. Analyse des « cassetomes » d'abattoirs et de centres de soins pour les intégrons de classe 2

Les signatures des « cassetomes » d'intégrons de classe 2 des effluents hospitaliers et de centres de soins sont très similaires. Pour les deux types d'effluents, leur Top10 était majoritairement composé des trois cassettes habituelles (*dfrA1*, *sat2* et *aadA1*).

Parmi les autres CGs qui composent leurs « cassetomes », les GCLIM-U387 et GCLIM-C36 retrouvées dans 21 et 19 des 34 centres de soins ne sont pas retrouvées dans les effluents d'abattoirs, à l'exception de la GCLIM-U387 qui a été détectée dans l'établissement A4 (0,6%),

A6 (0,3%) et A8 (1,1%) en faibles proportions. Parmi les autres cassettes, le gène *Inu(F)1* était retrouvé dans le Top10 des effluents de trois abattoirs (A2, A4 et A8) mais également dans le Top10 du SSR S3 (1,3%).

De plus, certaines cassettes n'étaient présentes que dans le Top10 des effluents d'abattoirs : c'est le cas des cassettes qui confèrent une résistance aux ammoniums quaternaires (*qacK*, *smr1* et *qacE*) mais leur proportion était très faible, avec en moyenne 0,04%. A l'inverse, nous retrouvons des cassettes de résistance aux β -lactamines (*bla_{OXA-10}* et *bla_{GES-1}*) uniquement dans le Top10 du « cassetome » de l'EHPAD E2 mais avec encore une fois une très faible proportion (0,02% du « cassetome » total).

Contrairement à ce que l'on pouvait suggérer au vu de la composition des Top10 des « cassetomes », nous n'observons pas un seul et même "cluster" regroupant les effluents hospitaliers et d'abattoirs lors de l'analyse PCoA (**Figure 30**). En effet, nous pouvons voir que certains abattoirs sont éloignés du "cluster" des effluents de centres de soins et seul l'établissement A3 est proche de ce "cluster". Les établissements A4 et A5 se distinguent des autres effluents avec une plus grande proportion de la cassette *sat2* (84,1% et 90,0% respectivement). Les établissements A1, A2 et A6 quant à eux se distinguent du "cluster" d'établissements de soins par une plus forte présence du gène *aadA1* dans leur « cassetome ». Pour terminer, les établissements A3, A7 et A8 présentent une signature proche des signatures des effluents de centres de soins.

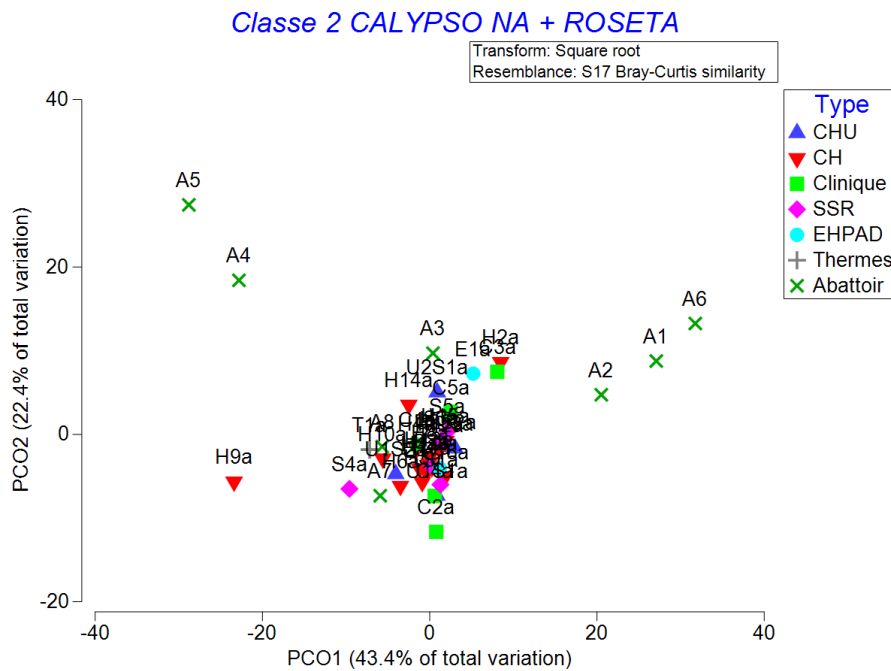


Figure 30 Analyse PCoA des « cassetomes » des intégrons de classe 2

Analyse multivariée de l'ensemble des cassettes de chaque effluent de centre de soins (CHU : triangle bleu ; CH : triangle rouge ; cliniques : carré vert ; SSR : losange rose ; EHPAD : rond turquoise ; thermes : croix grise) et d'abattoirs (croix verte).

Un groupe réunissant les effluents hospitaliers se forme mais ce n'est pas le cas des effluents d'abattoirs qui eux ne forment pas de « cluster » mais sont dispersés.

I.4.1.3. Analyse des « cassetomes » d'abattoirs et de centres de soins pour les intégrons de classe 3

Les signatures des « cassetomes » des intégrons de classe 3 dans les effluents hospitaliers et d'abattoirs semblent différentes. Le Top10 des cassettes retrouvées dans les effluents d'abattoirs se compose uniquement de cassettes de résistance aux aminosides, aux ammonium quaternaires, et de cassettes de fonctions inconnues (cassettes *gcu* et GCLIM). Aucune cassette conférant une résistance aux β -lactamines n'a été détectée dans les Top10 des effluents d'abattoirs, or dans 33/34 des effluents hospitaliers, ces cassettes ont été détectés avec une proportion moyenne de 36,8%.

On retrouve tout de même des similarités avec la présence des trois cassettes de fonctions inconnues, *gcu45*, *gcu47* et *gcu48*, dans 4/34 signatures de « cassetomes » d'effluents hospitaliers et 2/8 signatures de « cassetomes » d'abattoirs.

De plus, parmi les GCLIM, les principales qui sont retrouvées dans les signatures des « cassetomes » des effluents de centres de soins sont GCLIM-U162 (26/34), GCLIM-U122 (16/34), GCLIM-D2 (16/34) et GCLIM-C40 (10/34) et ces mêmes cassettes sont également retrouvées à plusieurs reprises dans les signatures des effluents d'abattoirs : GCLIM-U162 (7/8), GCLIM-D2 (2/8) et GCLIM-C40 (2/8).

L'analyse PCoA pour les intégrons de classe 3 montre clairement que les « cassetomes » des effluents de centres de soins et des effluents d'abattoirs ne forment pas de « cluster » (**Figure 31**), ce qui signifie qu'il n'existe pas de spécificité ou signature propre à ces deux types d'effluents quant à leur composition en cassettes d'intégrons de classe 3.

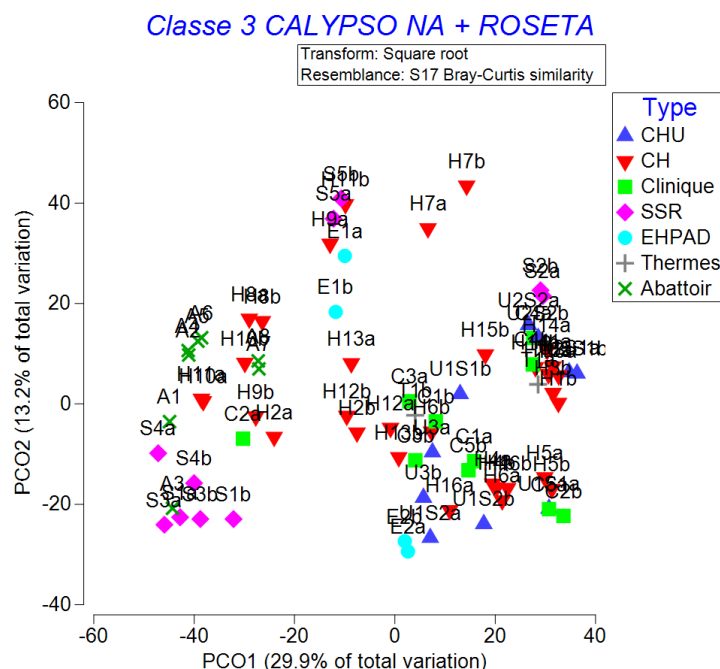


Figure 31 Analyse PCoA des « cassetomes » des intégrons de classe 3

Analyse multivariée de l'ensemble des cassettes de chaque effluent de centre de soins (CHU : triangle bleu ; CH : triangle rouge ; cliniques : carré vert ; SSR : losange rose ; EHPAD : rond turquoise ; thermes : croix grise) et d'abattoirs (croix verte).

Pas de « clusterisation » observée entre les différents types d'établissements. Les effluents d'abattoirs se retrouvent proches de certains effluents de centres de soins indiquant leur similitude de « cassetome ».

Les « cassetomes » des intégrons de classe 3 des effluents d'abattoirs sont principalement composés de GCLIM et se retrouvent sur le graphique PCoA proche des effluents de centres de soins qui possèdent eux aussi dans leur « cassetome » une grande proportion de ces

GCLIM. De plus, les effluents qui possèdent des cassettes de résistance aux β -lactamines en grande quantité dans leur Top10 se retrouvent éloignés (partie droite du graphique de PCoA) des « cassettes » d'abattoirs qui eux n'en contiennent pas dans leur Top10.

I.4.2. Comparaison des microbiotes des effluents d'abattoirs et de centres de soins

Le microbiote des abattoirs présente des similarités avec celui retrouvé dans les effluents des centres de soins. En effet les principaux ordres bactériens détectés pour les deux types d'effluents sont des bactéries de type anaérobies : Bacteroidales avec en moyenne 29,2% du microbiote total pour les abattoirs et 24,2% pour les effluents hospitaliers suivi par les Clostridiales avec en moyenne 19,2% pour les abattoirs et 12,4% pour les centres de soins. De plus, les autres ordres bactériens prédominants sont les Pseudomonales et les Burkholderiales qui sont présents dans les deux types d'effluents. Cependant, les Enterobacterales sont présentes dans les effluents hospitaliers avec une moyenne de 9,3% mais dans les effluents d'abattoirs ces bactéries ne sont présentes qu'en moyenne à 1,7%.

L'analyse PCoA (**Figure 32**) nous relève une différence dans la composition du microbiote des effluents d'abattoirs et des centres de soins avec la formation de deux « cluster » distincts. Cependant, nous observons que deux microbiotes d'effluents d'abattoirs (A1 et A3) sont proches des microbiotes des centres de soins. Ce sont en réalité les deux effluents issus du centre de découpe en gros qui présentaient déjà une diversité plus faible au sein des effluents d'abattoirs. La différence principale qui les distingue des autres effluents d'abattoirs est que l'ordre bactérien majoritaire dans les effluents A1 et A3 n'est pas celui des Bacteroidales. De plus, comme évoqué précédemment, la composition du microbiote des thermes est différent des autres centres de soins mais également du microbiote des abattoirs.

Cet établissement composé d'une grande proportion de Cyanobactéries (35,8%) possède son propre microbiote.

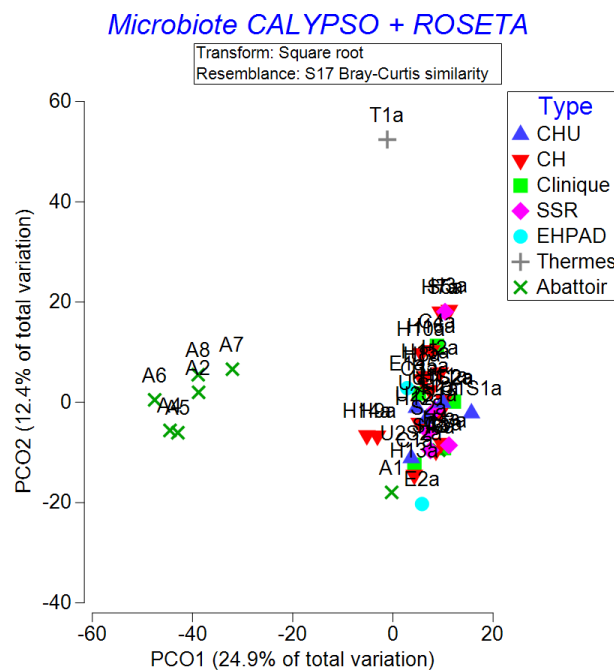


Figure 32 Analyse PCoA des microbiotes des effluents hospitaliers et d'abattoirs

Analyse multivariée de l'ensemble du microbiote de chaque effluent de centre de soins (CHU : triangle bleu ; CH : triangle rouge ; cliniques : carré vert ; SSR : losange rose ; EHPAD : rond turquoise ; thermes : croix grise) et d'abattoirs (croix verte).

Deux « clusters » se forment, l'un comprenant uniquement des effluents d'abattoirs et un autre avec l'ensemble des effluents de centres de soins et les deux effluents de centres de découpe en gros. Les effluents de thermes ont quant à eux un microbiote propre, différent des autres types d'effluents.

Partie II. Analyse des intégrons chez des *Aeromonas* isolés de poissons : projet ARMANI

II.1. ARMANI

Les poissons d'élevages en France sont soumis à une pollution anthropique puisque l'utilisation de certains antibiotiques (tétracycline, triméthoprime-sulfaméthoxazole, fluméquine, florfénicol) est autorisée. Parmi les bactéries connues pour coloniser et/ou infecter les poissons, on retrouve les *Aeromonas*. Avec leur grande plasticité génomique, les *Aeromonas* ont la capacité d'acquérir des éléments génétiques mobiles tels que les intégrons et ainsi être des acteurs majeurs de la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les animaux, dans l'environnement mais également chez l'Homme. En effet ils sont connus pour être à l'interface des trois écosystèmes « *One Health* » (Lamy et al., 2022).

Le projet **ARMANI (*Aeromonas* and integrons)** avait pour objectif de détecter des intégrons dans des souches d'*Aeromonas* isolées de poissons d'élevage, de poissons malades et de poissons sauvages non malades. De part leurs origines diverses, et même si celle-ci n'a pas été quantifiée, il était raisonnable de penser que les trois collections de poissons étaient exposées à différents niveaux de pression de sélection antibiotique. En recherchant les intégrons de façon ciblée à partir de souches d'*Aeromonas* isolées de poissons, l'objectif de ce travail était de voir s'il existait une différence de prévalence des intégrons en fonction des populations de poissons. Un objectif secondaire était de regarder si la présence d'intégrons était associée à un niveau de résistance aux antibiotiques plus élevé. La détection des intégrons s'est faite par la technique de qPCR (Barraud et al., 2010). Aucun intégron n'a été détecté dans les souches d'*Aeromonas* isolées de poissons sauvages. Pour les poissons malades et d'élevages, ce sont 69 intégrons qui ont été détectés parmi les 379 souches d'*Aeromonas* testées avec une prédominance nette des intégrons de classe 1 (68/69) et seulement un seul intégron de classe 2 a été détecté. Les intégrons ont été détectés majoritairement dans les souches issues de poissons malades. Par la suite, les réseaux de

cassettes ont été caractérisés premièrement par la technique Sanger puis pour les intégrons pour lesquels nous n'obtenions aucun résultat, un séquençage NGS a été réalisé. Les résultats des différents séquençages ont montré une faible diversité des réseaux de cassettes avec la forte présence des cassettes *aadA*, *dfrA/dfrB* et *catB* qui confèrent des résistances à la streptomycine/spectinomycine, au triméthoprimé et au chloramphénicol respectivement. En ce qui concerne l'unique intégron de classe 2, son réseau de cassettes reflétait la majorité des réseaux précédemment décrits chez les intégrons de classe 2 : *dfrA1-sat2-aadA1*. En termes de résistance, un lien significatif a été montré entre présence d'intégrons et résistance à la tétracycline, au triméthoprimé-sulfaméthoxazole et à la fluméquine.

Ce projet a été soutenu financièrement par le plan EcoAntibio2 et fait l'objet d'un article dont je suis co-1^{er} auteure. J'ai effectué la détection et le séquençage des intégrons de classe 1 et de classe 2 des différentes souches d'*Aeromonas*. Cet article a été soumis en août 2022 dans le journal *Aquaculture* et il est actuellement en reviewing.

Integrans from *Aeromonas* isolates collected from fish: a global indicator of antimicrobial resistance and anthropic pollution

Sandrine BARON^{1,#,*}, Lucie LAVAL^{2,#}, Laëticia LE DEVENDEC¹, Emeline LARVOR¹, Claire CHAUVIN³, Eric JOUY¹, Sophie LE BOUQUIN³, Yann VANROBAEYS¹, Benoit THUILLIER⁴, Brigitte LAMY^{5,6} and Olivier BARRAUD²

¹Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Mycoplasmiologie-Bactériologie et Antibiorésistance, Ploufragan

² Université de Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, Limoges, France

³Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Epidémiologie santé et bien-être animal, Ploufragan, France

⁴Labocéa, Quimper, France

⁵Université de Nice Côte d'Azur, CHU Nice, INSERM, C3M, Nice, France

⁶MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, London, United-Kingdom

#Authors contributed equally to the work

*Corresponding author. E-mail: sandrine.baron@anses.fr

Keywords: *Aeromonas*, antibiotic resistance, One Health, integrans, biomarkers

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) has been an ever-growing threat throughout the 21st century, and it is now considered to be a major public health issue. AMR needs to be tackled following a One Health approach where the interconnection between humans, animals and the environment has to be considered. Therefore, the need to identify indicators to follow the dissemination of AMR in the environment is of utmost importance. With regard to antibiotic use and anthropic activity, fish farming is an appealing model to study the effects of antibiotic exposure on the rise of AMR. Here, we propose that *Aeromonas* from fish and integrons, could provide a consistent marker, when combined, of the level of acquired AMR in the environment. Since *Aeromonas* is at the interface of all the One Health components, it represents an ideal test case in the One Health approach, with important considerations including the economic loss in aquaculture to the challenges related to antibiotic-resistant bacteria being selected from the environment. Integrons are acquired genetic elements observed in Gram-negative bacteria including *Aeromonas* that can carry hundreds of mobile gene cassettes, most of which are involved in AMR. Hence, integrons are now considered as a good proxy to monitor AMR dissemination.

To investigate the link between integrons among *Aeromonas* from fish and anthropic pollution, we determined integron prevalence in a unique collection of *Aeromonas* isolates recovered from wild fish (WF), farmed fish (FF) and diseased fish (DF). The search for integrons from *Aeromonas* was performed using qPCR. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined for the antibiotics commonly used in aquaculture and compared between integron-positive and integron-negative *Aeromonas*.

Out of 379 non-redundant isolates, 69 *Aeromonas* harboured integrons. The proportion of integron-positive *Aeromonas* was significantly higher in the DF collection (34/70, 48.6%) compared to the FF collection (35/231, 15.2%) ($p \leq 0.001$) whilst no integrons were detected

among the 231 *Aeromonas* isolates of the WF collection. A significant link between integrons and MICs was observed for tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and flumequine. Following a One Health approach, this study proposes the combination of two well-known biomarkers of AMR, integrons and *Aeromonas* collected from fish, as a novel indicator of AMR and anthropic pollution in the environment.

1.1 Introduction

The increase of antimicrobial resistance (AMR), notably among Gram-negative bacteria (GNB), is a worldwide public health issue (Antimicrobial Resistance, 2022) that must now be addressed according to the *One Health* perspective (Gonzalez-Zorn, Escudero, 2012) since humans, animals and the environment are intrinsically linked together. From this viewpoint, fish stand out for being at an interface of all three ecosystems. Fish are exposed to antibiotics that originate from other ecosystems through the water cycle. They are also the target of active antimicrobial use in aquaculture - for example, in France, oxytetracycline, florfenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, flumequine and oxolinic acid, are all authorized for use according to local regulations (FVE, 2016). Wild fish can additionally be impacted by anthropic activities and they can also be exposed to antibiotics through runoff and sewage water (Reverter, Sarter, Caruso, Avarre, Combe, Pepey, Pouyaud, Vega-Heredia, de Verdal, Gozlan, 2020).

For these reasons, fish farming is an appealing model to study the effects of antibiotic exposure on the rise of AMR and antibiotic-resistant bacterial carriage. However, handling such a model remains challenging due to the lack of consistent and easy-to-use tools to monitor AMR. The development of accurate and readily-detectable AMR-related biomarkers, which are urgently required to estimate the impact of anthropic pollution, is more complicated when studying fish because there is a high bacterial diversity in the aquatic environment, with thousands of antibiotic resistance genes potentially present.

To circumvent these difficulties, one approach considered is combining one biomarker that is a correlate for AMR, with a biomarker that is connected to all One Health components and that also strongly relates to fish microbiology. Unlike *E. coli*, which is not a common native bacteria of aquatic environments, *Aeromonas* is a good biomarker candidate because it is an ubiquitous and autochthonous GNB with a notable ability to colonize fish (Bandeira Junior,

Baldisserotto, 2020; Menanteau-Ledouble, Kumar, Saleh, El-Matbouli, 2016; Wallace, McKay, Murray, 2017; Zhang, Xu, Shoemaker, Hemstreet, 2016). This organism is at the interface of the three *One Health* ecosystems, has a high level of genome plasticity, and is known to have a tremendous capacity to acquire mobile genetic elements, including plasmids, transposons, genomic islands or integron gene cassettes (Lamy, Baron, Barraud, 2022). Integrons are non-mobile genetic elements carried by plasmids or transposons that can transport hundreds of mobile gene cassettes, the majority of which are involved in AMR (Cambray, Guerout, Mazel, 2010; Mazel, 2006). Integrons are mainly described in GNB, and notably within the genus *Aeromonas* (Carnelli, Mauri, Demarta, 2017; Deng, Wu, Jiang, Tan, Zhang, Luo, 2016; Lee, Peng, Lin, Lin, Chen, 2008). They are easy-to-detect (Barraud, Baclet, Denis, Ploy, 2010), and are also now considered as a good proxy for anthropic pollution (Gillings, Gaze, Pruden, Smalla, Tiedje, Zhu, 2015; Stalder, Barraud, Jove, Casellas, Gaschet, Dagot, Ploy, 2014).

Here, we propose that the combination of two well-known biomarkers of AMR, *Aeromonas* and integrons, could together consistently reflect the level of acquired AMR in fish bacteria as a result of antimicrobial pressure in the environment. To investigate the link between integrons among *Aeromonas* and anthropic pollution, we determined integron prevalence among *Aeromonas* isolates recovered from fish of diverse origins, i.e., wild fish, farmed fish and diseased fish, and levels of AMR were compared between integron-positive and integron-negative *Aeromonas*.

1.2 Material and methods

Collection of wild fish, farmed fish and diseased fish

Wild fish (WF) were collected from Guerlédan Lake, which is the largest lake in Brittany, France, and a major fishing spot. It is associated with a hydroelectric dam whose

maintenance requires regular draining. During a previous draining in 2015, 63 WF were collected. Farmed fish (FF) consisted of 200 trout sampled in twenty different farms across Brittany (n=12), Normandy (n=4) and Hauts-de-France (n=4) between April and September 2014. Fish were euthanized following animal welfare rules. The gill and gut contents were collected aseptically and stored at -20°C with glycerol until analysis. A collection of *Aeromonas* isolates from diseased fish (DF) during clinical case investigations was built up by collecting isolates preserved between 2000 and 2014 from two specialised veterinarian laboratories in Brittany.

Bacterial collection and culture conditions

Gill and intestinal content of fish were streaked onto GSP (*Pseudomonas Aeromonas* Selective Agar Base) agar plates (Merck, France) and incubated at 22°C for 48h. Yellow colonies were considered as presumptive *Aeromonas*. Up to ten colonies per sample were then purified on CHROMagar™ Orientation (Becton Dickinson, France). The isolates collected from DF were also purified on CHROMagar™ Orientation (Becton Dickinson, France). All *Aeromonas* isolates were stored in BHI (Bio-Rad) with 20% glycerol at -70°C.

Identification at the genus level was achieved by both Sanger sequencing (Khan, Loughborough, Edge, 2009) and by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Microflex®, Bruker V4.0.0.1_4613-5627). *Aeromonas* isolated from DF were identified at the species level using *rpoB* and *gyrB* sequencing (Lamy, Laurent, Kodjo, 2010; Yanez, Catalan, Apraiz, Figueras, Martinez-Murcia, 2003). Strains from the WF and DF collections were assessed for their belonging to the species *A. salmonicida* by using PCR as previously described (Gustafson, Thomas, Trust, 1992; Miyata, Inglis, T., 1996).

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR)

Isolate genotyping was performed using ERIC-PCR. The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95°C during 5 minutes, followed by 35 amplification cycles that successively comprised denaturation at 92°C for 45 s, annealing at 52°C for 1 min, and extension at 65°C for 4 min, before a final extension step at 70°C for 20 min (Rivera, Chowdhury, Huq, Jacobs, Martins, Colwell, 1995).

Antimicrobial susceptibility testing (AST)

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values were determined using the broth microdilution method using either ThermoFisher (Franv microplate) or in-house ANSES-designed plates. The antibiotics tested were: florfenicol, flumequine, tetracycline, gentamicin and trimethoprim-sulfamethoxazole. MIC results were recorded after a 48h incubation at 22°C using the testing protocols recommended for non-fastidious organisms in the CLSI guideline VET03Ed2 (Baron, Larvor, Jouy, Kempf, Le Bouquin, Chauvin, Boitard, Jamin, Le Breton, Thuillier, Smith, 2021; CLSI, 2020) .

Integron detection and gene cassette content

Screening of class 1, 2 and 3 integrons was performed using qPCR, as previously described (Barraud, Baclet, Denis, Ploy, 2010). Gene cassettes were determined after PCR of the gene cassette arrays and Sanger sequencing using *attI1* and *sulI* primers for class 1 integrons (Aberkane, Compain, Barraud, Ouedraogo, Bouzinbi, Vittecoq, Jean-Pierre, Decre, Godreuil, 2015) or *intI2-LC2* and *hep51* primers for class 2 integrons, as previously described (Mendes Moreira, Couvé-Deacon, Bousquet, Chainier, Jové, Ploy, Barraud, 2019).

Data analysis

Only one isolate was included in the study when two or more isolates originating from the same fish showed the same species identification, the same AST profile, the same ERIC-PCR profile and the same integron profile and gene cassette array.

MIC distributions were visualised for each fish category (WF, FF, DF) according to integron detection using raincloud plots (Allen, Poggiali, Whitaker, Marshall, Kievit, 2019), which combine dot plots (each dot represents an *Aeromonas* isolate MIC jittered), box plots (which median corresponds to MIC₅₀) and half violin plots that depicts the probability density of MICs. The Mann-Whitney U test was used to compare MIC distribution between two groups (e.g., comparison within or between fish categories). A significance level of 95% was utilised, with the Holm-Bonferroni correction for multiple tests applied where appropriate.

1.3 Results

A total of 923 presumptive *Aeromonas* isolates were recovered from the three fish collections: 335 from WF, 498 from FF and 90 from DF (Figure S1). A total of 379 non-redundant isolates were selected. The final WF collection was composed of 78 *Aeromonas* isolates collected from 30 fish belonging to five species, mostly common bream (14 fish, 39 isolates), zander (7 fish, 18 isolates) and northern pike (3 fish, 10 isolates). The FF collection was composed of 231 *Aeromonas* isolated from 109 trout. The DF collection was composed of 70 *Aeromonas* isolated from four species, predominantly trout (n=40, 57.1%) and turbot (n=27, 38.6%) (Figure S1). Among the 379 isolates, 39 *A. salmonicida* (10.3%) were detected, which all originated from the DF collection.

Sixty-nine *Aeromonas* harboured integrons (69/379, 20.8%), with 68 class 1 integrons identified and a single class 2 integron identified but no class 3 integrons were detected (Table 1). There were no integron detected amongst the *Aeromonas* isolates of the WF collection. The

proportion of integron-positive *Aeromonas* was significantly higher in the DF collection (34/70, 48.6%) than in the FF collection (35/231, 15.2%) ($p \leq 0.001$). Integrons were more frequent among *Aeromonas salmonicida* than in other *Aeromonas* species, in both the DF collection (64.1% vs 29.0%; $p \leq 0.01$) and in the collection as a whole (64.1% vs 12.9%, $p \leq 0.001$). Notably, the diversity of integron gene cassettes was very low. The *aadA*, *dfrA/dfrB* and *catB* gene cassettes that confer resistance to streptomycin/spectinomycin, trimethoprim and chloramphenicol, respectively, were the most frequently identified (Table S2). The *aadA1* gene cassette was the most frequent among *A. salmonicida* isolates. The gene cassette array in the single class 2 integron was *dfrA1-sat2-aadA1*.

Independently of integrons, a trend toward an increased MIC for the antibiotics tested was observed between fish categories, with *Aeromonas* from the WF category associated with the lowest MIC distributions, while *Aeromonas* from the DF category had the highest MIC distributions (Figure 1). The MIC distributions were also significantly different between fish categories (WF vs. FF and FF vs DF) for all the antibiotics individually, with the only exception being the florfenicol MICs in the groups FF and DF (Table S1).

Finally, the MIC distributions were significantly different between groups with and without integrons ($p < 0.01$) for all the antibiotics tested except for gentamicin and florfenicol in the FF group (Figure 1).

1.4 Discussion

Analysis of the dissemination of AMR in the environment is very challenging due to the vast number of antibiotic resistance genes and bacterial species with human, animal and environmental origins. Following a One Health approach, this study highlighted the interest and relevance of screening for integrons amongst *Aeromonas* isolates collected from fish as an indicator of AMR and anthropic pollution in the environment. Dozens of studies have

investigated the presence of integrons in *Aeromonas* collected from either wild fish (healthy/diseased) or farmed fish (and their environment) (Deng, Wu, Jiang, Tan, Zhang, Luo, 2016; Dhanapala, Kalupahana, Kalupahana, Wijesekera, Kottawatta, Jayasekera, Silva-Fletcher, Jagoda, 2021; Ndi, Barton, 2011; Otero-Olarra, Curiel-Quesada, Baltazar-Cruz, Aguilera-Arreola, Perez-Valdespino, 2020; Ranjbar, Salighehzadeh, Sharifiyazdi, 2019). However, to the best of our knowledge, this study is the first to compare integron distribution amongst *Aeromonas* isolates collected from these diverse fish categories in a common area. Using a unique collection of fish impacted by different antibiotic selection pressures and anthropic activities, we demonstrated several critical points. First, the prevalence of integrons among *Aeromonas* was significantly higher in diseased fish (48.6%) and farmed fish (15.2%) compared to wild fish where no integrons were detected. Second, a consistent link between integrons and antibiotic resistance was observed for several antibiotics frequently used in aquaculture, including tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and flumequine.

The fish-focused approach using the combined *Aeromonas*-integron biomarker tool relies on several assets. Fish are unequivocally exposed to anthropic activities, either directly (e.g., aquaculture) or indirectly (water-mediated anthropic pollution). Moreover, *Aeromonas* is a ubiquitous organism with a large capacity readily acquire multiple mobile genetic elements, including AMR genes, under selective pressure (Lamy, Baron, Barraud, 2022). This capability to quickly and easily obtain AMR genes makes these bacteria excellent candidates to study the impact of selective pressure. Indeed, certain authors have previously considered *Aeromonas* to be the witnesses of the dissemination of AMR in wildlife, wastewater, or aquatic environment (Gomes, Fernandes, Monteiro, Cabecinha, Teixeira, Varandas, Saavedra, 2021; Grilo, Sousa-Santos, Robalo, Oliveira, 2020; Usui, Tagaki, Fukuda, Okubo, Boonla, Suzuki, Seki, Takada, Tamura, 2016; Varela, Nunes, Manaia, 2016). The *Aeromonas*-integron tool presented here is further aided by the fact that class 1 integrons directly detected from raw effluents are now

considered as a good proxy for anthropic pollution (Gillings, Gaze, Pruden, Smalla, Tiedje, Zhu, 2015; Stalder, Barraud, Jove, Casellas, Gaschet, Dagot, Ploy, 2014). Thus, combining integron detection with fish-isolated *Aeromonas* improves the consistency of the tool by using an easy-to-detect and reliable proxy to assess the effect of antimicrobial selective pressure. The indicator is simple, standardisable and allows potential comparisons between labs and aquatic environments across the world. This approach fills one of the current methodological gaps for monitoring the dissemination of AMR in the environment and offers an ideal indicator of anthropic pollution within the One Health context. Such a method would also allow epidemiological surveys to be performed in the fish farming sector where research in epidemiology is relatively poor compared to other animal sectors (ECDC, EFSA, EMA, 2017; Mader, Damborg, Amat, Bengtsson, Bourelly, Broens, Busani, Crespo-Robledo, Filippitzi, Fitzgerald, Kaspar, Madero, Norstrom, Nykasenoja, Pedersen, Pokludova, Urdahl, Vatopoulos, Zafeiridis, Madec, Eu, 2021).

We showed a significant and consistent association between integron carriage and increased MICs for the antibiotics oxytetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and flumequine. Whilst the presence of integrons could not in this study be used to predict which specific antibiotics an *Aeromonas* strain would be resistant to (as previously observed for Enterobacterales), this work has nonetheless established the consistency of integrons as global biomarkers of AMR driven by horizontal gene transfer (Barraud, Francois, Chainier, Vignaud, Ploy, 2014; Mendes Moreira, Couvé-Deacon, Bousquet, Chainier, Jové, Ploy, Barraud, 2019). Integron-based tools offer a significant advantage in improving AMR studies, because they provide a more effective workload compared to relatively time-consuming measurement of MICs.

In our study, the diversity of gene cassette arrays was low in both number and type with the predominant gene cassettes being *aadA*, *dfp* and *catB*. These gene cassettes are very

common in integrons of *Aeromonas* collected from fish (Cizek, Dolejska, Sochorova, Strachotova, Piackova, Vesely; L'Abée-Lund, Sorum, 2001; Ndi, Barton, 2011; Nguyen, Van, Nguyen, Smooker, Shimeta, Coloe, 2014; Schmidt, Bruun, Dalsgaard, Larsen, 2001; Schmidt, Bruun, Larsen, Dalsgaard, 2001; Vega-Sanchez, Latif-Eugenin, Soriano-Vargas, Beaz-Hidalgo, Figueras, Aguilera-Arreola, Castro-Escarpulli, 2014). Their low frequency is also consistent with observations in a recent study performed on *Aeromonas* collected from environmental samples (Otero-Olarrá, Curiel-Quesada, Baltazar-Cruz, Aguilera-Arreola, Perez-Valdespino, 2020). In our study, no gene cassettes encoding resistance to β -lactams were detected. This type of cassette seems to be infrequent among environmental *Aeromonas*, with the exception of *bla*_{OXA} genes (Jacobs, Chenia, 2007; Maravic, Skocibusic, Samanic, Fredotovic, Cvjetan, Jutronic, Puizina, 2013; Sarria-Guzman, Lopez-Ramirez, Chavez-Romero, Ruiz-Romero, Dendooven, Bello-Lopez, 2014), and is in opposition to clinical *Aeromonas* strains that may exhibit ESBL-encoding or even carbapenemase-encoding genes, potentially reflecting a different history of selective pressure (Adler, Assous, Paikin, Shulman, Miller-Roll, Hillel, Aronov, Carmeli, Schwaber, 2014; Barraud, Robert, Laval, Ruimy, Morquin, Boyer, Lamy, 2020; Floug, Sinna, Fillatre, Plesiat, Hamdad, 2019).

Our study presents several limitations. Firstly, the sampling design varied between the three collections obtained from different fish species. Nevertheless, the number and diversity of isolates used (379 non-redundant *Aeromonas* isolates) allowed us to have robust and representative data. Secondly, we were unable to quantify the previous antibiotic exposure of fish obtained from the three collections. Although it is reasonable to hypothesize that such exposure is likely to have been higher in diseased fish relative to both farmed fish and wild fish, this proposal needs to be further investigated. Thirdly, the evaluation of AMR was based on MIC distributions rather than epidemiological cut off (ECOFF) values that would have categorized microorganisms as wild type or non-wild type (European Food Safety, European

Centre for Disease, Control, 2019; Kahlmeter, Turnidge, 2022). Unfortunately, ECOFF values defined elsewhere could not be used in this study (Baron, Granier, Larvor, Jouy, Cineux, Wilhelm, Gassilloud, Le Bouquin, Kempf, Chauvin, 2017; CLSI, 2020). However, the MICs presented here have the advantage of being raw unbiased data that provide a more informative distribution on phenotypic resistance among *Aeromonas* populations. Finally, we did not determine the species identification for any *Aeromonas* isolate other than *A. salmonicida*. However, the biomarker tool presented here is designed to be simple and easy, and whilst identification to the genus level of *Aeromonas* isolates is readily achievable thanks to MALDI-TOF mass spectrometry now available in most microbiology laboratories, identification to the species level is significantly more challenging.

1.5 Conclusions

There is a critical need to develop effective indicators to follow the dissemination of AMR in the environment. We propose that a combination of two well-known biomarkers of AMR - integrons and fish-derived *Aeromonas* - provided a novel, efficient and consistent indicator of AMR and anthropic pollution. By investigating a unique collection of *Aeromonas* from fish of different origins, we found that there was a significant difference between wild fish where no integrons were detected, farmed fish with a moderate prevalence of integrons and diseased fish where integron prevalence was high (close to 50%). Further studies are needed to confirm whether this *Aeromonas*-integron indicator could also be of interest in other preserved or polluted environments, as well as to correlate integron prevalence to previous antibiotic exposure.

Competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank Segolène Calvez (ONIRIS & INRAE Department of Farm Animal Health and Public Health UMR 1300 BIOEPAR - Biology, Epidemiology & Risk Analysis in Animal Health) for providing isolates included in this study. We thank Dr Akshay Sabnis (Imperial College London) for checking English usage of this manuscript.

Part of this work was presented at the 8th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), Tours, France, 2019 (Poster).

Funding

This work was supported by grants from Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and EDF – Convention P314B. This study was financed through « FLORCO, ANTIBIOFISH », research projects supported by both French Ministries in charge of Environment and Agriculture. These 2 projects are part of the national effort to reduce antimicrobial resistance in veterinary medicine called “EcoAntibio2017”.

References

- Aberkane, S., Compain, F., Barraud, O., Ouedraogo, A.S., Bouzinbi, N., Vittecoq, M., Jean-Pierre, H., Decre, D., Godreuil, S., 2015. A non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* avian isolate co-carrying the *bla*_{VIM-1} and *bla*_{VIM-4} genes, France. *Antimicrob Agents Chemother.*
- Adler, A., Assous, M.V., Paikin, S., Shulman, A., Miller-Roll, T., Hillel, S., Aronov, R., Carmeli, Y., Schwaber, M.J., 2014. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 69, 1211-1214.
- Allen, M., Poggiali, D., Whitaker, K., Marshall, T.R., Kievit, R.A., 2019. Raincloud plots: a multi-platform tool for robust data visualization. *Wellcome Open Res.* 4, 63.
- Antimicrobial Resistance, C., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 399, 629-655.
- Bandeira Junior, G., Baldisserotto, B., 2020. Fish infections associated with the genus *Aeromonas*: a review of the effects on oxidative status. *J Appl Microbiol.*
- Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., Gassilloud, B., Le Bouquin, S., Kempf, I., Chauvin, C., 2017. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater-an attempt to set generic Epidemiological Cut-Off values. *Front Microbiol.* 8, 503.
- Baron, S., Larvor, E., Jouy, E., Kempf, I., Le Bouquin, S., Chauvin, C., Boitard, P.M., Jamin, M., Le Breton, A., Thuillier, B., Smith, P., 2021. Agreement between the categorization of isolates of *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri* by disc diffusion and MIC tests performed at 22. *J Fish Dis.* 44, 979-985.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother.* 65, 1642-1645.
- Barraud, O., Francois, B., Chainier, D., Vignaud, J., Ploy, M.C., 2014. Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicaemia. *Int J Antimicrob Agents.* 44, 351-353.
- Barraud, O., Robert, A., Laval, L., Ruimy, R., Morquin, D., Boyer, L., Lamy, B., 2020. It takes two to tango: two *Aeromonas* isolates combine virulence and multidrug resistance in flap infection following leech therapy. *Clin Microbiol Infect.* 26, 793-794.
- Cambray, G., Guerout, A.M., Mazel, D., 2010. Integrons. *Annu Rev Genet.* 44, 141-166.
- Carnelli, A., Mauri, F., Demarta, A., 2017. Characterization of genetic determinants involved in antibiotic resistance in *Aeromonas* spp. and fecal coliforms isolated from different aquatic environments. *Res Microbiol.* 168, 461-471.
- Cizek, A., Dolejska, M., Sochorova, R., Strachotova, K., Piackova, V., Vesely, T., Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Vet Microbiol.* 142, 435-439.
- CLSI, 2020. VET03 Methods for antimicrobial broth dilution and disk diffusion susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, pp. 122.
- Deng, Y., Wu, Y., Jiang, L., Tan, A., Zhang, R., Luo, L., 2016. Multi-drug resistance mediated by class 1 integrons in *Aeromonas* isolated from farmed freshwater animals. *Front Microbiol.* 7, 935.
- Dhanapala, P.M., Kalupahana, R.S., Kalupahana, A.W., Wijesekera, D.P.H., Kottawatta, S.A., Jayasekera, N.K., Silva-Fletcher, A., Jagoda, S., 2021. Characterization and antimicrobial resistance of environmental and clinical *Aeromonas* species isolated from fresh water ornamental fish and associated farming environment in Sri Lanka. *Microorganisms.* 9.
- ECDC, EFSA, EMA, 2017. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA J.* 15, e05017.
- European Food Safety, A., European Centre for Disease, P., Control, 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J.* 17, e05598.

- Floug, Q., Sinna, R., Fillatre, A., Plesiat, P., Hamdad, F., 2019. A case of leech-associated infection involving an extended-spectrum beta-lactamase-producing and extensively drug-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Clin Microbiol Infect.* 25, 394-395.
- FVE, 2016. Antimicrobial use in food-producing animals. Replies to EFSA/EMA questions on the use of antimicrobials in food-producing animals in EU and possible measures to reduce antimicrobial use., pp. 91.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269-1279.
- Gomes, S., Fernandes, C., Monteiro, S., Cabecinha, E., Teixeira, A., Varandas, S., Saavedra, M.J., 2021. The role of aquatic ecosystems (River Tua, Portugal) as reservoirs of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. *Water.* 13, 698.
- Gonzalez-Zorn, B., Escudero, J.A., 2012. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int Microbiol.* 15, 101-109.
- Grilo, M., Sousa-Santos, C., Robalo, J., Oliveira, M., 2020. Potential of *Aeromonas* spp. from wildlife as antimicrobial resistance indicators in aquatic environments. *Food and Agriculture Organization of the United States.* 115v.
- Gustafson, C.E., Thomas, C.J., Trust, T.J., 1992. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Appl Environ Microbiol.* 58, 3816-3825.
- Jacobs, L., Chenia, H.Y., 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol.* 114, 295-306.
- Kahlmeter, G., Turnidge, J., 2022. How to: ECOFFs-the why, the how, and the don'ts of EUCAST epidemiological cutoff values. *Clin Microbiol Infect.*
- Khan, I.U.H., Loughborough, A., Edge, T.A., 2009. DNA-based real-time detection and quantification of aeromonads from fresh water beaches on Lake Ontario. *Journal of Water and Health.* 7, 312-323.
- L'Abée-Lund, T.M., Sorum, H., 2001. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb Drug Resist.* 7, 263-272.
- Lamy, B., Laurent, F., Kodjo, A., 2010. Validation of a partial *rpoB* gene sequence as a tool for phylogenetic identification of aeromonads isolated from environmental sources. *Can J Microbiol.* 56, 217-228.
- Lamy, B., Baron, S., Barraud, O., 2022. *Aeromonas*: the multifaceted middleman in the One Health world. *Curr Opin Microbiol.* 65, 24-32.
- Lee, M.F., Peng, C.F., Lin, Y.H., Lin, S.R., Chen, Y.H., 2008. Molecular diversity of class 1 integrons in human isolates of *Aeromonas* spp. from southern Taiwan. *Jpn J Infect Dis.* 61, 343-349.
- Mader, R., Damborg, P., Amat, J.P., Bengtsson, B., Bourelly, C., Broens, E.M., Busani, L., Crespo-Robledo, P., Filippitzi, M.E., Fitzgerald, W., Kaspar, H., Madero, C.M., Norstrom, M., Nykasenoja, S., Pedersen, K., Pokludova, L., Urdahl, A.M., Vatopoulos, A., Zafeiridis, C., Madec, J.Y., Eu, J., 2021. Building the European Antimicrobial Resistance Surveillance network in veterinary medicine (EARS-Vet). *Euro Surveill.* 26.
- Maravic, A., Skocibusic, M., Samanic, I., Fredotovic, Z., Cvjetan, S., Jutronic, M., Puizina, J., 2013. *Aeromonas* spp. simultaneously harbouring *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{PER-1} and *bla*_{FOX-2}, in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Adriatic Sea, Croatia. *Int J Food Microbiol.* 166, 301-308.
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 4, 608-620.
- Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2016. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Dis Aquat Organ.* 120, 49-68.
- Mendes Moreira, A., Couvé-Deacon, E., Bousquet, P., Chainier, D., Jové, T., Ploy, M.C., Barraud, O., 2019. Proteae: a reservoir of class 2 integrons? *J Antimicrob Chemother.* 74, 1560-1562.

- Miyata, M., Inglis, V., T., A., 1996. Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction Aquaculture. 141,13-24.
- Ndi, O.L., Barton, M.D., 2011. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. J Fish Dis. 34, 589-599.
- Nguyen, H.N., Van, T.T., Nguyen, H.T., Smooker, P.M., Shimeta, J., Coloe, P.J., 2014. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam. Vet Microbiol. 171, 397-405.
- Otero-Olarra, J.E., Curiel-Quesada, E., Baltazar-Cruz, J., Aguilera-Arreola, M.G., Perez-Valdespino, A., 2020. Low cassette variability in class 2 and class 1 integrons of *Aeromonas* spp. isolated from environmental samples. Microb Drug Resist. 26, 794-801.
- Ranjbar, R., Salighehzadeh, R., Sharifiyazdi, H., 2019. Antimicrobial resistance and incidence of integrons in *Aeromonas* species isolated from diseased freshwater animals and water samples in Iran. Antibiotics (Basel). 8.
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredia, S., de Verdal, H., Gozlan, R.E., 2020. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. Nat Commun. 11, 1870.
- Rivera, I.G., Chowdhury, M.A., Huq, A., Jacobs, D., Martins, M.T., Colwell, R.R., 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. Appl Environ Microbiol. 61, 2898-2904.
- Sarria-Guzman, Y., Lopez-Ramirez, M.P., Chavez-Romero, Y., Ruiz-Romero, E., Dendooven, L., Bello-Lopez, J.M., 2014. Identification of antibiotic resistance cassettes in class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.). Curr Microbiol. 68, 581-586.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Larsen, J.L., 2001. Incidence, distribution, and spread oftetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. Appl Environ Microbiol. 67, 5675-5682.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Larsen, J.L., Dalsgaard, I., 2001. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. J Antimicrob Chemother. 47, 735-743.
- Stalder, T., Barraud, O., Jove, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. ISME J. 8, 768-777.
- Usui, M., Tagaki, C., Fukuda, A., Okubo, T., Boonla, C., Suzuki, S., Seki, K., Takada, H., Tamura, Y., 2016. Use of *Aeromonas* spp. as general indicators of antimicrobial susceptibility among bacteria in aquatic environments in Thailand. Front Microbiol. 7, 710.
- Varela, A.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2016. Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater. Sci Total Environ. 542, 665-671.
- Vega-Sanchez, V., Latif-Eugenin, F., Soriano-Vargas, E., Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, M.G., Castro-Escarpulli, G., 2014. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and beta-lactamase genes. Vet Microbiol. 172, 528-533.
- Wallace, I.S., McKay, P., Murray, A.G., 2017. A historical review of the key bacterial and viral pathogens of Scottish wild fish. J Fish Dis. 40, 1741-1756.
- Yanez, M.A., Catalan, V., Apraiz, D., Figueras, M.J., Martinez-Murcia, A.J., 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 53, 875-883.
- Zhang, D., Xu, D.H., Shoemaker, C., Hemstreet, W., 2016. Virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Global Aquaculture Alliance.

Figure 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) probability density, box plot and scatter plot by fish category (WF: wild fish; FF: farmed fish; DF: diseased fish) according to integrons presence (orange) or absence (green). Each dot represents the jittered MIC value of an *Aeromonas* isolate.

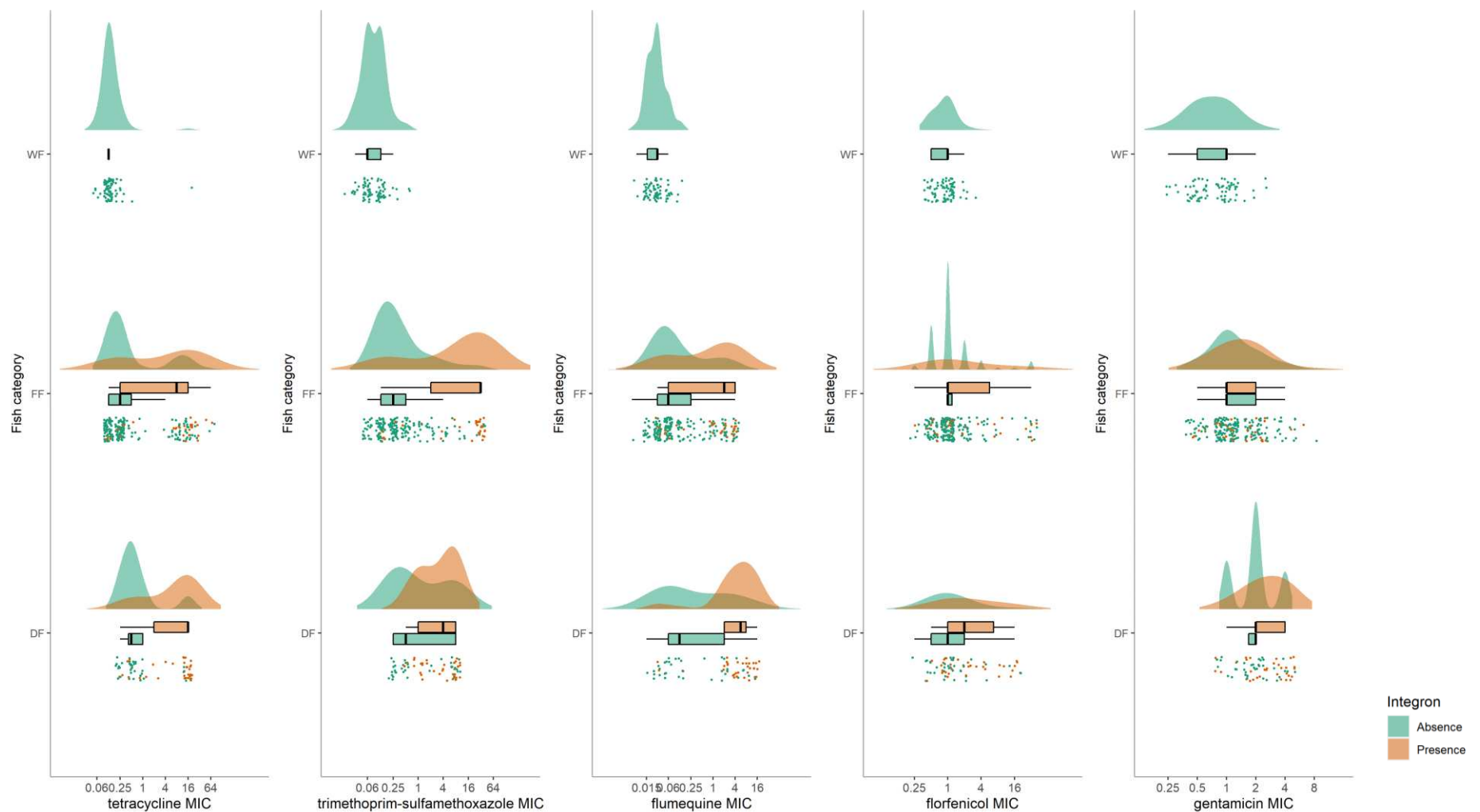


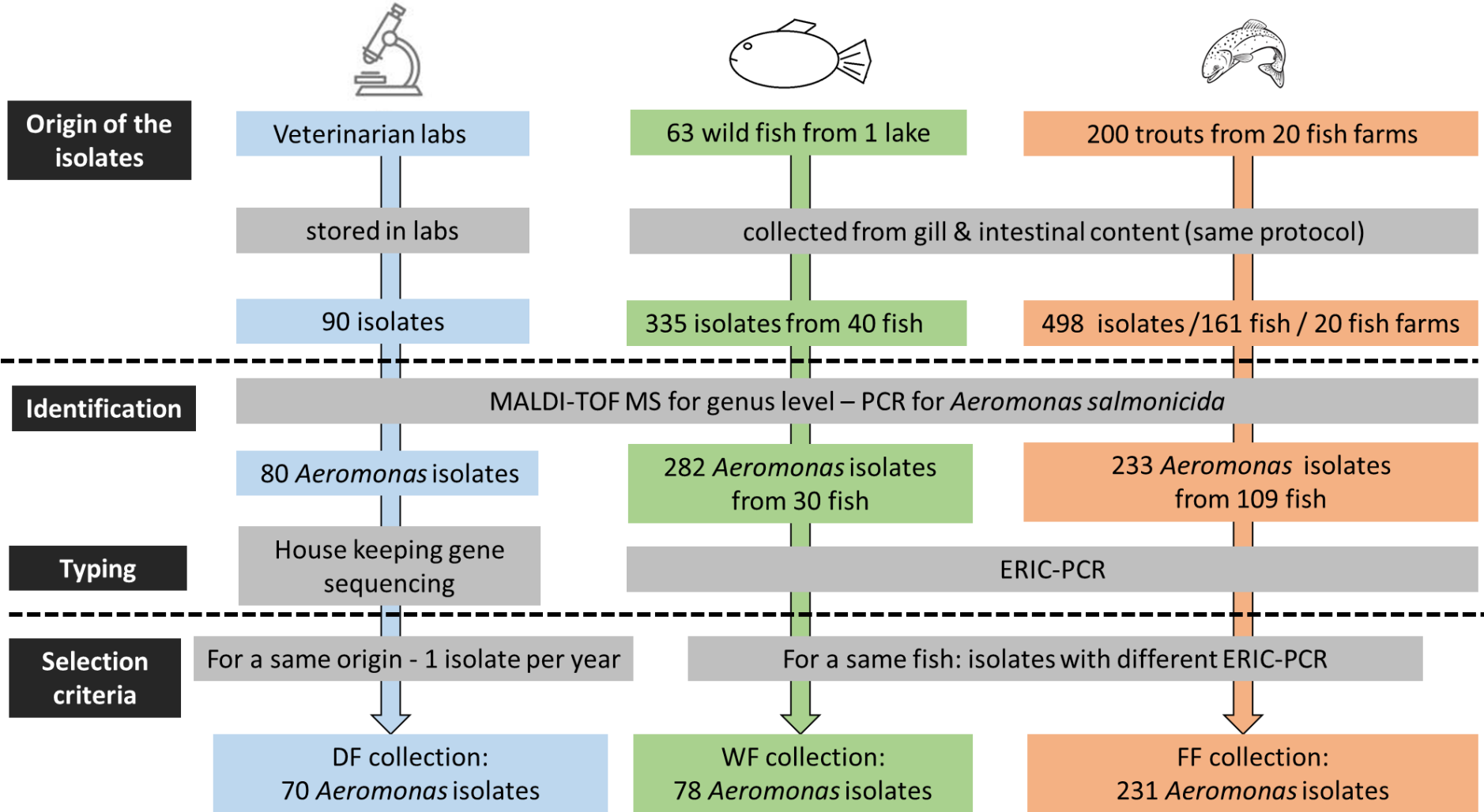
Table 1: Integrons detected from *Aeromonas* collections

Fish category (number of isolates)	<i>Aeromonas salmonicida</i> (n=39)		<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i> (n=340)		All <i>Aeromonas</i> (n=379)	
	<i>Integron</i> <i>positive</i>	<i>Integron</i> <i>negative</i>	<i>Integron</i> <i>positive</i>	<i>Integron</i> <i>negative</i>	<i>Integron</i> <i>positive</i>	<i>Integron</i> <i>negative</i>
Wild Fish – WF (n=78)	0	0	0	78	0	78
Farmed fish – FF (n=231)	0	0	35	196	35	196
Diseased fish – DF (n=70)	25*	14	9	22	34*	36
Total (n=379)	25*	14	44	296	69*	310

*includes the only class 2 integron



Figure S1: Flow chart of *Aeromonas* isolates retrieved from the 3 fish collections



ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR; MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry



Table S1: MIC₅₀ and p-values of Mann-Whitney U test to compare MIC distributions of strains depending on the fish category and/or the presence or absence of integrons (cells in grey are not significant, considering a significance level of 95% and a Holm-Bonferroni correction for multiple tests)

antimicrobial	Fish category	integron	MIC ₅₀	WF	FF			DF		
				all=no integron	all	no integron	integron	all	no integron	integron
tetracycline	WF	absent	0.125	-	0*	1.33E-14	-	0*	5.55E-16	-
	FF	absent	0.25	0*	-	-	-	1.06E-09	-	-
		present	8	1.33E-14	-	3.45E-06	-	-	2.02E-05	4.00E-01
	DF	absent	1	0*	1.06E-09	-	-	-	-	-
		present	0,5 16	5.55E-16	-	2.02E-05	-	4.00E-01	-	8.84E-07
	trimethoprim-sulfamethoxazole	WF	absent	0.06	-	6.66E-16	1.33E-15	-	0*	9.99E-16
FF		absent	0.25	6.66E-16	-	-	-	2.34E-09	-	-
		present	32	1.33E-15	-	3.06E-10	-	-	2.72E-06	2.48E-03
DF		absent	2	0*	2.34E-09	-	-	-	-	-
		present	0,5 4	9.99E-16	-	2.72E-06	-	2.48E-03	-	3.08E-03
flumequine		WF	absent	0.03	-	4.44E-16	2.13E-14	-	8.88E-16	6.91E-11
	FF	absent	0.06	4.44E-16	-	-	-	3.79E-10	-	-
		present	2	2.13E-14	-	7.27E-06	-	-	1.11E-02	8.26E-06
	DF	absent	2	8.88E-16	3.79E-10	-	-	-	-	-
		present	0.12 6	6.91E-11	-	1.11E-02	-	8.26E-06	-	1.86E-06
	florfenicol	WF	absent	1	-	3.30E-03	7.89E-03	-	2.40E-05	1.17E-01
FF			1	3.30E-03	-	-	-	3.01E-02	-	-



		absent	1	7.89E-03	-	-	1.66E-01	-	8.67E-01	-
		present	1	-	-	1.66E-01	-	-	-	1.42E-01
	DF		1	2.40E-05	3.01E-02	-	-	-	-	-
		absent	1	1.17E-01	-	8.67E-01	-	-	-	2.12E-03
		present	2	-	-	-	1.42E-01	-	2.12E-03	-
gentamicin	WF	absent	1	-	9.21E-13	8.52E-12	-	1.33E-15	1.96E-13	-
	FF		1	9.21E-13	-	-	-	5.70E-13	-	-
		absent	1	8.52E-12	-	-	1.93E-01	-	2.82E-06	-
		present	1	-	-	1.93E-01	-	-	-	1.44E-05
	DF		2	1.33E-15	5.70E-13	-	-	-	-	-
		absent	2	1.96E-13	-	2.82E-06	-	-	-	1.43E-02
		present	2	-	-	-	1.44E-05	-	1.43E-02	-

*: p-value <1.0E-16.

Table S2: Integrons and associated gene cassette arrays detected from *Aeromonas* isolates. FF: farmed fish; DF: diseased fish; *aadA1*, *aadA2*: encode resistance to streptomycin/spectinomycine; *dfrA*, *dfrB*: encode resistance to trimethoprim; *catB*: encode resistance to phenicols; *qac*: confers resistance to quaternary ammonium compounds; *gcu*: gene cassette of unknown function; *orf*: open reading frame; IS: insertion sequence.

Isolate identification	Fish collection	<i>Aeromonas</i> species	Integron	Gene cassette array
3-F-9	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aad1-catB2</i>
3-F-4	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA14</i>
3-F-6	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA14</i>
4-B-15	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>catB2</i>
4-B-3	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	No gene cassette array
4-B-8	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	No gene cassette array
4-B-6	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>catB3-aadA1</i>
6-F-3	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	No gene cassette array
6-F-5	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	No gene cassette array
6-B-7	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
6-F-12	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aad1-catB2</i>
7-F-2	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA12-gcuF-aadA2</i>
11-B-7	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
11-B-8	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	No gene cassette array
12-M-1	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-aadA1</i>
12-M-7	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-aadA1</i>
12-B-10	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
12-B-11	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aad1-catB2</i>
14-M-3	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	IS30- <i>qacE</i>
14-M-4	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	IS30- <i>qacE</i>
14-M-6	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	IS30- <i>qacE</i>
14-B-5	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	IS30- <i>qacE</i>
14-M-8	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	IS30- <i>qacE</i>



14-M-10	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aadA1</i>
15-B-3	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
15-B-15	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	No gene cassette array
15-F-8	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
16-B-2	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
16-M-4	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aad1-catB2</i>
16-M-6	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-aadA1</i>
16-B-8	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA14</i>
16-F-9	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-aadA1</i>
16-B-15	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
16-F-15	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 2	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>
3-F-13	FF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1-catB2</i>
10/A/645	DF	<i>Aeromonas</i> spp <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
11/A/657	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
13/A/734	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
14/A/760	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-aadA1</i>
14/A/798	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aadA1-catB2</i>
7/A/614	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aadA1-catB2</i>
8/A/622	DF	<i>Aeromonas</i> spp <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
12/A/688	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
13/A/733	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-aadA1</i>
7/A/616	DF	<i>Aeromonas</i> spp <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
7/A/619	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-orfC</i>
8/A/625	DF	<i>Aeromonas</i> spp <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
9/A/630	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
11/A/652	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
12/A/675	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
14/A/756	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
9/A/639	DF	<i>Aeromonas</i> spp <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
6/A/609	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA1-aadA1</i>
7/A/621	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
8/A/623	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
9/A/629	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
10/A/641	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
11/A/667	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
14/A/765	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
11/A/656	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>

6/A/608	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA12-gcuF-aadA2</i>
12/A/692	DF	<i>Aeromonas</i> spp <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
11/A/658	DF	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Class 1	<i>aadA1</i>
6/A/818	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	Not determined
13/A/727	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aadA1</i>
14/A/811	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aadA1</i>
6/A/605	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	No gene cassette array
6/A/821	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrB1-aadA1</i>
6/A/823	DF	<i>Aeromonas</i> spp non <i>salmonicida</i>	Class 1	<i>dfrA12-gcuF-aadA2</i>

II.2. Case report

Nous venons de voir que les *Aeromonas* jouent un rôle important dans la dissémination de la résistance au sein de l'animal notamment du poisson mais il arrive parfois que ces souches puissent infecter l'Homme, ce qui montre une nouvelle fois l'implication des *Aeromonas* au sein du concept « *One Health* ».

Lors d'une précédente étude, une recherche d'intégrons a été réalisée sur une autre collection de souches d'*Aeromonas* d'origines différentes. Les intégrons ont été détectés et séquencés avec la même méthodologie que dans l'article ARMANI.

Parmi tous les intégrons détectés et étudiés, l'un d'eux s'est démarqué par la singularité de sa région variable. En effet l'analyse bioinformatique a révélé la présence d'un nouveau réseau de cassettes jamais décrit auparavant ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>). Il est constitué de sept cassettes avec huit gènes de résistance conférant des résistances aux aminosides (*aacA16*, *aadA1* et *aadB*), aux β -lactamines (*bla_{OXA-10}*, *bla_{VEB-1}*), au triméthoprime (*dfrA14*), au chloramphénicol (*cmIA5*) et à la rifampicine (*arr-2*). Parmi les cassettes qui composent ce réseau, l'une d'entre elles (la cassette en quatrième position) a la particularité d'être composée de deux gènes, c'est-à-dire que les gènes sont fusionnés et qu'il y a une absence de site *attC* entre les deux gènes. De ce fait, les deux gènes sont mobilisés en même temps lors des événements d'excision/insertion. L'intégron a été détecté dans une souche d'*Aeromonas veronii* qui avait été isolée d'un patient du CHU de Montpellier infecté suite à une hirudothérapie (thérapie par les sangsues).

Ces résultats ont fait l'objet d'un poster présenté à l'ECCMID en 2018 et d'une lettre publiée dans le journal *Clinical Microbiology and Infection* en juin 2020 pour laquelle je suis 3^{ème} auteure. J'ai réalisé le séquençage et identifié ce nouveau réseau de cassettes d'intégron de classe 1.



Letter to the Editor

It takes two to tango: two *Aeromonas* isolates combine virulence and multidrug resistance in flap infection following leech therapyO. Barraud^{1,†}, A. Robert^{2,3,†}, L. Laval¹, R. Ruimy^{2,4}, D. Morquin^{5,6}, L. Boyer^{2,**}, B. Lamy^{2,4,*}¹INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Université de Limoges, Limoges, France²Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France³Intensive Care Unit, CHU de Nice, Nice, France⁴Laboratoire de Bactériologie, CHU de Nice, Nice, France⁵Infectious Diseases Department, Montpellier Teaching Hospital, Montpellier, France⁶UMI 233 TransVIHMI, University of Montpellier, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2019

Received in revised form

4 December 2019

Accepted 30 December 2019

Available online 9 January 2020

Editor: S. Malhotra-Kumar

To the editor,

Leech therapy is a common salvage treatment for plastic, reconstructive and trauma surgery, but the drawback is a risk of infectious complications [1]. Most infections are caused by an obligate bacterial symbiont of the crop of leeches, *Aeromonas* sp., a ubiquitous Gram-negative bacterium at the interface of the human, animal and environmental ecosystems. Here, we describe a flap infection following leech therapy mediated by two *Aeromonas veronii* isolates presenting complementary and synergistic features in multidrug resistance and in virulence that led to a more severe infection, as shown in an animal model.

In 2014, an overweight patient (BMI 39 kg/m²) was treated at Montpellier University Hospital (France) with a breast reconstruction flap that was required after curative treatment of breast cancer

by mastectomy, radiotherapy and antitumor chemotherapy. The patient received amoxicillin plus clavulanate H12 post-surgery. On day 2 post-surgery, the flap exhibited congestion and superficial necrosis without local inflammation and fever. Leech therapy was used to treat the flap venous congestion, and ciprofloxacin (500 mg twice daily) was administered as prophylactic treatment. On day 3, the patient was febrile (39 °C), the C-reactive protein value was 240 mg/L, and necrosis progressed to necrotizing cellulitis. The patient was given an empirical intravenous treatment of piperacillin + tazobactam and linezolid. On day 7, leech therapy and ciprofloxacin prophylactic treatment were stopped. After a transient improvement, the patient again became febrile (>39.5 °C) on day 8 with an unfavourable flap aspect. The CT scan was consistent with severe infection, although no collection was evident. Medical treatment *per se* failed to cure the patient, and several surgeries that included excision of the necrotized tissue and negative-pressure wound therapy were performed from day 14 to day 21. Meanwhile, treatment was switched to imipenem for 3 days (days 14–17) until microbiological results were available. Culture of the infected flap was positive with two distinct isolates that were identified as *Aeromonas veronii* using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, LR-14-3 and LR-14-4. Isolates exhibited distinct antimicrobial susceptibility profiles, and whole genome sequence analysis using the Illumina technology (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) was used to confirm strain identification and their affiliation to distinct clusters [2]. LR-14-3 was multidrug resistant, produced an extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and was also resistant to fluoroquinolones and aminoglycosides. LR-14-4 presented acquired resistance to fluoroquinolones only. The patient was finally treated with cefepime, metronidazole and gentamicin (days 17–21) then with cefepime and metronidazole (days 21–25). The patient was discharged on day 28 with negative-pressure wound therapy and cefepime, which was continued until day 50. The patient healed after a new graft was placed on day 80.

* Corresponding author. B. Lamy, Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France.

** Corresponding author. L. Boyer, Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France.

E-mail addresses: boyerl@unice.fr (L. Boyer), brigitte_lamy@yahoo.fr (B. Lamy).

† OB and AR contributed equally to this article.

Genomes of the two distinct *A. veronii* isolates were further analysed. In addition to the presence of the ESBL-encoding *bla*_{VEB-1} gene, LR-14-3 encoded several other antibiotic-resistance genes (ARGs), most of which were part of a novel chromosomal class 1 integron (see Supplementary material, Fig. S1). Among the bacterial genetic elements involved in antibiotic resistance, class 1 integrons play a key role because of their ability to promote the acquisition, dissemination and expression of ARGs [3]. With eight ARGs embedded into seven gene cassettes, the 8-kb class 1 integron retrieved in LR-14-3 is one of the longest ever described (<http://integrall.bio.ua.pt/>), as class 1 integrons often have two or three gene cassettes. Regarding resistance to fluoroquinolones, chromosomal mutations in GyrA (S83I) and ParC (S80I) were present as well as the *qnrS2* gene, located on a 15-kb IncU plasmid. LR-14-4 exhibited no ARG with the exception of the *qnrS2* gene, but chromosomal mutations in GyrA (S83I) and ParC (E84K) were present. LR-14-3 and LR-14-4 were both resistant to fluoroquinolones, thereby evading ciprofloxacin-based prophylactic treatment. Antimicrobial resistance has increased to a dramatic extent and is now a public health threat in humans, animals and the environment, requiring the adoption by health authorities of a *One-Health* approach (<https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>). This threat is particularly true for Gram-negative bacteria with the expansion of ESBL- or carbapenemase-producing enterobacteria. Leech-associated infections are an emblematic example of connected ecosystems. As recently highlighted, environmental selective pressure favours leech colonization by ciprofloxacin-resistant aeromonads that further cause infection following leech therapy [2].

To investigate the virulence of LR-14-3 and/or LR-14-4, we used an *in vivo* model of *Drosophila melanogaster* [4]. Flies rely only on innate immunity to survive infections, and this model is consistent with the flap infection situation because first, flaps are locally immunosuppressed tissues as a result of impaired vascularization; second, the leech creates a wound with its jaws and regurgitates aeromonads into the flap (similar to an injection); and last, because innate immunity is evolutionarily conserved between fly and human. The virulence potential was assessed for LR-14-3, LR-14-4 and the mixture LR-14-3/LR-14-4 (Fig. 1). All analyses showed that the virulence of LR-14-3 did not significantly differ from that of LR-14-4, but the mixture displayed enhanced virulence ($p < 0.0001$). Altogether, these results suggest that the outcome of the infection may have been worsened by an interplay between the two isolates,

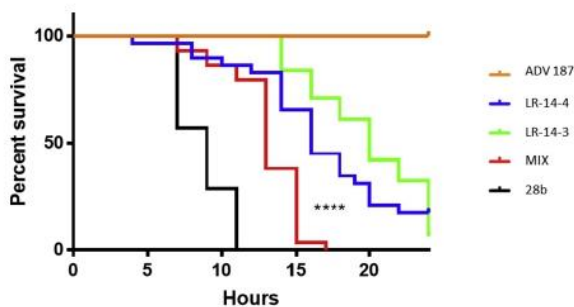


Fig. 1. Virulence analysis of the two *Aeromonas* isolates recovered from flap infection using a *Drosophila melanogaster* infection model, $n = 30$ flies representative of three independent experiments. The bacterial density in suspension (average of 1.2×10^9 CFU/mL) was equal for the mixture and for the isolates alone. Adult (3–5 days old) male wild-type flies were infected by pricking with a tungsten needle dipped into the bacterial suspension, which resulted in an inoculum of $1.4 \pm 0.3 \times 10^3$ CFU in the fly body. *Aeromonas veronii* LR-14-3 (green), *Aeromonas veronii* LR-14-4 (blue), *Escherichia coli* ADV187 (negative control, orange), *Aeromonas dhakensis* 28b (positive control, black) and mixture of LR-14-3 + LR-14-4 at a ratio of 1:1 (red). **** $p < 0.0001$ (Log-rank Mantel-Cox test).

resulting from both the antimicrobial failure and the enhanced virulence of the bacterial mixture. Complex interplay between pairs of aeromonad strains consistent with our observation, either based on cooperation or competition, has recently been highlighted [5]. This situation may not be exceptional because such infections are frequently polymicrobial, and this condition may explain at least in part why flap loss occurs so rapidly.

This case report highlights the potential of leeches as vectors of bacteria harbouring multiple ARGs in a *One health* world subjected to antimicrobial selective pressure. The genus *Aeromonas*, which has a high capacity to acquire ARGs, constitutes an ARG reservoir and contributes to ARG dissemination because this genus is connected to human and animal settings and to the environment. Although we usually focus on multidrug resistance profiles to explain more deleterious infections, our results suggest the contribution of another factor related to the polymicrobial condition that results in bacterial cross-talk and synergy of virulence. This case is emblematic of the complexity of these kinds of infections the prevention of which should require a holistic approach.

Transparency declaration

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the Fondation pour la Recherche médicale (FRM) grant n° DEA20170839106, France to AR and by grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France.

Acknowledgements

We thank Margaux Gaschet for her technical assistance and Alissa Majoor for English editing. We thank Luc Teot, Marie-Cécile Ploy, Joerg Graf, Sandrine Baron and Raphael Masson for assistance. Part of this work was presented at the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2018), Madrid, Spain (Poster P1510) and at the international Conférences Jacques Monod Integrated insect immunology: controlling infections (Roscoff, 24–28 June 2019).

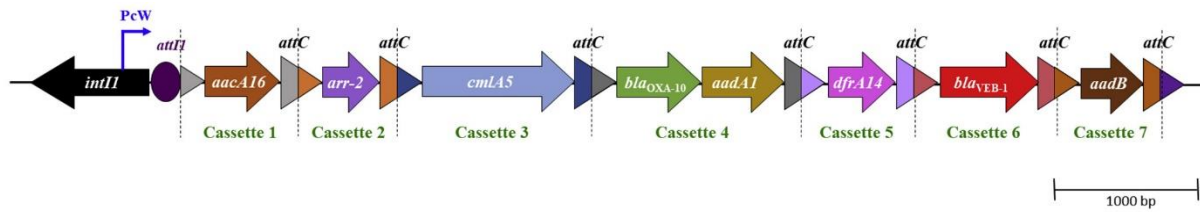
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.12.021>.

References

- [1] Herlin C, Bertheuil N, Bekara F, Boissiere F, Sinna R, Chaput B. Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. *Ann Chir Plast Esthétique* 2017;62:e1–13.
- [2] Beka I, Fullmer MS, Colston SM, Nelson MC, Talagrand-Reboul E, Walker P, et al. Low-level antimicrobials in the medicinal leech select for resistant pathogens that spread to patients. *MBio* 2018;9.
- [3] Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet* 2010;44:141–66.
- [4] Boyer L, Magoc L, Dejardin S, Cappilino M, Paquette N, Hinault C, et al. Pathogen-derived effectors trigger protective immunity via activation of the Rac2 enzyme and the IMD or Rip kinase signaling pathway. *Immunity* 2011;35:536–49.
- [5] Mosser T, Talagrand-Reboul E, Colston SM, Graf J, Figueras MJ, Jumas-Bilak E, et al. Exposure to pairs of *Aeromonas* strains enhances virulence in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Front Microbiol* 2015;6:1218.

Supplementary data



Figs1. Class 1 integron in *Aeromonas veronii* LR-14-3. *intI1*, integrase gene; PcW, weak cassette promoter; *attI1*, *attC*, recombination sites; *aacA16* encodes resistance to tobramycin and amikacin; *arr-2* encodes resistance to rifampin; *cmlA5* encodes resistance to chloramphenicol; fused gene cassette *bla_{OXA-10}/aadA1* encodes resistance to β -lactams and streptomycin-spectinomycin; *dfrA14* encodes resistance to trimethoprim; *bla_{VEB-1}* encodes an extended-spectrum β -lactamase; *aadB* encodes resistance to tobramycin and gentamicin.

Discussion

Sur le plan de la résistance aux antibiotiques, la quantification des intégrons de classe 1 dans les effluents est considérée aujourd'hui, y compris par les autorités, comme un bon marqueur de la pollution anthropique (Gillings et al., 2015; Stalder et al., 2014). L'objectif de ce travail de thèse était d'aller plus loin dans l'utilisation des intégrons comme marqueurs de la pollution anthropique via deux modèles et avec deux approches différentes. Dans un premier temps, d'une manière plutôt globale en recherchant les proportions relatives des cassettes des intégrons des trois principales classes présentes dans des effluents de centres de soins et dans des effluents d'abattoirs. Puis dans un deuxième temps, par une approche plus ciblée en recherchant des intégrons dans des souches d'*Aeromonas* isolées chez des poissons issus de populations de poissons soumises à différentes pressions de sélection antibiotique.

Dans la continuité d'un projet initié au laboratoire (projet CALYPSO historique), la première partie de cette thèse, qui a constitué la partie la plus importante de mon travail, a étudié le « cassetome » des intégrons de classe 1, 2 et 3 dans les effluents de différents types de centres de soins (projet CALYPSO Nouvelle-Aquitaine appelé également CALYPSO-NA) et dans les effluents d'abattoirs (projet ROSETA). La même méthodologie a été appliquée pour ces deux projets, méthodologie nouvellement développée par Jové *et al.* dans le projet CALYPSO historique pour décrire l'ensemble des cassettes portées par les intégrons présents dans une matrice, ici les effluents (Jové et al., 2022).

L'objectif principal du projet **CALYPSO-NA** était de faire un état des lieux de la composition en cassettes des intégrons des trois classes principales présents dans les effluents de différents types de centres de soins de la région Nouvelle-Aquitaine. Cette région est la plus grande de France en termes de superficie avec 84 061 km² et possède 122 hôpitaux publics et 55 cliniques privées. Dans ce projet, ce sont 34 établissements qui ont été prélevés avec une majorité (16/34) de CH. Les effluents des 3 CHU présents dans la région

ont été prélevés. Pour le CHU de Bordeaux, c'est le bâtiment principal qui a été prélevé mais également le bâtiment de l'hôpital pédiatrique qui présente une activité différente du fait de la prise en charge de ces patients. Le CHU de Limoges a lui aussi été prélevé dans deux bâtiments différents, en effet le CHU de Limoges s'est étendu avec l'ouverture d'un nouveau bâtiment (Dupuytren 2) ouvert au printemps 2019. En ce qui concerne les autres centres de soins, la représentativité dans les centres hospitaliers était bonne avec 16 établissements, celle des autres types d'établissement était plus limitée avec cinq cliniques, cinq SSR, deux EHPAD et un centre thermal. Au niveau géographique, la répartition des 34 établissements était bonne. En effet au minimum un établissement de ce projet est présent dans chacun des douze départements qui composent cette région. Les deux établissements les plus éloignés se trouvent ainsi à près de 500 km de distance. Malgré les différences d'activités de ces différents centres de soins, l'analyse PCoA n'a pas montré de clusters entre les différents types de centres de soins, ni en termes de localisation géographique, que ce soit pour les intégrons de classe 1, de classe 2 ou de classe 3. Ce résultat nous suggère donc que les centres les plus importants en termes de lits (CHU) rejettent dans leurs eaux usées à peu près les mêmes cassettes et les mêmes gènes de résistance portés par des intégrons, que les centres de soins de plus petite taille. Cette étude étant une étude qualitative, les quantités absolues de ces gènes de résistance n'ont pas été investiguées, seules leurs proportions relatives par rapport à l'ensemble des cassettes l'ont été. Cependant, au sein du laboratoire, les travaux de thèse de Thibault Stalder avaient quantifié les intégrons dans différents effluents anthropiques et montré une abondance relative des gènes de l'intégrase de classe 1 (*int1/16S*) plus importante dans les effluents hospitaliers (Stalder, 2012). Il serait alors intéressant de quantifier à notre tour les intégrons des trois classes principales pour évaluer les possibles différences entre les différents centres de soins.

Cette étude a montré que le « cassetome » des effluents de centre de soins était différent entre les trois classes principales d'intégrons, même si pour les intégrons de classe 1 et 3, ils étaient majoritairement composés de cassettes conférant des résistances aux aminosides et

aux β -lactamines. De plus la diversité en cassettes dans les intégrons de classe 1 était plus forte comparée aux intégrons de classe 3 ; enfin ce sont les intégrons de classe 2 qui présentaient le moins de diversité dans leur « cassetome », supposant une stabilité des réseaux de cassettes dans ces intégrons comparés aux intégrons des autres classes, ce qui est cohérent par rapport aux descriptions nombreuses d'intégrons de classe 2 à partir de souches bactériennes avec une intégrase *IntI2* non fonctionnelle et un réseau de cassettes très stable (Hansson et al., 2002).

L'analyse du « cassetome » des intégrons de classe 1 dans les rejets de centres de soins a montré une prédominance des gènes de résistance aux aminosides. Le gène *aacA4*, également appelé *aac(6')-Ib*, est le seul gène présent chez la totalité des effluents des centres de soins et il était majoritaire pour tous les effluents, excepté pour l'EHPAD E2. Il a précédemment été décrit de très nombreuses fois dans des effluents hospitaliers (Anssour et al., 2014; Guo et al., 2011; Stalder et al., 2014). Ce gène confère une résistance à la tobramycine et à la gentamicine qui sont les seules molécules aminosides délivrées à l'hôpital avec l'amikacine et la nétilmicine (Robert et al., 2017; Société de Pathologie and Infectieuse de Langue Française, 2011). Une corrélation significative entre ce gène et les établissements consommateurs d'aminosides a été montrée. Mais c'était également le cas pour les établissements qui sont de forts consommateurs de β -lactamines et de fluoroquinolones indiquant une probable co-sélection. D'autres gènes de résistance aux aminosides étaient également très fréquemment présents dans les « cassetomes » des intégrons de classe 1, tels que les gènes *aadA1* et *aadA2*. Ces derniers ont déjà été décrits au sein des intégrons de classe 1 dans des effluents hospitaliers (Vaz-Moreira et al., 2016), ainsi que dans de très nombreuses souches bactériennes. La deuxième résistance majoritaire se trouvait être les gènes de résistance aux β -lactamines avec une prédominance pour les cassettes *bla_{OXA}* et plus spécifiquement *bla_{OXA-10}* qui codent des oxacilinasés. Au sein du resistome des effluents hospitaliers, les oxacilinasés sont très présentes (Marathe et al., 2019; Surleac et al., 2020). Cependant le variant *bla_{OXA-10}* n'a jamais été présenté comme un gène majoritaire dans le

résistome des effluents hospitaliers. Les métallo- β -lactamases telles que les gènes *bla_{VIM}* ont également été retrouvées dans les « cassettes » des intégrons de classe 1 mais en plus faible proportion. Ces cassettes sont souvent détectées au sein d'intégrons de classe 1 issus de souches cliniques (Villa et al., 2017, 2014) ou d'effluents (Pérez-Viso et al., 2021; Vaz-Moreira et al., 2016). De plus ils sont le plus souvent décrits en association avec le gène *aacA4* au sein des réseaux de cassettes des intégrons de classe 1 ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>). Comme évoqué précédemment, la diversité des « cassettes » de classe 1 est riche et présente donc de nombreux gènes de fonctions diverses. Parmi les gènes de résistance autres que ceux aux aminosides et aux β -lactamines, on retrouve plusieurs gènes de résistance au triméthoprimé dont le gène *dfrA12*. Une corrélation a été montrée entre ce gène et un gène de fonction inconnu, *gcuF*. Cette association a de nombreuses fois été décrites dans les intégrons de classe 1 avec une association au sein d'un réseau de cassettes de type *dfrA12-gcuF-aadA2* ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>). Étonnamment, une nouvelle association jamais décrite a été montrée dans cette étude, entre le gène *fosL* et les gènes *dfrA12* et *gcuF* ("INTEGRALL," <http://integrall.bio.ua.pt/>) indiquant que de nouveaux réseaux de cassettes d'intégrons de classe 1 sont encore à décrire. L'absence de corrélation avec la cassette *aadA2* suggère que celle-ci n'est pas seulement associée aux cassettes *dfrA12-gcuF*. Les cassettes de résistances aux antibiotiques sont majoritaires dans les « cassettes » des intégrons de classe 1 mais une proportion non négligeable de gènes de résistance aux ammoniums quaternaires, les cassettes *qac*, étaient présentes dans ces « cassettes », ce qui là aussi est commun chez les intégrons de classe 1 (Gillings et al., 2009). Les ammoniums quaternaires sont des molécules présentes dans les détergents de surface utilisés notamment dans le milieu hospitalier. Dans l'environnement, ce sont principalement les gènes *qacE* qui ont été décrits en proportions variables (43% à 95%) (Gaze et al., 2005; Rosser and Young, 1999) ; pourtant dans notre étude, c'est le gène *qacF* qui était le plus prévalent. Ce dernier a rarement été détecté dans les intégrons de classe 1 (Ploy et al., 1998).

Comme évoqué précédemment, le « cassetome » des intégrons de classe 2 était lui très peu diversifié et bien différent de celui des intégrons de classe 1 ou 3. En effet il était composé majoritairement de trois cassettes *dfrA1*, *sat2* et *aadA1* conférant respectivement des résistances au triméthoprim, à la streptothricine, et à la streptomycine/spectinomycine. Ces trois cassettes représentaient au minimum $\frac{3}{4}$ des « cassetomes », voire le plus souvent la quasi-totalité du « cassetome ». Ceci est en cohérence avec le fait que la plupart des intégrons de classe 2 possèdent une intégrase IntI2 non fonctionnelle en raison de la présence d'un codon STOP (Hansson et al., 2002). Par conséquent, l'intégrase IntI2 n'est pas dans la capacité de réaliser des réarrangements de cassettes, ce qui conduit à un réseau de cassettes très stable (Hansson et al., 2002). Cependant, d'autres cassettes ont auparavant déjà été décrites au sein des intégrons de classe 2 lorsque l'intégrase était fonctionnelle (Barlow and Gobius, 2006; Biskri and Mazel, 2003; Ramírez et al., 2005a, 2005b). Le gène *estX* a été trouvé dans une majorité (25/34) de Top10 (les dix principales cassettes du « cassetome ») d'effluents de centres de soins. Ce gène a précédemment été décrit en première position du réseau de cassette d'intégrons de classe 2 suivi des gènes *sat2-aadA1* (Kadlec and Schwarz, 2008). Des nouvelles cassettes GCLIM ont été détectés dans ces « cassetomes » et notamment les cassettes GCLIM-U187 et GCLIM-C36 présentes dans respectivement 21 et 19 Top10 de centres de soins indiquant la possibilité de nouveaux réseaux de cassettes d'intégrons de classe 2 jamais décrits avec ces deux nouvelles cassettes.

A l'image des « cassetomes » des intégrons de classe 1, ceux des intégrons de classe 3 étaient principalement composés de gènes de résistance aux aminosides et aux β -lactamines. De plus, ce sont également les gènes *bla_{OXA-10}* et *aacA4* qui étaient majoritaires. Au niveau des résistances aux aminosides, outre le gène *aacA4*, peu d'autres gènes étaient présents en proportion forte dans les « cassetomes » des intégrons de classe 3. En ce qui concerne les gènes de résistance aux β -lactamines, le gène de β -lactamase *bla_{GES}* était le deuxième gène de résistance aux β -lactamines le plus détecté après le gène *bla_{OXA-10}*. Ces gènes ont récemment été décrits dans des intégrons de classe 3 identifiés à partir d'effluents

hospitaliers (Takizawa et al., 2022). Des cassettes de fonctions inconnues *gcu45*, *gcu47* et *gcu48* étaient également présentes dans certains « cassetomes » de classe 3 et en forte proportion dans les Top10 des « cassetomes » de certains SSR (S1, S3, S4). Ces gènes ainsi que le gène *gcu46* ont déjà été décrits dans des souches de *Delftia* isolées de l'environnement et nommés *orfA*, *orfB*, *orfC-orfD* et *orfE* (Tchuinte, 2016; Xu et al., 2007). Dans cette étude, nous avons également montré une corrélation significative de ces trois gènes entre eux dans les intégrons de classe 3, appuyant les résultats précédents. Cependant, grâce à notre analyse du microbiote et les essais de corrélations entre taxons et cassettes, nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre le genre *Delftia* et ces trois cassettes, indiquant un probable portage de ces gènes par d'autres espèces/genres bactériens, ou en tout cas un portage non systématique. Parmi l'ensemble des centres de soins, un hôpital (H2) se démarque des autres « cassetomes » par la présence de cassettes de résistance à l'érythromycine, *ereA*, dans ses deux « cassetomes ». Ce gène déjà décrit dans des intégrons de classe 1 ("INTEGRALL," [http://integrall.bio.ua.pt/?](http://integrall.bio.ua.pt/)) n'a été décrit qu'une seule fois dans un intégron de classe 2 (Biskri and Mazel, 2003) mais jamais à ce jour dans un intégron de classe 3. Nous avons essayé d'isoler la ou les souches porteuses de ce gène. Après assemblage des *reads* en contigs, nous avons réussi à assembler le réseau de cassettes suivant : *bla_{OXA-10}-aacA4-ereA-bla_{OXA-2}*. Suite à de nombreux essais de culture menés avec différents antibiotiques dont les résistances sont codées par ces différentes cassettes, nous n'avons malheureusement pas réussi à isoler la souche porteuse de cet intégron, nous laissant penser que la bactérie hôte était non cultivable ou alors présentait des conditions de culture très spécifiques. Pour nous aider à identifier la bactérie et pouvoir l'isoler au mieux, nous pourrions utiliser la technique d'Epic-PCR (Hultman et al., 2018; Spencer et al., 2016). Cette technique permet de fusionner le gène de l'ARNr 16S avec un gène d'intérêt (comme par exemple le gène *ereA*) et de les séquencer. Cette technique est en cours de développement au sein du laboratoire mais malheureusement n'a pas encore été mise au point. Les résultats du projet CALYPSO historique ont permis de montrer la forte présence des nouvelles

cassettes GCLIM au sein du « cassetome » des intégrons de classe 3. Ce qui est également le cas pour les « cassetomes » des intégrons de classe 3 des centres de soins du projet CALYPSO NA. Pour certains établissements, notamment les cliniques et les SSR, la proportion de ces GCLIM représentait la moitié voire la quasi-totalité du « cassetome ». Ces GCLIM présentaient une grande diversité au sein des intégrons de classe 3 puisque l'on dénombrait 49 GCLIM différents et ce uniquement dans le Top10 des « cassetomes » des intégrons de classe 3. Les intégrons de classe 3 semblent donc être un réservoir de ces GCLIM, montrant un certain manque de connaissances sur les intégrons de classe 3 dans l'environnement. Ces résultats vont dans le sens d'une étude récente de l'équipe de Gillings, qui en s'appuyant sur la description de nombreux nouveaux sites *attC* suppose que les intégrons dans l'environnement possèdent de nombreux gènes pas encore décrits (Ghaly et al., 2021).

Le deuxième objectif principal du projet CALYPSO-NA était de regarder la stabilité ou non des « cassetomes » au cours du temps. Deux campagnes de prélèvements ont ainsi été réalisées, une en 2019 et la deuxième en 2020. Compte tenu de la stabilité du « cassetome » des intégrons de classe 2 pour la campagne de prélèvement 2019 entre les 34 effluents de centres de soins, le choix de ne pas investiguer le « cassetome » de ces intégrons pour les prélèvements de 2020 a été pris. Les deux campagnes de prélèvements pour les intégrons de classe 1 et 3 ont permis de confirmer la stabilité des cassetomes pour la majorité des centres de soins de cette étude. Ce constat avait déjà été précédemment décrit pour les gènes de résistance, y compris ceux présents en dehors des intégrons (Buelow et al., 2020). Pour certains établissements, la stabilité des « cassetomes » était bien nette, par exemple l'hôpital H2 étant le seul centre de soins de cette étude à présenter des gènes de résistance à l'érythromycine, *ereA*, dans son « cassetome » des intégrons de classe 3, que ce soit pour la campagne 2019 ou celle de 2020. Possiblement, nous pouvons imaginer un réservoir sous forme de biofilms qui persiste dans les réseaux d'eaux usées de cet hôpital et qui délivrerait en continu ces gènes de résistance donnant cette signature particulière. De plus l'EHPAD E2

est le seul centre de soins ne possédant pas le gène *aacA4* dans son Top10 de classe 1, que ce soit pour le prélèvement de 2019 et pour celui de 2020, ce qui une nouvelle fois confirme cette notion de stabilité des « cassetomes ». Chaque « cassetome » a été analysé à partir d'un prélèvement ponctuel. Nous avons fait le choix de prélever de l'eau à un temps T et non pas de prélever sur 24h par exemple. Ainsi les « cassetomes » obtenus reflètent donc les gènes de résistance portés par les intégrons uniquement à un instant donné. Pourtant, avec à nos deux prélèvements réalisés à un an et demi d'intervalle et cette stabilité constatée, cela nous montre bien qu'un prélèvement sur 24h ne nous aurait pas forcément donné un « cassetome » différent. Cette stabilité nous montre que les établissements de soins rejettent un « cassetome » constant, même avec une activité un peu changeante (pandémie de COVID-19 lors du deuxième prélèvement). Une étude a montré une augmentation des résistances suite à cette pandémie (Rizvi and Ahammad, 2022) ; même si notre étude est limitée aux seules cassettes d'intégrons et qu'elle est qualitative, il semble que la pandémie n'ait pas eu d'impact sur les cassettes d'intégrons. Cependant, quelques effluents présentent un « cassetome » un peu différent entre les deux années (différence de plusieurs gènes dans le Top10 du « cassetome » ou différence importance de leurs proportions) ce qui est le cas de la clinique C2 qui présente des « cassetomes » bien différents entre les deux années que ce soit pour les intégrons de classe 1 mais aussi de classe 3. Ces résultats ont été vérifiés avec des analyses de cassettomique renouvelées qui ont retrouvé les mêmes résultats, aussi bien pour les intégrons de class 1 que de classe 3. L'établissement a été questionné et ne nous a notifié aucun changement ou travaux dans son bâtiment ou dans ses réseaux d'eaux usées.

Les objectifs secondaires du projet CALYPSO-NA étaient d'investiguer des associations entre (i) les cassettes entre elles, (ii) entre les cassettes et les taxons et (iii) entre les cassettes et la consommation d'antibiotiques des centres de soins. En ce qui concerne les associations de cassettes entre elles, certaines associations connues (*dfrA12-gcuF* et *gcu45-gcu47-gcu48*) nous ont permis de valider notre méthode et ont prouvé que ces cassettes

n'existaient pas seules au sein d'un réseau. De nouvelles associations ont été montrées notamment avec les nouvelles cassettes GCLIM montrant leur importance au sein de réseaux de cassettes. Le microbiote des effluents de nos centres de soins a été investigué afin de décrire d'éventuelles associations cassettes/taxons. Il était majoritairement composé de bactéries anaérobies (Clostridiales et Bacteroidales) connues pour coloniser le système digestif humain (Gomaa, 2020) confirmant ainsi que les effluents sont principalement contaminés par les matières fécales (Karkman et al., 2019). Le centre de cure thermique est le seul centre de soins présentant un microbiote différent des autres avec une forte proportion de Cyanobactéries qui sont connues pour être présentes dans les eaux thermales (Zeichner and Seite, 2018) mais en faible proportion. Dans cette étude, aucune association significative entre un taxon et une cassette n'est ressortie indiquant l'absence de spécificité des intégrons au sein d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Enfin pour étudier les relations entre les cassettes et la consommation en antibiotiques des centres de soins, cette dernière a été colligée à l'aide du réseau régional de surveillance ConsoRes. Si l'on regarde la consommation des antibiotiques dans les établissements de soins de ce projet, ce sont très majoritairement des antibiotiques de la famille des β -lactamines qui sont délivrés avec en moyenne 63% des antibiotiques totaux. Les aminosides quant à eux ne représentent qu'en moyenne 3% des antibiotiques totaux délivrés dans l'ensemble de nos centres de soins alors que la principale cassette retrouvée dans tous les centres de soins est la cassette *aacA4* qui confère une résistance à la tobramycine qui appartient à la famille des aminosides. Beaucoup d'associations entre des cassettes et des centres de soins très consommateurs d'antibiotiques (aminosides, β -lactamines et fluoroquinolones) ont été trouvées. Cependant nous pouvons notifier trois limites à ces corrélations. Premièrement il a été délicat de séparer les différents établissements en fonction de leurs consommations ; afin de réaliser le test de Mann Whitney, nous avons fait le choix de séparer les établissements avec la dichotomie suivante : fort consommateur / faible consommateur d'antibiotiques. Deuxièmement, nous avons utilisé la consommation d'antibiotiques mais elle ne reflète pas les concentrations d'antibiotiques que

l'on retrouve dans les eaux usées. Pour améliorer et travailler avec des données plus précises, il aurait été possible de doser les antibiotiques présents dans les différents effluents. Cette approche n'était pas prévue dans le cadre de ce projet et de plus, nous ne possédons pas cette technique au sein du laboratoire et par soucis de transport et de stockage, nous n'avons pas gardé d'aliquots d'eaux suite à l'étape de filtration sur place. Enfin, le modèle utilisé dans cette étude est les intégrons. Ils sont connus pour héberger des gènes de résistance qui confèrent à la bactérie des résistances vis-à-vis des antibiotiques une fois le ou les gènes exprimés. Cependant ce n'est pas le seul moyen mis en place par les bactéries pour résister aux antibiotiques. En effet, les intégrons ne représentent qu'une faible partie du résistome bactérien et de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques sont également présents au sein du chromosome bactérien ou sur d'autres éléments génétiques mobiles. De ce fait, les résistances portées par les intégrons ne reflètent que très partiellement l'ensemble des résistances portées par la bactérie, limitant les conclusions que l'on peut apporter entre présence de cassettes et consommation en antibiotiques des centres de soins.

L'arrivée des méthodes de métagénomique et de séquençage haut débit ont pu faire abstraction de l'étape de culture bactérienne qui empêchait d'avoir accès à l'ensemble des bactéries présentes dans une matrice (pour rappel, il est estimé que moins de 1% des bactéries sont cultivables). Le projet CALYPSO NA a utilisé une nouvelle méthodologie couplée à du NGS pour avoir accès à l'entièreté des « cassetomes ». Cependant cette étude possède deux limites techniques. Premièrement, le nombre de *reads* qui n'ont pas mappé sur l'ensemble des 1019 cassettes représente environ 1/3 des *reads* totaux générés par le séquençage (33,34%), ce qui signifie que de nombreuses cassettes n'ont pas encore été décrites dans les effluents de centres de soins. L'assemblage des *reads* non mappés en contigs puis la recherche de ces cassettes est une perspective de cette étude. Deuxièmement, certains intégrons ont été omis dû au choix des amorces pour amplifier les réseaux de cassettes. Les amorces ciblées pour amplifier les réseaux de cassettes ont été « *designées* »

pour cibler la région 3'CS de chaque classe d'intégron. Cependant, certains intégrons, dit cliniques, ont été décrits sans région 3'CS (Antunes et al., 2007; Hall et al., 1994; Kholodii et al., 1995; Paulsen et al., 1993). Les intégrons ne possédant pas cette région ont ainsi été éliminés lors de l'étape d'amplification des réseaux de cassettes. Il en est de même pour les intégrons dits hybrides qui possèdent la 5'CS d'une classe d'intégron et la 3'CS d'une autre classe (Ploy et al., 2000). Enfin, cette étude de « cassettomique » est une étude qualitative descriptive pour laquelle il est difficile d'émettre des conclusions fermes en ce qui concerne les associations entre les cassettes et le microbiote et les cassettes et la consommation en antibiotiques. Des hypothèses et pistes d'exploration ont néanmoins été apportées.

Le **projet ROSETA** avait pour objectif de faire de la « cassettomique » dans les effluents d'abattoirs et par la suite de comparer ces résultats avec ceux obtenus lors du projet CALYPSO NA.

Les « cassettones » des intégrons de classe 1 d'effluents d'abattoirs étaient très majoritairement composés de cassettes de résistances aux aminosides avec principalement le gène *aadA1* qui confère une résistance à streptomycine et spectinomycine. Nous observons donc bien une différence de « cassettonne » pour les intégrons de classe 1 entre les effluents d'abattoirs et les effluents de centres de soins puisque dans ces derniers, c'est le gène *aacA4* qui est le plus présent, alors qu'il était absent des effluents d'abattoirs. De plus, les « cassettones » des effluents d'abattoirs ne présentent que très peu de gènes de résistance aux β -lactamines alors que dans les effluents de centres de soins, ils représentent la deuxième résistance. La différence a été confirmée par la suite par l'analyse en PCoA. Le seul établissement qui a son « cassettonne » proche de celui des effluents d'abattoirs est l'EHPAD E2. Cette similarité est notamment due à la forte présence du gène *aadA1* qui est caractéristique du Top10 des effluents d'abattoirs et à l'absence du gène *aacA4* qui est le gène majoritaire dans les « cassettones » des effluents de centres de soins. Les EHPADs ont une activité différente des autres centres de soins, la consommation en antibiotiques est différente

et pourrait expliquer la différence de ce « cassetome », même si ce n'était pas le cas pour l'EHPAD E1.

Au sein des « cassetomes » de classe 2, ce sont les habituelles trois mêmes cassettes qui ont été retrouvées (*drfA1*, *aadA1* et *sat2*). Cependant on observe une grosse différence de proportion entre ces trois cassettes. En effet le gène *drfA1* est moins présent par rapport aux deux autres gènes. Les réseaux de cassettes composés uniquement des gènes *aadA2-sat2* et sans le gène *drfA1* ont déjà été décrits plusieurs fois (Mendes Moreira et al., 2019; Ramírez et al., 2005b), ce qui peut expliquer cette différence de proportions. Des réseaux avec le gène *sat2* unique ont également été décrits (Ramírez et al., 2005a). Les analyses en PCoA n'ont pas permis de différencier les « cassetomes » des effluents de centres de soins de ceux des effluents d'abattoirs pour les intégrons de classe 2 compte tenu de cette stabilité en termes de cassettes.

Les « cassetomes » des intégrons de classe 3 des effluents d'abattoirs sont composés principalement de cassettes GCLIM et de gènes de fonctions inconnues. Contrairement aux « cassetomes » des effluents de centres soins, nous n'avons pas retrouvé de gènes de résistance aux β -lactamines dans le Top10 et seulement quelques gènes de résistance aux aminosides (*aadA6* majoritairement). Étonnamment, même si visuellement les Top10 des « cassetomes » des intégrons de classe 3 des effluents d'abattoirs sont différents des effluents de centres de soins, l'analyse en PCoA ne permet pas de distinguer nettement ces « cassetomes ». Ceci est expliqué par le fait que l'analyse en PCoA prend en compte la totalité du « cassetome » et contrairement aux effluents de centres de soins le Top10 ne représente pas la quasi-totalité du « cassetome ». Les « cassetomes » des effluents de centres de soins et des effluents d'abattoirs peuvent donc être distingués uniquement à l'aide des intégrons de classe 1. En effet la proximité des « cassetomes » des intégrons de classe 2 et 3 entre ces deux types d'effluents ne nous permet pas de les différencier.

La deuxième partie de cette thèse avec le **projet ARMANI** a positionné les intégrons comme un marqueur de la pollution anthropique mais cette fois ci d'une manière plus ciblée,

à partir de souches d'*Aeromonas* infectant/colonisant les poissons. Ce genre bactérien est connu pour être impliqué dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques au sein des trois acteurs du *One Health* (Lamy et al., 2022) que sont l'Homme, l'animal et l'environnement.

En terme de prévalence des intégrons au sein des trois différents groupes de poissons, aucun intégron n'a été détecté dans les souches de notre collection qui colonisaient les poissons sauvages. Parmi le groupe des souches issues de poissons de pisciculture colonisés non malades, moins d'un quart des souches étaient porteuses d'intégrons et pour le dernier groupe de poissons malades infectés par *Aeromonas* le portage monte à presque la moitié des souches. Ainsi, lorsque les poissons sont soumis à un faible niveau de pression de sélection (taux d'antibiotiques faible dans l'environnement), la proportion d'intégrons est nulle. Elle augmente lorsque les poissons sont soumis à cette pression de sélection dans des élevages et enfin la proportion augmente encore plus jusqu'à atteindre la moitié des souches lorsque les poissons sont malades. Ce sont exclusivement des intégrons de classe 1 qui ont été décrits dans cette collection à l'exception d'un seul intégron de classe 2 détecté. Ce dernier reflète encore une fois la littérature avec la présence des trois mêmes cassettes dans sa région variable, *dfrA1-sat2-aadA1* (Carvalho et al., 2012; Hansson et al., 2002; Moura et al., 2007). La prévalence de cette classe d'intégron est très faible. Selon les études, les proportions des intégrons de classe 2 chez les *Aeromonas* varient de 0% à 56% des souches isolées (Jacobs and Chenia, 2007; Nagar et al., 2015; Otero-Olarra et al., 2020). Pour les intégrons de classe 1, les gènes de résistance retrouvés dans les réseaux de cassettes étaient classiques, nous avons retrouvé principalement les gènes *aadA*, *dfr* et *catB*. Ce sont des gènes qui confèrent des résistances à la streptomycine/spectinomycine, au triméthoprime et au chloramphénicol respectivement. Ces gènes de résistance constituent la majorité des réseaux de cassettes des intégrons de classe 1 décrits chez des souches d'*Aeromonas* environnementales (Moura et al., 2007; Otero-Olarra et al., 2020) ou en aquaculture (Carvalho et al., 2012; Jacobs and Chenia, 2007; Kadlec et al., 2011; Lukkana et al., 2012). Aucun gène de résistance aux β -lactamines n'a été détecté dans les intégrons de classe 1 de notre collection. Dans les souches

d'Aeromonas d'origine environnementale, ces gènes de résistance sont rarement détectés, à l'exception des oxacilinases (Deng et al., 2016; Jacobs and Chenia, 2007; Kadlec et al., 2011). Les souches cliniques quant à elles sont connues pour être porteuses de gènes de résistance aux β -lactamines telles que *bla_{VEB}* ou *bla_{VIM}* (Adler et al., 2014; Floug et al., 2019). C'est également le cas pour le nouvel intégron décrit par nos soins dans une souche *d'Aeromonas* ayant infecté un patient suite à une hirudothérapie (Barraud et al., 2020). Cet intégron montre une différence bien distincte avec les intégrons de la collection, que ce soit en terme de diversité des gènes de résistance ou en nombre de cassettes constituant le réseau. Dans cette collection, aucun intégron de classe 3 n'a été détecté. Actuellement (octobre 2022), une seule description d'intégron de classe 3 dans une souche *d'Aeromonas* a été rapportée (Simo Tchuinte et al., 2016), ce qui montre la faible prévalence de cette classe d'intégron au sein des bactéries du genre *Aeromonas*. Une corrélation entre la présence des intégrons et l'augmentation des CMI (concentration minimales inhibitrices) chez les souches a été significativement montrée envers certains antibiotiques (oxytétracycline, triméthoprim/sulfaméthoxazole et fluméquine), ce qui est en accord avec le lien intégrons-résistance déjà démontré à de multiples reprises pour les entérobactérales (Daikos et al., 2007; Leverstein-van Hall et al., 2003; Nijssen et al., 2005).

Conclusion et perspectives

Les intégrons sont utilisés pour étudier la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement depuis plusieurs années mais la plupart de ces études se concentrent uniquement sur la quantification des intégrons et plus spécifiquement des intégrons de classe 1.

Dans ce travail de thèse nous sommes allés plus loin en caractérisant le contenu en cassettes (« cassetome ») des intégrons des trois classes principales dans les effluents de centres de soins et d'abattoirs. Ceci nous a permis de montrer que les « cassetomes » des centres de soins étaient semblables entre eux mais que chaque établissement possède son « cassetome » propre et qu'il est stable dans le temps. De plus, les « cassetomes » d'intégrons de classe 1 des effluents d'abattoirs sont quant à eux différents des « cassetomes » d'intégrons de classe 1 de centres de soins, ce qui montre la spécificité de chaque « cassetome » en fonction du type d'effluent. En faisant de la « cassettomique » d'intégrons de classe 1, nous sommes dans la capacité de distinguer ces deux types d'effluents.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse nous avons étudié les intégrons avec une approche beaucoup plus ciblée qui était d'étudier les intégrons de souches d'*Aeromonas* isolées de différents groupes de poissons. Ce modèle a montré que les intégrons peuvent être également un bon indicateur de la pression de sélection antibiotique exercée sur les poissons dans leur environnement.

Que ce soit en étudiant le contenu global en cassettes d'une matrice choisie (ici les effluents) ou d'une manière plus ciblée avec des souches d'*Aeromonas*, ce travail de thèse a confirmé le très bon positionnement des intégrons comme marqueurs de la pollution anthropique.

La « cassettomique » des intégrons de classe 3 dans les effluents de centres de soins et notamment dans les effluents d'abattoirs a révélé la place importante des GCLIM dans ces

« cassetomes ». Leur récente découverte dans les *reads* non mappés du projet CALYPSO historique et leur nombre élevé auraient pu faire penser que toutes les cassettes d'intégrons sont à présent décrites mais la quantité non négligeable de *reads* non mappés dans les projets CALYPSO et ROSETA nous suggère que ce n'est pas le cas. Ainsi, les « cassetomes » et notamment ceux des intégrons de classe 3 sont très vraisemblablement porteurs de très nombreux autres gènes à découvrir.

De plus, la « cassettomique » pourrait s'appliquer à d'autres types d'effluents anthropiques ou à des matrices environnementales tel que les boues dans le but de décrire au mieux les intégrons dans l'environnement. Toujours dans un objectif de placer les intégrons dans le concept *One Health*, nous pourrions également utiliser cette technique sur des prélèvements humains ou animalier (digestif, cutané ou respiratoire par exemple), dès lors que ceux-ci hébergent des intégrons.

Il reste encore beaucoup à explorer en ce qui concerne les intégrons et leur utilisation comme marqueurs de la pollution anthropique est loin d'être terminée.

Références bibliographiques

- Abraham, E.P., Chain, E., 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.* 10, 677–678.
- Adler, A., Assous, M.V., Paikin, S., Shulman, A., Miller-Roll, T., Hillel, S., Aronov, R., Carmeli, Y., Schwaber, M.J., 2014. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1211–1214. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt505>
- Aggarwal, A., Bhalla, M., Fatima, K.H., 2020. Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase enzyme gene bla NDM-1 associated with the Int-1 gene in Gram-negative bacteria collected from the effluent treatment plant of a tuberculosis care hospital in Delhi, India. *Access Microbiol.* 2, acmi000125. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000125>
- Al-Hassan, L., Opazo, A., Lopes, B.S., Mahallawy, H.E., Amyes, S.G.B., 2015. Variations in IS6 promoters alter the expression of carbapenem resistance in related strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.10.003>
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Amos, G.C.A., Gozzard, E., Carter, C.E., Mead, A., Bowes, M.J., Hawkey, P.M., Zhang, L., Singer, A.C., Gaze, W.H., Wellington, E.M.H., 2015. Validated predictive modelling of the environmental resistome. *ISME J.* 9, 1467–1476. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.237>
- Amos, G.C.A., Ploumakis, S., Zhang, L., Hawkey, P.M., Gaze, W.H., Wellington, E.M.H., 2018. The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. *ISME J.* 12, 681–691. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0030-8>
- Ampel, N., Peter, G., 1981. *Aeromonas bacteriema* in a burn patient. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 8253 318, 987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)91183-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)91183-1)
- An, X.-L., Abass, O.K., Zhao, C.-X., Xu, M.-R., Pan, T., Pu, Q., Liao, H., Li, H., Zhu, Y.-G., Su, J.-Q., 2022. Nanopore sequencing analysis of integron gene cassettes in sewages and soils. *Sci. Total Environ.* 817, 152766. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152766>
- An, X.-L., Chen, Q.-L., Zhu, D., Zhu, Y.-G., Gillings, M.R., Su, J.-Q., 2018. Impact of Wastewater Treatment on the Prevalence of Integrons and the Genetic Diversity of Integron Gene Cassettes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02766-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-17>
- Anssour, L., Messai, Y., Derkaoui, M., Alouache, S., Estepa, V., Somalo, S., Torres, C., Bakour, R., 2014. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. *J. Chemother. Florence Italy* 26, 74–79. <https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000115>
- Antunes, P., Machado, J., Peixe, L., 2007. Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1545–1548. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-06>
- 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1612–1615.
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M.I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T.H., Rasool, M.H., Shahid, A., Xueshan, X., Baloch, Z., 2021. Antibiotic

- Resistance: One Health One World Outlook. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Auerbach, E.A., Seyfried, E.E., McMahon, K.D., 2007. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res.* 41, 1143–1151. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.045>
- Auguet, O., Pijuan, M., Borrego, C.M., Rodriguez-Mozaz, S., Triadó-Margarit, X., Giustina, S.V.D., Gutierrez, O., 2017. Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance. *Sci. Total Environ.* 605–606, 1047–1054. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.153>
- Azizullah, A., Khattak, M.N.K., Richter, P., Häder, D.-P., 2011. Water pollution in Pakistan and its impact on public health — A review. *Environ. Int.* 37, 479–497. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.007>
- Azzopardi, E.A., Azzopardi, S.M., Boyce, D.E., Dickson, W.A., 2011. Emerging Gram-Negative Infections in Burn Wounds. *J. Burn Care Res.* 32, 570–576. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e31822ac7e6>
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 14, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Bannai, M.A.A., 2013. Case Study: Diagnosis of “*Aeromonas hydrophila*” Infection Carassius gibelio Fish in Shatt Al-Arab River, South of Iraq. *Int. J. Aquac.*
- Barillo, D.J., McManus, A.T., Cioffi, W.G., McManus, W.F., Kim, S.H., Pruitt, B.A., 1996. *Aeromonas* bacteraemia in burn patients. *Burns* 22, 48–52. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(95\)00075-5](https://doi.org/10.1016/0305-4179(95)00075-5)
- Barkovskii, A.L., Green, C., Hurley, D., 2010. The occurrence, spatial and temporal distribution, and environmental routes of tetracycline resistance and integrase genes in *Crassostrea virginica* beds. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 2215–2224. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.016>
- Barlow, R. s., Fegan, N., Gobius, K. s., 2009. Integron-containing bacteria in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 107, 540–545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04240.x>
- Barlow, R.S., Gobius, K.S., 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1133–1138. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl423>
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1642–1645. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq167>
- Barraud, O., Badell, E., Denis, F., Guiso, N., Ploy, M.-C., 2011. Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2078–2080. <https://doi.org/10.3201/eid1711.110282>
- Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2013. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, E306-308. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12186>
- Barraud, O., Ploy, M.-C., 2015. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J. Bacteriol.* 197, 2171–2178. <https://doi.org/10.1128/JB.02455-14>
- Barraud, O., Robert, A., Laval, L., Ruimy, R., Morquin, D., Boyer, L., Lamy, B., 2020. It takes two to tango: two *Aeromonas* isolates combine virulence and multidrug resistance in

- flap infection following leech therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* 26, 793–794. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.12.021>
- Bauters, T., Buyle, F., Blot, S., Robays, H., Vogelaers, D., Van Landuyt, K., Vanhove, W., Claeys, G., 2014. Prophylactic use of levofloxacin during medicinal leech therapy. *Int. J. Clin. Pharm.* 36, 995–999. <https://doi.org/10.1007/s11096-014-9986-x>
- Bauters, T.G.M., Buyle, F.M.A., Verschraegen, G., Vermis, K., Vogelaers, D., Claeys, G., Robays, H., 2007. Infection risk related to the use of medicinal leeches. *Pharm. World Sci.* 29, 122–125. <https://doi.org/10.1007/s11096-007-9105-3>
- Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2002. Genomic and Functional Analyses of SXT, an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 184, 4259–4269. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4259-4269.2002>
- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., Guédon, G., 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 720–760. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>
- Bengtsson-Palme, J., Larsson, D.G.J., 2016. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ. Int.* 86, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Bibbo, C., Fritsche, T., Stemper, M., Hall, M., 2013. Flap infection associated with medicinal leeches in reconstructive surgery: two new drug-resistant organisms. *J. Reconstr. Microsurg.* 29, 457–460. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343956>
- Bielen, A., Šimatović, A., Kosić-Vukšić, J., Senta, I., Ahel, M., Babić, S., Jurina, T., González Plaza, J.J., Milaković, M., Udiković-Kolić, N., 2017. Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *Water Res.* 126, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.019>
- Biskri, L., Mazel, D., 2003. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3326–3331. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3326-3331.2003>
- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J.P., Roy, P.H., 1991. Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmIA*) gene of the *In4* integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J. Bacteriol.* 173, 4493–4502. <https://doi.org/10.1128/jb.173.14.4493-4502.1991>
- Bissonnette, L., Roy, P.H., 1992. Characterization of *In0* of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 174, 1248–1257.
- Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M., de Roda Husman, A.M., 2015. Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *PloS One* 10, e0127752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127752>
- Blanch, A.R., Caplin, J.L., Iversen, A., Kühn, I., Manero, A., Taylor, H.D., Vilanova, X., 2003. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J. Appl. Microbiol.* 94, 994–1002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01919.x>

- Böltner, D., MacMahon, C., Pembroke, J.T., Strike, P., Osborn, A.M., 2002. R391: a Conjugative Integrating Mosaic Comprised of Phage, Plasmid, and Transposon Elements. *J. Bacteriol.* 184, 5158–5169. <https://doi.org/10.1128/JB.184.18.5158-5169.2002>
- Borjesson, S., Dienues, O., Jarnheimer, P.-A., Olsen, B., Matussek, A., Lindgren, P.-E., 2009. Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides, beta-lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR. *Int. J. Environ. Health Res.* 19, 219–230. <https://doi.org/10.1080/09603120802449593>
- Börjesson, S., Matussek, A., Melin, S., Löfgren, S., Lindgren, P.E., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? *J. Appl. Microbiol.* 108, 1244–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04515.x>
- Bourély, C., Chauvin, C., Jouy, É., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A., Gay, É., 2018. Comparative epidemiology of *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals. *Vet. Microbiol.* 223, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.025>
- Bouvier, M., Demarre, G., Mazel, D., 2005. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J.* 24, 4356–4367. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600898>
- Bréchet, C., Plantin, J., Sauget, M., Thouverez, M., Talon, D., Cholley, P., Guyeux, C., Hocquet, D., Bertrand, X., 2014. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 58, 1658–1665. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu190>
- Buelow, E., Bayjanov, J.R., Majoor, E., Willems, R.J., Bonten, M.J., Schmitt, H., van Schaik, W., 2018. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy087>
- Buelow, E., Ploy, M.-C., Dagot, C., 2021. Role of pollution on the selection of antibiotic resistance and bacterial pathogens in the environment. *Curr. Opin. Microbiol.* 64, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.10.005>
- Buelow, E., Rico, A., Gaschet, M., Lourenço, J., Kennedy, S.P., Wiest, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., 2020. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res.* X 7, 100045. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100045>
- Burr, T., Mitchell, J., Kolb, A., Minchin, S., Busby, S., 2000. DNA sequence elements located immediately upstream of the –10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Res.* 28, 1864–1870.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., Guédon, G., 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 46, 601–610.
- Burrus, V., Waldor, M.K., 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol., Genome plasticity and the evolution of microbial genomes* 155, 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.012>
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., Dölz, H.J., 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.* 16, e127–e133. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00100-6)
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., Buschmann, A.H., 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial

- resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15, 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- Carattoli, A., 2009. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carnelli, A., Mauri, F., Demarta, A., 2017. Characterization of genetic determinants involved in antibiotic resistance in *Aeromonas* spp. and fecal coliforms isolated from different aquatic environments. *Res. Microbiol.* 168, 461–471. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.006>
- Carvalho, M.J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A.C., Correia, A., Saavedra, M.J., 2012. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.008>
- Chagas, T.P.G., Alves, R.M., Vallim, D.C., Seki, L.M., Campos, L.C., Asensi, M.D., 2011. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* 15, 420–425. [https://doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70222-7](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70222-7)
- Che, Y., Xia, Y., Liu, L., Li, A.-D., Yang, Y., Zhang, T., 2019. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome* 7, 44. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0663-0>
- Chen, H., Bai, X., Li, Y., Jing, L., Chen, R., Teng, Y., 2019. Source identification of antibiotic resistance genes in a peri-urban river using novel crAssphage marker genes and metagenomic signatures. *Water Res.* 167, 115098. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115098>
- Chen, H., Zhang, M., 2013. Effects of advanced treatment systems on the removal of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants from Hangzhou, China. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8157–8163. <https://doi.org/10.1021/es401091y>
- Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., Zhu, Y.-G., 2016. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environ. Int.* 92–93, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>
- Chen, S., Wang, J., Feng, H., Shen, D., He, S., Xu, Y., 2020. Quantitative study on the fate of antibiotic emissions in China. *Environ. Geochem. Health* 42, 3471–3479. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00563-w>
- Chim, H., Song, C., 2007. *Aeromonas* infection in critically ill burn patients. *Burns* 33, 756–759. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.10.389>
- Chonova, T., Lecomte, V., Bertrand-Krajewski, J.-L., Bouchez, A., Labanowski, J., Dagot, C., Lévi, Y., Perrodin, Y., Wiest, L., Gonzalez-Ospina, A., Cournoyer, B., Sebastian, C., 2018. The SIPIBEL project: treatment of hospital and urban wastewater in a conventional urban wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 9197–9206. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9302-0>
- Chow, L.K.M., Ghaly, T.M., Gillings, M.R., 2021. A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment. *J. Environ. Sci. China* 99, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.05.030>
- Čížek, A., Dolejská, M., Sochorová, R., Strachotová, K., Piačková, V., Veselý, T., 2010. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Microbiol.* 142, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.001>
- Clark, C.A., Purins, L., Kaewrakon, P., Focareta, T., Manning, P.A.Y. 2000, 2000. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. The GenBank accession numbers for the

- sequences determined in this work are AF025662, AF055586, X64097, AF179593 and AF179596. *Microbiology* 146, 2605–2612. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2605>
- Clark, N.C., Olsvik, O., Swenson, J.M., Spiegel, C.A., Tenover, F.C., 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 157–160. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.1.157>
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 155–162. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.155>
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 6, 2875–2885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01467.x>
- Collis, C.M., Hall, R.M.Y. 2004, 2004. Comparison of the structure–activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. *Microbiology* 150, 1591–1601. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26596-0>
- Collis, C.M., Kim, M.-J., Partridge, S.R., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002a. Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines. *J. Bacteriol.* 184, 3017–3026. <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.3017-3026.2002>
- Collis, C.M., Kim, M.-J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002b. Integron-encoded *IntI* integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Mol. Microbiol.* 46, 1415–1427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03260.x>
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., Mendo, S., Duarte, A., 2003. Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2838–2843. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2838-2843.2003>
- Dahmen, S., Haenni, M., Madec, J.-Y., 2012. *Incl1/ST3* plasmids contribute to the dissemination of the *bla*CTX-M-1 gene in *Escherichia coli* from several animal species in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 3011–3012. <https://doi.org/10.1093/jac/dks308>
- Daikos, G.L., Kosmidis, C., Tassios, P.T., Petrikkos, G., Vasilakopoulou, A., Psychogiou, M., Stefanou, I., Avlami, A., Katsilambros, N., 2007. Enterobacteriaceae Bloodstream Infections: Presence of Integrons, Risk Factors, and Outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2366–2372. <https://doi.org/10.1128/AAC.00044-07>
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K.H., Trudel, M.V., Lafaille, A., Charette, S.J., 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.* 169, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.025>
- De Vlamincq, I., Khush, K.K., Strehl, C., Kohli, B., Luikart, H., Neff, N.F., Okamoto, J., Snyder, T.M., Cornfield, D.N., Nicolls, M.R., Weill, D., Bernstein, D., Valantine, H.A., Quake, S.R., 2013. Temporal Response of the Human Virome to Immunosuppression and Antiviral Therapy. *Cell* 155, 1178–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.034>
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- Deng, Y., Wu, Y., Jiang, L., Tan, A., Zhang, R., Luo, L., 2016. Multi-Drug Resistance Mediated by Class 1 Integrons in *Aeromonas* Isolated from Farmed Freshwater Animals. *Front. Microbiol.* 7, 935. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00935>

- Diana, J.S., Egna, H.S., Chopin, T., Peterson, M.S., Cao, L., Pomeroy, R., Verdegem, M., Slack, W.T., Bondad-Reantaso, M.G., Cabello, F., 2013. Responsible Aquaculture in 2050: Valuing Local Conditions and Human Innovations Will Be Key to Success. *BioScience* 63, 255–262. <https://doi.org/10.1525/bio.2013.63.4.5>
- Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M.R., Cloeckert, A., 2005. The Salmonella genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol. Microbiol.* 55, 1911–1924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04520.x>
- Duan, M., Gu, J., Wang, X., Li, Y., Zhang, R., Hu, T., Zhou, B., 2019. Factors that affect the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in soils from livestock and poultry farms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.005>
- Ebomah, K.E., Okoh, A.I., 2020. An African perspective on the prevalence, fate and effects of carbapenem resistance genes in hospital effluents and wastewater treatment plant (WWTP) final effluents: A critical review. *Heliyon* 6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03899>
- Er, W., P, R.C., Ta, C., Ig, C., Jm, H., Sp, D., 2016. Genomic Microbial Epidemiology Is Needed to Comprehend the Global Problem of Antibiotic Resistance and to Improve Pathogen Diagnosis [WWW Document]. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00843>
- Erill, I., Campoy, S., Barbé, J., 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 637–656. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x>
- Escudero, J.A., Loot, C., Nivina, A., Mazel, D., 2015. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3-0019–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014>
- Fernández-Bravo, A., Figueras, M.J., 2020. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* 8, 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
- Floug, Q., Sinna, R., Fillatre, A., Plésiat, P., Hamdad, F., 2019. A case of leech-associated infection involving an extended-spectrum β -lactamase-producing and extensively drug-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 394–395. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.006>
- Fluit, A.C., Schmitz, F.-J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 272–288. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x>
- Focosi, D., Antonelli, G., Pistello, M., Maggi, F., 2016. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 589–593. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.007>
- Francia, M.V., Zabala, J.C., de la Cruz, F., García Lobo, J.M., 1999. The *IntI1* integron integrase preferentially binds single-stranded DNA of the *attC* site. *J. Bacteriol.* 181, 6844–6849. <https://doi.org/10.1128/JB.181.21.6844-6849.1999>
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D., Cormican, M., 2010. Enumeration and Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Bacteria in Effluent from Municipal, Hospital, and Secondary Treatment Facility Sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4772–4779. <https://doi.org/10.1128/AEM.02898-09>
- Gao, P., Munir, M., Xagorarakis, I., 2012. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ., Special Section: Reviews of Trace*

Metal Pollution in China 421–422, 173–183.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.061>

- Gatica, J., Tripathi, V., Green, S., Manaia, C.M., Berendonk, T., Cacace, D., Merlin, C., Kreuzinger, N., Schwartz, T., Fatta-Kassinos, D., Rizzo, L., Schwermer, C.U., Garelick, H., Jurkevitch, E., Cytryn, E., 2016. High Throughput Analysis of Integron Gene Cassettes in Wastewater Environments. *Environ. Sci. Technol.* 50, 11825–11836. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03188>
- Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M., Wellington, E.M.H., 2005. Incidence of Class 1 Integrons in a Quaternary Ammonium Compound-Polluted Environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1802–1807. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005>
- Ghaly, T.M., Penesyan, A., Pritchard, A., Qi, Q., Rajabal, V., Tetu, S.G., Gillings, M.R., 2021. Methods for the targeted sequencing and analysis of integrons and their gene cassettes from complex microbial communities (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2021.09.08.459516>
- Gillings, M.R., 2017. Class 1 integrons as invasive species. *Curr. Opin. Microbiol., Mobile genetic elements and HGT in prokaryotes * Microbiota* 38, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.002>
- Gillings, M.R., 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 257–277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.-G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Gillings, M.R., Xuejun, D., Hardwick, S.A., Holley, M.P., Stokes, H.W., 2009. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J.* 3, 209–215. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.98>
- Giltner, C.L., Bobenchik, A.M., Uslan, D.Z., Deville, J.G., Humphries, R.M., 2013. Ciprofloxacin-Resistant *Aeromonas hydrophila* Cellulitis following Leech Therapy. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1324–1326. <https://doi.org/10.1128/JCM.03217-12>
- Girlich, D., Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P., 2015. Integration of the bla_{NDM-1} carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 98–102. <https://doi.org/10.1093/jac/dku371>
- Gniadek, T.J., Carroll, K.C., Simner, P.J., 2016. Carbapenem-Resistant Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli: the Missing Piece to the Puzzle. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1700–1710. <https://doi.org/10.1128/JCM.03264-15>
- Gomaa, E.Z., 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113, 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- Gönen, İ., Özşahin, M., Turan, H., Uslu, M., Celbek, G., Yildirim, M., Ataoğlu, S., 2013. *Acinetobacter* infection developed after leech therapy in a patient with gonarthrosis: A case report. *Türk Geriatri Derg.* 16, 237–240.
- Gravel, A., Fournier, B., Roy, P.H., 1998. DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the attI1 site. *Nucleic Acids Res.* 26, 4347–4355.
- Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., Mazel, D., 2009. The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* 324, 1034–1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>

- Gulla, S., Duodu, S., Nilsen, A., Fossen, I., Colquhoun, D.J., 2016. *Aeromonas salmonicida* infection levels in pre- and post-stocked cleaner fish assessed by culture and an amended qPCR assay. *J. Fish Dis.* 39, 867–877. <https://doi.org/10.1111/jfd.12420>
- Guo, X., Xia, R., Han, N., Xu, H., 2011. Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 667–675. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03059.x>
- Hadi, N., Mahmoodi, Z., Emami, A., Malekzadegan, Y., Valadbeygi, T., n.d. Isolation and Molecular Identification of *Aeromonas* Wound Infection in Iranian Burn Patients. *Infect. Disord. - Drug Targets* 19, 269–273.
- Hall, R.M., 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found. Symp.* 207, 192–202; discussion 202-205. <https://doi.org/10.1002/9780470515358.ch12>
- Hall, R.M., Brookes, D.E., Stokes, H.W., 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* 5, 1941–1959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00817.x>
- Hall, R.M., Brown, H.J., Brookes, D.E., Stokes, H.W., 1994. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol.* 176, 6286–6294. <https://doi.org/10.1128/jb.176.20.6286-6294.1994>
- Hall, R.M., Collis, C.M., 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 1, 109–119. [https://doi.org/10.1016/s1368-7646\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/s1368-7646(98)80026-5)
- Hall, R.M., Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W., 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 870, 68–80. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x>
- Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., Roy, P.H., 2002. IntI2 Integron Integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* 184, 1712–1721. <https://doi.org/10.1128/JB.184.6.1712-1721.2002>
- Harada, S., Ishii, Y., Saga, T., Tateda, K., Yamaguchi, K., 2010. Chromosomally encoded bla_{CMY-2} located on a novel SXT/R391-related integrating conjugative element in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3545–3550. <https://doi.org/10.1128/AAC.00111-10>
- Harms, K., Starikova, I., Johnsen, P.J., 2013. Costly Class-1 integrons and the domestication of the the functional integrase. *Mob. Genet. Elem.* 3, e24774. <https://doi.org/10.4161/mge.24774>
- Harris, S., Morris, C., Morris, D., Cormican, M., Cummins, E., 2013. The effect of hospital effluent on antimicrobial resistant *E. coli* within a municipal wastewater system. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 617–622. <https://doi.org/10.1039/c2em30934c>
- Harvey, P.J., Taylor, M.P., Handley, H.K., Foster, S., Gillings, M.R., Asher, A.J., 2017. Chemical, biological, and DNA markers for tracing slaughterhouse effluent. *Environ. Res.* 156, 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.006>
- Hassoun-Kheir, N., Stabholz, Y., Kreft, J.-U., de la Cruz, R., Romalde, J.L., Nesme, J., Sørensen, S.J., Smets, B.F., Graham, D., Paul, M., 2020. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Sci. Total Environ.* 743, 140804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140804>
- Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B.T., Scheie, A.A., Sunde, M., Yazdankhah, S.P., 2010. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and

- spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb. Drug Resist. Larchmt.* N 16, 91–104. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C., Fraser, C.M., 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477–483. <https://doi.org/10.1038/35020000>
- Herlin, C., Bertheuil, N., Bekara, F., Boissiere, F., Sinna, R., Chaput, B., 2017. Leech therapy in flap salvage: Systematic review and practical recommendations. *Ann. Chir. Plast. Esthét., PART 2 e-only: PLASTIC AND @ESTHETIC SURGERY* 62, e1–e13. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2016.06.004>
- Hiller, C.X., Hübner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T., Drewes, J.E., 2019. Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Sci. Total Environ.* 685, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.315>
- Hocquet, D., Llanes, C., Thouverez, M., Kulasekara, H.D., Bertrand, X., Plésiat, P., Mazel, D., Miller, S.I., 2012. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 8, e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002778>
- Homeier-Bachmann, T., Heiden, S.E., Lübcke, P.K., Bachmann, L., Bohnert, J.A., Zimmermann, D., Schaufler, K., 2021. Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Wastewater of Abattoirs. *Antibiot. Basel Switz.* 10, 568. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050568>
- Hoyle, D.V., Davison, H.C., Knight, H.I., Yates, C.M., Dobay, O., Gunn, G.J., Amyes, S.G.B., Woolhouse, M.E.J., 2006. Molecular characterisation of bovine faecal *Escherichia coli* shows persistence of defined ampicillin resistant strains and the presence of class 1 integrons on an organic beef farm. *Vet. Microbiol.* 115, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.006>
- Hultman, J., Tamminen, M., Pärnänen, K., Cairns, J., Karkman, A., Virta, M., 2018. Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy038>
- Igbinosa, I.H., Igbinosa, E.O., Okoh, A.I., 2015. Detection of antibiotic resistance, virulence gene determinants and biofilm formation in *Aeromonas* species isolated from cattle. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 17596–17605. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4934-4>
- INTEGRALL [WWW Document], <http://integrall.bio.ua.pt/>? . <http://integrall.bio.ua.pt/> URL <http://integrall.bio.ua.pt/> (accessed 4.19.22).
- Islam, M.A., Islam, M., Hasan, R., Hossain, M.I., Nabi, A., Rahman, M., Goessens, W.H.F., Endtz, H.P., Boehm, A.B., Faruque, S.M., 2017. Environmental Spread of New Delhi Metallo- β -Lactamase-1-Producing Multidrug-Resistant Bacteria in Dhaka, Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00793-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00793-17>
- Jacobs, L., Chenia, H.Y., 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030>
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 35–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>

- Jin, M., Liu, L., Wang, D.-N., Yang, D., Liu, W.-L., Yin, J., Yang, Z.-W., Wang, H.-R., Qiu, Z.-G., Shen, Z.-Q., Shi, D.-Y., Li, H.-B., Guo, J.-H., Li, J.-W., 2020. Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *ISME J.* 14, 1847–1856. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0656-9>
- Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., Sundström, L., 2004. Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res.* 32, 4033–4043. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh730>
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Barreiro, P., Vieira, L., Moura, I.B., Caniça, M., 2016. Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. *Front. Microbiol.* 7, 1400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01400>
- Jové, T., 2021. Functional characterization of a novel class of mobile integrons.
- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2010. Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *PLoS Genet.* 6, e1000793. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000793>
- Jové, T., Da Re, S., Tabesse, A., Gassama-Sow, A., Ploy, M.-C., 2017. Gene Expression in Class 2 Integrons Is SOS-Independent and Involves Two P_c Promoters. *Front. Microbiol.* 8, 1499. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01499>
- Jové, T., Tilloy, V., Laval, L., Da Silva, C., Gaschet, M., Guérin, E., Ploy, M.-C., Dagot, C., Barraud, O., 2022. Integrons gene cassettes in effluents: from integrons to “cassettomics.”
- Kadlec, K., Schwarz, S., 2008. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 469–473. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn233>
- Kadlec, K., von Czapiewski, E., Kaspar, H., Wallmann, J., Michael, G.B., Steinacker, U., Schwarz, S., 2011. Molecular basis of sulfonamide and trimethoprim resistance in fish-pathogenic *Aeromonas* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7147–7150. <https://doi.org/10.1128/AEM.00560-11>
- Kargar, M., Mohammadipour, Z., Doosti, A., Lorzadeh, S., Japoni-Nejad, A., 2014. High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheogenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health Res. Perspect.* 5, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.06.003>
- Karkman, A., Pärnänen, K., Larsson, D.G.J., 2019. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat. Commun.* 10, 80. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R.K., Viridi, J.S., Gulati, P., 2018. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
- Kholodii, G.Ya., Mindlin, S. z., Bass, I. a., Yurieva, O. v., Minakhina, S. v., Nikiforov, V. g., 1995. Four genes, two ends, and a res region are involved in transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a mer operon or an integron. *Mol. Microbiol.* 17, 1189–1200. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061189.x
- Kienzle, N., Muller, M., Pegg, S., 2000. *Aeromonas* wound infection in burns. *Burns* 26, 478–482. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00188-6)

- Kim, S., Park, H., Chandran, K., 2010. Propensity of activated sludge to amplify or attenuate tetracycline resistance genes and tetracycline resistant bacteria: A mathematical modeling approach. *Chemosphere* 78, 1071–1077. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.068>
- Kongprajug, A., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2019. CrAssphage as a Potential Human Sewage Marker for Microbial Source Tracking in Southeast Asia. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 6, 159–164. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.9b00041>
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., Harnisz, M., 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014>
- Kruer, R.M., Barton, C.A., Roberti, G., Gilbert, B., McMillian, W.D., 2015. Antimicrobial prophylaxis during *Hirudo medicinalis* therapy: a multicenter study. *J. Reconstr. Microsurg.* 31, 205–209. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1395395>
- Kwak, Y.-K., Colque, P., Byfors, S., Giske, C.G., Möllby, R., Kühn, I., 2015. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.016>
- Lacotte, Y., Ploy, M.-C., Raheison, S., 2017. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J.* 11, 1535–1544. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.38>
- Lai, C.-C., Shiao, C.-C., Lu, G.-D., Ding, L.-W., 2007. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: Rare pathogens of infection in a burn patient. *Burns* 33, 255–257. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.06.003>
- Lamba, M., Graham, D.W., Ahammad, S.Z., 2017. Hospital Wastewater Releases of Carbapenem-Resistance Pathogens and Genes in Urban India. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13906–13912. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03380>
- Lamba, M., Gupta, S., Shukla, R., Graham, D.W., Sreekrishnan, T.R., Ahammad, S.Z., 2018. Carbapenem resistance exposures via wastewaters across New Delhi. *Environ. Int.* 119, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.004>
- Lamy, B., Baron, S., Barraud, O., 2022. *Aeromonas*: the multifaceted middleman in the One Health world. *Curr. Opin. Microbiol.* 65, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.012>
- Laquaz, M., Dagot, C., Bazin, C., Bastide, T., Gaschet, M., Ploy, M.-C., Perrodin, Y., 2018. Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 9243–9253. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9957-6>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Knapp, C.W., Correa Galeote, D., Gálvez, A., Abriouel, H., 2014. Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PloS One* 9, e114252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114252>
- Le plan Ecoantibio 2 (2017-2022), 2017.
- Le plan Ecoantibio (2012-2017), 2012.
- Lee, M.D., Sanchez, S., Zimmer, M., Idris, U., Berrang, M.E., McDermott, P.F., 2002. Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3660–3664. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3660-3664.2002>

- Lee, M.-F., Peng, C.-F., Lin, Y.-H., Lin, S.-R., Chen, Y.-H., 2008. Molecular diversity of class 1 integrons in human isolates of *Aeromonas* spp. from southern Taiwan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61, 343–349.
- Léon, A., Castagnet, S., Maillard, K., Paillot, R., Giard, J.-C., 2020. Evolution of In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Equine Clinical Isolates in France between 2016 and 2019. *Anim. Open Access J. MDPI* 10, 812. <https://doi.org/10.3390/ani10050812>
- Lerminiaux, N.A., Cameron, A.D.S., 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can. J. Microbiol.* 65, 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Leverstein-van Hall, M.A., M Blok, H.E., T Donders, A.R., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J., 2003. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J. Infect. Dis.* 187, 251–259. <https://doi.org/10.1086/345880>
- Levings, R.S., Lightfoot, D., Partridge, S.R., Hall, R.M., Djordjevic, S.P., 2005. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *J. Bacteriol.* 187, 4401–4409. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4401-4409.2005>
- Li, J., Cheng, W., Xu, L., Strong, P.J., Chen, H., 2015. Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 4587–4596. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3665-2>
- Lindsey, R.L., Fedorka-Cray, P.J., Frye, J.G., Meinersmann, R.J., 2009. Inc A/C Plasmids Are Prevalent in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1908–1915. <https://doi.org/10.1128/AEM.02228-08>
- Liu, C.-C., Tang, C.Y., Chang, K.-C., Kuo, H.-Y., Liou, M.-L., 2014. A comparative study of class 1 integrons in *Acinetobacter baumannii*. *Gene* 544, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.047>
- Loot, C., Ducos-Galand, M., Escudero, J.A., Bouvier, M., Mazel, D., 2012. Replicative resolution of integron cassette insertion. *Nucleic Acids Res.* 40, 8361–8370. <https://doi.org/10.1093/nar/gks620>
- Lopes, G.V., Michael, G.B., Cardoso, M., Schwarz, S., 2016. Antimicrobial resistance and class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. *Vet. Microbiol., ARAE 2015, Antimicrobial Resistance of Bacteria from Animals and the Environment* 194, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.020>
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., Olańczuk-Neyman, K., 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res., Microbial ecology of drinking water and waste water treatment processes* 44, 5089–5097. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.007>
- Ludden, C., Reuter, S., Judge, K., Gouliouris, T., Blane, B., Coll, F., Naydenova, P., Hunt, M., Tracey, A., Hopkins, K.L., Brown, N.M., Woodford, N., Parkhill, J., Peacock, S.J., 2017. Sharing of carbapenemase-encoding plasmids between Enterobacteriaceae in UK sewage uncovered by MinION sequencing. *Microb. Genomics* 3, e000114. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000114>
- Lui, C., Barkley, T.W.J., 2015. Medicinal leech therapy: New life for an ancient treatment. *Nursing2022* 45, 25–30. <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000472561.41030.2d>

- Lukkana, M., Wongtavatchai, J., Chuanchuen, R., 2012. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *J. Vet. Med. Sci.* 74, 435–440. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0441>
- Lupo, A., Coyne, S., Berendonk, T.U., 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front. Microbiol.* 3, 18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>
- Ma, X., Dong, X., Cai, J., Fu, C., Yang, J., Liu, Y., Zhang, Y., Wan, T., Lin, S., Lou, Y., Zheng, M., 2022. Metagenomic Analysis Reveals Changes in Bacterial Communities and Antibiotic Resistance Genes in an Eye Specialty Hospital and a General Hospital Before and After Wastewater Treatment. *Front. Microbiol.* 13.
- Marathe, N.P., Berglund, F., Razavi, M., Pal, C., Dröge, J., Samant, S., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2019. Sewage effluent from an Indian hospital harbors novel carbapenemases and integron-borne antibiotic resistance genes. *Microbiome* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0710-x>
- Marathe, N.P., Gaikwad, S.S., Vaishampayan, A.A., Rasane, M.H., Shouche, Y.S., Gade, W.N., 2016. *Mossambicus tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) collected from water bodies impacted by urban waste carries extended-spectrum beta-lactamases and integron-bearing gut bacteria. *J. Biosci.* 41, 341–346. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9620-2>
- Marathe, N.P., Nagarkar, S.S., Vaishampayan, A.A., Rasane, M.H., Samant, S.A., Dohe, V., Kagal, A., Shouche, Y.S., Deshpande, N., 2015. High prevalence of class 1 integrons in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from India. *Indian J. Med. Microbiol.* 33, 231–236. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.154905>
- Martin, C., Timm, J., Rauzier, J., Gomez-Lus, R., Davies, J., Gicquel, B., 1990. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature* 345, 739–743. <https://doi.org/10.1038/345739a0>
- Masters, M.C., Gupta, A.R., Rhodes, N.J., Flaherty, J.P., Zembower, T.R., Alghoul, M., Krueger, K.M., 2020. Multidrug resistant *Aeromonas* infection following medical leech therapy: A case report and development of a joint antimicrobial stewardship and infection prevention protocol. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 23, 349–351. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.10.010>
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 608–620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1462>
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J., 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280, 605–608. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.605>
- McEwen, S.A., Collignon, P.J., 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Meir-Gruber, L., Manor, Y., Gefen-Halevi, S., Hindiyeh, M.Y., Mileguir, F., Azar, R., Smollan, G., Belausov, N., Rahav, G., Shamiss, A., Mendelson, E., Keller, N., 2016. Population Screening Using Sewage Reveals Pan-Resistant Bacteria in Hospital and Community Samples. *PloS One* 11, e0164873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164873>
- Mendes Moreira, A., Couvé-Deacon, E., Bousquet, P., Chainier, D., Jové, T., Ploy, M.-C., Barraud, O., 2019. Proteae: a reservoir of class 2 integrons? *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1560–1562. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz079>
- Millanao B, A., Barrientos H, M., Gómez C, C., Tomova, A., Buschmann, A., Dölz, H., Cabello, F.C., 2011. [Injudicious and excessive use of antibiotics: public health and salmon

aquaculture in Chile]. *Rev. Med. Chil.* 139, 107–118. <https://doi.org/S0034-98872011000100015>

- Moradian Kouchaksaraei, F., Ferdosi Shahandashti, E., Molana, Z., Moradian Kouchaksaraei, M., Asgharpour, F., Mojtahedi, A., Rajabnia, R., 2012. Molecular detection of integron genes and pattern of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from intensive care unit, Shahid Beheshti Hospital, north of Iran. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 1, 209–217.
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., Correia, A., 2007. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1243–1250. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm340>
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., Correia, A., 2010. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.11.004>
- Moura, A., Soares, M., Pereira, C., Leitao, N., Henriques, I., Correia, A., 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 25, 1096–1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>
- 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. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>
- Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B.H., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalho, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Iregbu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Khorana, M., Kissoon, N., Kobeissi, E., Kostyanov, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H.H., Lim, C., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Mussi-Pinhata, M.M., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Peleg, A.Y., Perrone, C., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rudd, K.E., Russell, N., Schnall, J., Scott, J.A.G., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Turner, C., Turner, P., van Doorn, H.R., Velaphi, S., Vongpradith, A., Vu, H., Walsh, T., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wozniak, T., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2001. Characterization of In53, a Class 1 Plasmid- and Composite Transposon-located Integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* 183, 235–249. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.235-249.2001>

- Nagar, V., Sinha, V., Bandekar, J.R., 2015. Diverse Profiles of N-acyl Homoserine L-Lactones, Biofilm, Virulence Genes and Integrons in Food-Borne *Aeromonas* Isolates. *J. Food Sci.* 80, M1861–M1870. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12949>
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., Summers, A.O., 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7118–7122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306466101>
- Nawaz, M., Khan, S.A., Khan, A.A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., Steele, R., 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol.* 27, 327–331. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.007>
- Ndi, O.L., Barton, M.D., 2011. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* 34, 589–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x>
- Nesvera, J., Hochmannová, J., Pátek, M., 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 391–395. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13345.x>
- Nijssen, S., Florijn, A., Top, J., Willems, R., Fluit, A., Bonten, M., 2005. Unnoticed spread of integron-carrying *Enterobacteriaceae* in intensive care units. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 41, 1–9. <https://doi.org/10.1086/430711>
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51, 381–395.
- Novo, A., Manaia, C.M., 2010. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1157–1166. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2583-6>
- Nunes-Düby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., Landy, A., 1998. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* 26, 391–406. <https://doi.org/10.1093/nar/26.2.391>
- Oberlé, K., Capdeville, M.-J., Berthe, T., Budzinski, H., Petit, F., 2012. Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1859–1868. <https://doi.org/10.1021/es203399h>
- OMS, 2015. Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens.
- O'Neill, J., 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations (Report). Government of the United Kingdom.
- Otero-Olarra, J.E., Curiel-Quesada, E., Baltazar-Cruz, J., Aguilera-Arreola, Ma.G., Pérez-Valdespino, A., 2020. Low Cassette Variability in Class 2 and Class 1 Integrons of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental Samples. *Microb. Drug Resist.* 26, 794–801. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0250>
- Papagiannitsis, C.C., Dolejska, M., Izdebski, R., Dobiasova, H., Studentova, V., Esteves, F.J., Derde, L.P.G., Bonten, M.J.M., Hrabák, J., Gniadkowski, M., 2015. Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 β -Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5065–5068. <https://doi.org/10.1128/AAC.00937-15>
- Partridge, S.R., 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 820–855. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x>
- Partridge, S.R., Hall, R.M., 2005. Evolution of Transposons Containing blaTEM Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1267–1268. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1267-1268.2005>

- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757–784. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x>
- Passerat, J., Tamtam, F., Le Bot, B., Eurin, J., Chevreuil, M., Servais, P., 2010. Antimicrobials and faecal bacteria resistant to antimicrobials in the rivers of the Seine River watershed: impacts of hospital effluents.
- Paulsen, I.T., Littlejohn, T.G., Rådström, P., Sundström, L., Sköld, O., Swedberg, G., Skurray, R.A., 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 761–768. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.4.761>
- Pei, M., Zhang, B., He, Y., Su, J., Gin, K., Lev, O., Shen, G., Hu, S., 2019. State of the art of tertiary treatment technologies for controlling antibiotic resistance in wastewater treatment plants. *Environ. Int.* 131, 105026. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105026>
- Pellegrini, C., Celenza, G., Segatore, B., Bellio, P., Setacci, D., Amicosante, G., Perilli, M., 2011. Occurrence of class 1 and 2 integrons in resistant Enterobacteriaceae collected from a urban wastewater treatment plant: first report from central Italy. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* N 17, 229–234. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0117>
- Pérez-Viso, B., Hernández-García, M., Ponce-Alonso, M., Morosini, M.I., Ruiz-Garbajosa, P., Del Campo, R., Cantón, R., 2021. Characterization of carbapenemase-producing *Serratia marcescens* and whole-genome sequencing for plasmid typing in a hospital in Madrid, Spain (2016-18). *J. Antimicrob. Chemother.* 76, 110–116. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa398>
- Perrin-Guyomard, A., Jouy, E., Urban, D., Chauvin, C., Granier, S.A., Mourand, G., Chevance, A., Adam, C., Moulin, G., Kempf, I., 2020. Decrease in fluoroquinolone use in French poultry and pig production and changes in resistance among *E. coli* and *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.* 243, 108637. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108637>
- Pessoa, R.B.G., Oliveira, W.F. de, Correia, M.T. dos S., Fontes, A., Coelho, L.C.B.B., 2022. *Aeromonas* and Human Health Disorders: Clinical Approaches. *Front. Microbiol.* 13.
- Petrillo, M., Angers-Loustau, A., Kreysa, J., 2016. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect. Dis.* 16, 280. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00005-0)
- Pexara, A., Solomakos, N., Govaris, A., 2020. Occurrence, antibiotic resistance and enteroxigenicity of *Staphylococcus* spp. in tonsils of slaughtered pigs in Greece. *Lett. Appl. Microbiol.* 71, 394–399. <https://doi.org/10.1111/lam.13342>
- Ploy, M.C., Courvalin, P., Lambert, T., 1998. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2557–2563. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.10.2557>
- Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert, T., 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2684–2688. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2684-2688.2000>

- Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R., Nordmann, P., 2010. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1594–1598. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq166>
- Pourrahimi, M., Abdi, M., Ghods, R., 2020. Complications of leech therapy. *Avicenna J. Phytomedicine* 10, 222–234.
- Power, M.L., Samuel, A., Smith, J.J., Stark, J.S., Gillings, M.R., Gordon, D.M., 2016. *Escherichia coli* out in the cold: Dissemination of human-derived bacteria into the Antarctic microbiome. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 215, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.013>
- Proia, L., Anzil, A., Borrego, C., Farrè, M., Llorca, M., Sanchis, J., Bogaerts, P., Balcázar, J.L., Servais, P., 2018. Occurrence and persistence of carbapenemases genes in hospital and wastewater treatment plants and propagation in the receiving river. *J. Hazard. Mater.* 358, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.06.058>
- Proia, L., von Schiller, D., Sánchez-Melsió, A., Sabater, S., Borrego, C.M., Rodríguez-Mozaz, S., Balcázar, J.L., 2016. Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 210, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.035>
- Rafraf, I.D., Lekunberri, I., Sánchez-Melsió, A., Aouni, M., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., 2016. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. *Environ. Pollut.* 219, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.062>
- Ramírez, M.S., Quiroga, C., Centrón, D., 2005a. Novel Rearrangement of a Class 2 Integron in Two Non-Epidemiologically Related Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 5179–5181. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5179-5181.2005>
- Ramírez, M.S., Vargas, L.J., Cagnoni, V., Tokumoto, M., Centrón, D., 2005b. Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4418–4420. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4418-4420.2005>
- Rapa, R.A., Labbate, M., 2013. The function of integron-associated gene cassettes in *Vibrio* species: the tip of the iceberg. *Front. Microbiol.* 4, 385. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00385>
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol. Read. Engl.* 141 (Pt 12), 3015–3027. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3015>
- Rehman, M.S.U., Rashid, N., Ashfaq, M., Saif, A., Ahmad, N., Han, J.-I., 2015. Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries. *Chemosphere* 138, 1045–1055. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.036>
- Reith, M.E., Singh, R.K., Curtis, B., Boyd, J.M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., Nash, J.H., Johnson, S.C., Brown, L.L., 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* 9, 427. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-427>
- Remoué, A., Flavien, B., Dessomme, B., Caillon, J., Boutoille, D., Rouiller, I., Huon, J., Navas, D., 2017. Revue de pertinence des prescriptions de carbapénèmes au sein d'un centre hospitalo-universitaire. *Médecine Mal. Infect.*, 18es Journées Nationales d'Infectiologie - du mercredi 21 au vendredi 23 juin 2017 47, S45. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.03.111>
- Résistance aux antimicrobiens nouveau plan d'action de la Commission pour intensifier la lutte contre ce phénomène, 2017.

- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.-C., Combe, M., Pepey, E., Pouyau, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H., Gozlan, R.E., 2020. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nat. Commun.* 11, 1870. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15735-6>
- Rizvi, S.G., Ahammad, S.Z., 2022. COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. *Sci. Total Environ.* 807, 150873. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150873>
- Robert, J., Péan, Y., Alfandari, S., Bru, J.-P., Bedos, J.-P., Rabaud, C., Gauzit, R., on behalf of the Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), the O.N. de l'Epidémiologie de la R.B. aux A. (ONERBA) and the S. de la P. des A. (SPA) group, 2017. Application of guidelines for aminoglycosides use in French hospitals in 2013–2014. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 1083–1090. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2892-5>
- Roberts, M.C., 2018. Antibiotics and Resistance in the Environment, in: Fong, I.W., Shlaes, D., Drlica, K. (Eds.), *Antimicrobial Resistance in the 21st Century*. Springer International Publishing, Cham, pp. 383–407. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78538-7_12
- Robinson, T.P., Wertheim, H.F.L., Kakkar, M., Kariuki, S., Bu, D., Price, L.B., 2016. Animal production and antimicrobial resistance in the clinic. *The Lancet* 387, e1–e3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00730-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00730-8)
- Rodríguez, E.A., Ramirez, D., Balcázar, J.L., Jiménez, J.N., 2021. Metagenomic analysis of urban wastewater resistome and mobilome: A support for antimicrobial resistance surveillance in an endemic country. *Environ. Pollut.* 276, 116736. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116736>
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Blázquez, J., 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 303, 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>
- Rosser, S.J., Young, H.-K., 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 11–18. <https://doi.org/10.1093/jac/44.1.11>
- Ruzauskas, M., Armalytė, J., Lastauskienė, E., Šiugždinienė, R., Klimienė, I., Mockeliūnas, R., Bartkienė, E., 2021. Microbial and Antimicrobial Resistance Profiles of Microbiota in Common Carps (*Cyprinus carpio*) from Aquacultured and Wild Fish Populations. *Anim. Open Access J. MDPI* 11, 929. <https://doi.org/10.3390/ani11040929>
- S P Galhano, B., G Ferrari, R., Panzenhagen, P., S de Jesus, A.C., A Conte-Junior, C., 2021. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* 9, 923. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050923>
- Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020, 2021. 130.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>
- Savin, M., Alexander, J., Bierbaum, G., Hammerl, J.A., Hembach, N., Schwartz, T., Schmithausen, R.M., Sib, E., Voigt, A., Kreyenschmidt, J., 2021. Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughterhouse after conventional and advanced treatments. *Sci. Rep.* 11, 16622. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96169-y>

- Savin, M., Bierbaum, G., Blau, K., Parcina, M., Sib, E., Smalla, K., Schmithausen, R., Heinemann, C., Hammerl, J.A., Kreyenschmidt, J., 2020a. Colistin-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Process Waters and Wastewater From German Poultry and Pig Slaughterhouses. *Front. Microbiol.* 11, 575391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575391>
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J.A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., Kreyenschmidt, J., 2020b. ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e02748-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-19>
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J.A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., Kreyenschmidt, J., 2020c. Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 727, 138788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138788>
- Schmieder, R., Edwards, R., 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* 7, 73–89. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.135>
- Schnabl, S.M., Kunz, C., Unglaub, F., Polykandriotis, E., Horch, R.E., Dragu, A., 2010. Acute postoperative infection with *Aeromonas hydrophila* after using medical leeches for treatment of venous congestion. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 130, 1323–1328. <https://doi.org/10.1007/s00402-010-1135-y>
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x>
- Schwartz, T., Volkmann, H., Kirchen, S., Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Jansen, B., Obst, U., 2006. Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 158–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00100.x>
- Seiler, C., Berendonk, T.U., 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3, 399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>
- Shaheen, B.W., Wang, C., Johnson, C.M., Kaltenboeck, B., Boothe, D.M., 2009. Detection of fluoroquinolone resistance level in clinical canine and feline *Escherichia coli* pathogens using rapid real-time PCR assay. *Vet. Microbiol.* 139, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.05.016>
- Shi, L., Zheng, M., Xiao, Z., Asakura, M., Su, J., Li, L., Yamasaki, S., 2006. Unnoticed Spread of Class 1 Integrons in Gram-Positive Clinical Strains Isolated in Guangzhou, China. *Microbiol. Immunol.* 50, 463–467. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03815.x>
- Shultzaberger, R.K., Chen, Z., Lewis, K.A., Schneider, T.D., 2007. Anatomy of *Escherichia coli* σ 70 promoters. *Nucleic Acids Res.* 35, 771–788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl956>
- Sib, E., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Klanke, U., Savin, M., Hembach, N., Schallenberg, A., Kehl, K., Albert, C., Gajdiss, M., Zacharias, N., Müller, H., Schmithausen, R.M., Exner, M., Kreyenschmidt, J., Schreiber, C., Schwartz, T., Parcina, M., Bierbaum, G., 2020. Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci. Total Environ.* 746, 140894. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894>

- Siebor, E., Neuwirth, C., 2014. Proteus genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island from two *Proteus mirabilis* French clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 3216–3220. <https://doi.org/10.1093/jac/dku314>
- Siebor, E., Neuwirth, C., 2011. The new variant of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours bla_{VEB-6} and qnrA1 in the multiple antibiotic resistance region. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2513–2520. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr335>
- Sig, A.K., Guney, M., Uskudar Guclu, A., Ozmen, E., 2017. Medicinal leech therapy—an overall perspective. *Integr. Med. Res.* 6, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.001>
- Siguier, P., Gourgouyere, E., Chandler, M., 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 865–891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Sikkema, R., Koopmans, M., 2016. One Health training and research activities in Western Europe. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 6, 33703. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.33703>
- Simo Tchuinte, P.L., Stalder, T., Venditti, S., Ngandjio, A., Dagot, C., Ploy, M.-C., Barraud, O., 2016. Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 431–434. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.018>
- Singh, A.P., 2010. Medicinal leech therapy (Hirudotherapy): A brief overview. *Complement. Ther. Clin. Pract.* 16, 213–215. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.11.005>
- Skoll, P.J., Hudson, D.A., Simpson, J.A., 1998. *Aeromonas hydrophila* in burn patients. *Burns* 24, 350–353. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(98\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(98)00024-2)
- Société de Pathologie, Infectieuse de Langue Française, 2011. Mise au point sur le bon usage des aminosides administrés par voie injectable.
- Sommer, M.O.A., Church, G.M., Dantas, G., 2010. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence* 1, 299–303. <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.12010>
- Spencer, S.J., Tamminen, M.V., Preheim, S.P., Guo, M.T., Briggs, A.W., Brito, I.L., A Weitz, D., Pitkänen, L.K., Vigneault, F., Virta, M.Pj., Alm, E.J., 2016. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J.* 10, 427–436. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.124>
- Spindler, A., Otton, L.M., Fuentesfria, D.B., Corção, 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. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9714-2>
- Stalder, T., 2012. Implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée sur la dissémination de l'antibiorésistance : Dynamique des intégrons de l'émission au rejet.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
- 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. *ISME J.* 8, 768–777. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.189>
- Stokes, H.W., Hall, R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 1669–1683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x>

- Stokes, H.W., Holmes, A.J., Nield, B.S., Holley, M.P., Nevalainen, K.M., Mabbutt, B.C., Gillings, M.R., 2001. Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5240–5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5240-5246.2001>
- Stokes, H.W., O’Gorman, D.B., Recchia, G.D., Parsekhian, M., Hall, R.M., 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 26, 731–745. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6091980.x>
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A.T., Siddiqui, M.T., Mondal, A.H., Haq, Q.M.R., 2018. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Front. Microbiol.* 9, 2066. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>
- Surette, M.D., Wright, G.D., 2017. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 309–329. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093420>
- Surleac, M., Czobor Barbu, I., Paraschiv, S., Popa, L.I., Gheorghe, I., Marutescu, L., Popa, M., Sarbu, I., Talapan, D., Nita, M., Iancu, A.V., Arbune, M., Manole, A., Nicolescu, S., Sandulescu, O., Streinu-Cercel, A., Otelea, D., Chifiriuc, M.C., 2020. Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PLoS ONE* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228079>
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.-H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A., 2009. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 2306–2319. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028233-0>
- Takizawa, S., Soga, E., Hayashi, W., Sakaguchi, K., Koide, S., Tanabe, M., Denda, T., Sugawara, Y., Yu, L., Kayama, S., Sugai, M., Nagano, Y., Nagano, N., 2022. Genomic landscape of blaGES-5- and blaGES-24-harboring Gram-negative bacteria from hospital wastewater: emergence of class 3 integron-associated blaGES-24 genes. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 31, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.09.005>
- Tchuente, P.L.S., 2016. Intégrons de classe 3: aspects mécanistiques et épidémiologiques. Limoges.
- Teban-Man, A., Farkas, A., Baricz, A., Hegedus, A., Szekeres, E., Pârvu, M., Coman, C., 2021. Wastewaters, with or without Hospital Contribution, Harbour MDR, Carbapenemase-Producing, but Not Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiot. Basel Switz.* 10, 361. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040361>
- Teban-Man, A., Szekeres, E., Fang, P., Klümper, U., Hegedus, A., Baricz, A., Berendonk, T.U., Pârvu, M., Coman, C., 2022. Municipal Wastewaters Carry Important Carbapenemase Genes Independent of Hospital Input and Can Mirror Clinical Resistance Patterns. *Microbiol. Spectr.* 10, e0271121. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02711-21>
- The State of World Fisheries and Aquaculture 2020, 2020. . FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T.P., Van Boeckel, T.P., 2020. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiot. Basel Switz.* 9, E918. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>
- Tong, C., Zhuo, X., Guo, Y., 2011. Occurrence and Risk Assessment of Four Typical Fluoroquinolone Antibiotics in Raw and Treated Sewage and in Receiving Waters in Hangzhou, China. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7303–7309. <https://doi.org/10.1021/jf2013937>

- Um, M.M., Barraud, O., Kérourédan, M., Gaschet, M., Stalder, T., Oswald, E., Dagot, C., Ploy, M.-C., Brugère, H., Bibbal, D., 2016. Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health. *Water Res.* 88, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.029>
- van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 327–335. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00145-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00145-x)
- Van der Kooij, D., 1988. Properties of aeromonads and their occurrence and hygienic significance in drinking water. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [B]* 187, 1–17.
- van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K., Mevius, D., 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 746–750. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl549>
- Vaz-Moreira, I., Varela, A.R., Pereira, T.V., Fochat, R.C., Manaia, C.M., 2016. Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* N 22, 155–163. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0118>
- Vega-Sánchez, V., Latif-Eugenín, F., Soriano-Vargas, E., Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, Ma.G., Castro-Escarpulli, G., 2014. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes. *Vet. Microbiol.* 172, 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.012>
- Verriere, B., Sabatier, B., Carbonnelle, E., Mainardi, J.L., Prognon, P., Whitaker, I., Lantieri, L., Hivelin, M., 2016. Medicinal leech therapy and *Aeromonas* spp. infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 35, 1001–1006. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2629-5>
- Villa, J., Arana, D.M., Viedma, E., Perez-Montarelo, D., Chaves, F., 2017. Characterization of mobile genetic elements carrying VIM-1 and KPC-2 carbapenemases in *Citrobacter freundii* isolates in Madrid. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 307, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.001>
- Villa, J., Viedma, E., Brañas, P., Orellana, M.A., Otero, J.R., Chaves, F., 2014. Multiclonal spread of VIM-1-producing *Enterobacter cloacae* isolates associated with In624 and In488 integrons located in an IncHI2 plasmid. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.006>
- Waldor, M.K., Tschäpe, H., Mekalanos, J.J., 1996. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 178, 4157–4165.
- Wang, E.W., Warren, D.K., Ferris, V.M., Casabar, E., Nussenbaum, B., 2011. Leech-transmitted ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 137, 190–193. <https://doi.org/10.1001/archoto.2010.257>
- Wang, Q., Wang, P., Yang, Q., 2018. Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Sci. Total Environ.* 621, 990–999. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.128>
- Waseem, H., Jameel, S., Ali, J., Saleem Ur Rehman, H., Tauseef, I., Farooq, U., Jamal, A., Ali, M.I., 2019. Contributions and Challenges of High Throughput qPCR for Determining Antimicrobial Resistance in the Environment: A Critical Review. *Molecules* 24, 163. <https://doi.org/10.3390/molecules24010163>



- Whittle, G., Shoemaker, N.B., Salyers, A.A., 2002. The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 59, 2044–2054.
- Wilmer, A., Slater, K., Yip, J., Carr, N., Grant, J., 2013. The role of leech water sampling in choice of prophylactic antibiotics in medical leech therapy. *Microsurgery* 33, 301–304. <https://doi.org/10.1002/micr.22087>
- Xu, H., Davies, J., Miao, V., 2007. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J. Bacteriol.* 189, 6276–6283. <https://doi.org/10.1128/JB.00348-07>
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., Meng, W., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere* 119, 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>
- Xu, Z., Li, L., Alam, M.J., Zhang, L., Yamasaki, S., Shi, L., 2008. First Confirmation of Integron-Bearing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* 57, 264–268. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9187-8>
- Xu, Z., Li, L., Shi, L., Shirliff, M.E., 2011. Class 1 integron in staphylococci. *Mol. Biol. Rep.* 38, 5261–5279. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0676-7>
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M.E., Alam, M.J., Yamasaki, S., Shi, L., 2009. Occurrence and Characteristics of Class 1 and 2 Integrons in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients in Southern China. *J. Clin. Microbiol.* 47, 230–234. <https://doi.org/10.1128/JCM.02027-08>
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M.E., Peters, B.M., Peng, Y., Alam, M.J., Yamasaki, S., Shi, L., 2010. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68, 315–317. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.014>
- Yang, F., Han, B., Gu, Y., Zhang, K., 2020. Swine liquid manure: a hotspot of mobile genetic elements and antibiotic resistance genes. *Sci. Rep.* 10, 15037. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72149-6>
- Yang, Y., Zhang, A.-N., Che, Y., Liu, L., Deng, Y., Zhang, T., 2021. Underrepresented high diversity of class 1 integrons in the environment uncovered by PacBio sequencing using a new primer. *Sci. Total Environ.* 787, 147611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147611>
- Yassine, H., Bientz, L., Cros, J., Goret, J., Bébéar, C., Quentin, C., Arpin, C., 2015. Experimental evidence for IS1294b-mediated transposition of the bla_{CMY-2} cephalosporinase gene in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 697–700. <https://doi.org/10.1093/jac/dku472>
- Yasti, A.C., Otan, E., Doganay, M., Kama, N.A., 2009. *Aeromonas hydrophila* in a Burn Patient. *J. Burn Care Res.* 30, 898–900. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3181b487cf>
- Yu, Z., He, P., Shao, L., Zhang, H., Lü, F., 2016. Co-occurrence of mobile genetic elements and antibiotic resistance genes in municipal solid waste landfill leachates: A preliminary insight into the role of landfill age. *Water Res.* 106, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.042>
- Zeichner, J., Seite, S., 2018. From Probiotic to Prebiotic Using Thermal Spring Water. *J. Drugs Dermatol. JDD* 17, 657–662.
- Zhu, Y., Lai, H., Zou, L., Yin, S., Wang, C., Han, X., Xia, X., Hu, K., He, L., Zhou, K., Chen, S., Ao, X., Liu, S., 2017. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *Int. J. Food Microbiol.* 259, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.023>


Zhu, Y.-G., Zhao, Y., Li, B., Huang, C.-L., Zhang, S.-Y., Yu, S., Chen, Y.-S., Zhang, T., Gillings, M.R., Su, J.-Q., 2017. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nat. Microbiol.* 2, 16270. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.270>

Annexes



Annexe 1. Poster présenté à l'*Annual scientific meeting 2021 du One Health European Joint Programm*308

Annexe 1. Poster présenté à l'Annual scientific meeting 2021 du One Health European Joint Programm



Annual Scientific Meeting 2021

“CASSETTOMICS”: METAGENOMICS OF MOBILE INTEGRONS GENE CASSETTES FROM EFFLUENTS

Abstract: 159

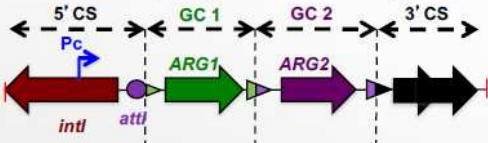
Thomas Jové¹, Lucie Laval¹, Valentin Tilloy², Claire Da Silva¹, Margaux Gaschet¹, Emilie Guérin³, Christophe Dagot¹, Marie-Cécile Ploy¹ and Olivier Barraud¹

¹ INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Université Limoges, Limoges, France ² CNR Herpesvirus, UFR481 Bioinformatics, CHU Limoges, Limoges, France ³ UF8843 Medical Genomics Department, CHU Limoges, France

How to extensively describe the pool of integrons-associated antibiotic resistance genes in an effluent?

Background


- Antimicrobial resistance (AMR) is one of the TOP 10 global public issue (WHO, 2018)
- AMR is mostly due to horizontal exchanges of **antibiotic resistant genes (ARG)**
- ARG horizontal transfer requires genetic drivers like **integrons** (structure below)



- Integrons encode an **IntI** integrase that recruits ARG embedded within **gene cassettes (GC)**
- Integrons **express** ARG thanks to the **Pc** promoter and **disseminate** GC
- Our group identified **426** GC so far, **174** encoding ARG concerning **11** antibiotic classes

Novel NGS-based strategy to describe the pool of integrons GC

End-point PCR with primers in 5'CS/3'CS of the variable GC array



- 1- Shotgun NGS of GC arrays
- 2- Raw reads mapping against known GCs
- 3- De novo assembly of unmapped reads
- 4- Detection of GCs (IntegronFinder) in >500bp contigs
- 5- Blastn to identify novel GCs

6- Enrichment of the GC list and back to 2-

Novel GC

« Cassettomics » on 24 effluents from various origins



2 WWTP influents



2 Rivers



2 Urban



10 Hospitals



ONE HEALTH



8 Slaughterhouses

FUNDINGS
APREL CHU LIMOGES 2014, R18065GG
Ministère de l'Agriculture Plan EcoAntibio2, convention 2018-137

Main results and conclusions



- Each effluent has its own « cassetome » signature
- β -lactams (red) and aminoglycosides (blue) GCs ++
- Detection of many novel GC of various function ($n > 375$)

PCoA revealed types of effluents can be discriminated thanks to their « cassetomes »







Les intégrons comme marqueurs de pollution anthropique dans l'environnement

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Il est aujourd'hui nécessaire d'y lutter de façon globale, aussi bien chez l'Homme, que chez l'animal ou dans l'environnement (concept « *One Health* »). Parmi les éléments impliqués dans la résistance, les intégrons jouent un rôle clé. Ce sont des éléments génétiques bactériens capables de capturer et d'exprimer des gènes de résistance sous forme de cassettes et on les distingue selon plusieurs classes. Dans l'environnement, les intégrons de classe 1 sont considérés comme un bon marqueur de la pollution anthropique et ils sont souvent utilisés pour étudier les disséminations des résistances ; néanmoins, leur contenu en cassettes (ou « cassetome ») est peu connu. Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons étudié les « cassetomes » des intégrons dans des effluents de centres de soins de la région Nouvelle-Aquitaine et montré qu'ils étaient stables dans le temps et semblables entre eux malgré de grosses différences d'activité de soins entre les établissements. Les « cassetomes » étaient constitués majoritairement de gènes de résistance aux aminosides et aux β -lactamines, ces derniers étant les principaux antibiotiques délivrés dans le milieu hospitalier. Nous avons également caractérisé les « cassetomes » d'effluents d'abattoirs et montré que les « cassetomes » des intégrons de classe 1 étaient différents de ceux des effluents de centres de soins. La deuxième partie de ce travail de thèse a montré des prévalences différentes d'intégrons dans des souches d'*Aeromonas* infectant/colonisant des poissons soumis à différentes pressions de sélection antibiotique. Nous avons montré que les intégrons sont plus prévalents dans des populations de poissons soumises à une pression de sélection antibiotique plus forte et que leur contenu en cassettes était peu variable. Il ressort de nos travaux que les intégrons et plus spécifiquement les « cassetomes » sont de bons marqueurs dans l'environnement pour premièrement différencier les différents types d'effluents entre eux (centres de soins versus abattoirs) et deuxièmement pour refléter une pression de sélection exercée sur les animaux que sont les poissons.

Mots-clés : Intégrons, cassettes, environnement, effluents, poissons

Integrans as anthropogenic pollution marker in environment

Antimicrobial resistance (AMR) is a major public health issue. It is now necessary to tackle AMR globally, in humans, animals and in the environment (« *One Health* » approach). Among genetic elements involved in AMR, integrons play a key role. Integrons are bacterial genetic elements able to capture and express antibiotic resistance genes in the form of gene cassettes and are distinguished according to several classes. In the environment, class 1 integrons are considered as a good marker of anthropogenic pollution and are used to study AMR dissemination; however, little is known about their genes cassettes content (or « cassetome »). In the first part of this thesis, we studied the « cassetomes » of integrons in the effluents of healthcare facilities of the Nouvelle-Aquitaine Region and showed that they were stable over times and similar to each other despite large differences in healthcare activities between the facilities. The « cassetomes » were mainly composed of aminoglycosides and β -lactams resistance gene cassettes, the last one being the main antibiotics delivered in hospitals. We also characterized the « cassetomes » of slaughterhouse effluents and showed that the « cassetomes » of class 1 integrons were different from those of healthcare facilities effluents. The second part of this thesis work showed different prevalences of integrons in *Aeromonas* strains infecting/colonizing fish subjected to different antibiotic selective pressures. We showed that integrons were more prevalent in fish populations subjected to stronger antibiotic selective pressure contrary to *Aeromonas* from wild fish where they were not detected. Our work shows that integrons and more specifically « cassetomes » are good markers in the environment to differentiate different types of effluents (healthcare facilities versus slaughterhouses) and secondly to reflect an antibiotic selective pressure exerted on fish.

Keywords : Integrans, gene cassettes, environment, effluents, fishes

