

Suivi des marqueurs de la dissémination de l'antibiorésistance (biofilms, sédiments, biote) dans une rivière urbanisée du bassin de la Seine (l'Orge)

Anne Laure Vivant¹, T. Berthe^{1,2}, E. Guigon², B. Janvier¹, Y. Colin¹, F. Alliot², A. Goutte², E. Marchand^{1,2}, Thomas Thiebault², D. Valdés², H. Blanchoud², C. Dagot³, N. Grall⁴, F. Petit^{1,2}.

¹UMR M2C Normandie Université

²UMR METIS EPHE Sorbonne Université

³UMR INSERM 1092, Université Limoges

⁴UMR INSERM 1137 IAME, Paris Diderot

fabienne Petit @univ-rouen.fr/aurelie.goutte@upmc.fr

Résumé

*Le suivi des marqueurs chimiques et bactériens de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement, préconisé par l'ANSES (2021), a été réalisé dans les sédiments, les biofilms et l'ichtyofaune d'une rivière urbanisée : l'Orge. Les résultats montrent que les biofilms et les sédiments sont des zones de piégeage d'entérobactéries ATBr (antibiorésistantes) et d'intégrons cliniques. Toutefois, bien que ces bactéries ATBr ne s'y maintiennent pas, leurs génomes, dont les intégrons cliniques, semblent persister plus longtemps sans pour autant s'y accumuler. Les contaminants chimiques (antibiotiques (ATB), pesticides (biocides et produits phytosanitaires)), susceptibles de favoriser le maintien, voire l'émergence de bactéries ATBr, sont détectés avec des profils de contamination qui diffèrent selon les matrices. Toutefois, il n'y a pas de relation entre les profils de résistance aux ATB des *E. coli* isolés des biofilms et des sédiments et la contamination en ATB de ces matrices. Le déterminisme de cette contamination est complexe et, à ce stade de l'exploitation des résultats, il n'a pas pu être établi de relation simple avec la pluviométrie ou le débit. Les premiers résultats obtenus sur des poissons encagés en aval à proximité des rejets filtrés d'une STEU (Ollainville) montrent que l'exposition des poissons dans cette zone de rejet affecte la proportion d'entérobactéries du microbiote cutané, et que ces poissons sont porteurs d'entérobactéries et de *Pseudomonas* (bactéries pathogènes opportunistes) résistantes aux ATB.*

Points clefs

- ✓ *Les biofilms et les sédiments sont des zones de piégeage d'entérobactéries ATBr, dans ces matrices, les bactéries ATBr ne se maintiennent pas, même si leurs génomes dont les intégrons cliniques, semblent persister plus longtemps*
- ✓ *Les profils de contamination en ATB et pesticides diffèrent selon les matrices, et il n'y a pas de relation entre les profils de résistance aux antibiotiques des *E. coli* et la contamination en ATB des biofilms et des sédiments*
- ✓ *Les goujons sont porteurs d'entérobactéries et de *Pseudomonas*, résistantes aux ATBs.*

Abstract

Chemical and bacterial markers of the dissemination of antibiotic resistance in the environment, recommended by ANSES (2021), were monitored in the sediments, biofilms and freshwater fish of the urbanized Orge River. The results show that biofilms and sediments are trapping areas for antibiotic-resistant (ATBr) enterobacteria and clinical integrons. However, these ATBr bacteria do not persist in these matrices while their genomes - including clinical integrons - apparently persist longer, without any accumulation therein. Chemical contaminants (antibiotics (ATBs), pesticides (biocidal products and plant protection products)), likely to promote the retention or even the emergence of ATBr bacteria, are detected with differences in contamination profiles between the two matrices. However, there is no relationship between the antibiotic resistance profiles of E. coli isolated from biofilms and sediments and the antibiotic contamination of these matrices. The determinism of this contamination is complex and, at the present time of analysis of the results, no simple relationship with pluviometry or river flow could be established. The first results obtained on caged freshwater fish that were exposed to river water contaminated by filtered discharge from a WWTP (Ollainville) show that this exposure affects the proportion of enterobacteria in the skin microbiota, and confirms that these fish are colonized by Enterobacteriaceae and Pseudomonas, opportunistic pathogens that are resistant to ATBs.

Key points

- ✓ Biofilms and sediments are trapping areas for bacteria resistant to antibiotic and clinical integrons, ATBr bacteria do not persist in these matrices while their genomes-including clinical integrons-apparently persisting longer
- ✓ Antibiotic and pesticide contamination differ according to the matrices and there is no relationship between E. coli antibiotic-resistance profiles and antibiotic contamination of biofilms and sediments
- ✓ Gudgeons carry Enterobacteriaceae and Pseudomonas, resistant to antibiotics for human therapy.

1. Contexte et rappel des objectifs

Depuis 1950, l'usage intensif des antibiotiques (ATB) en médecine humaine et animale s'est accompagné d'une augmentation sans précédent de la résistance bactérienne en milieu clinique, et par conséquent d'une contamination diffuse de l'environnement (eaux, sols et sédiments) par des ATB et par des bactéries antibiorésistantes (ATBr). Dès 2001, puis en 2014, 2016 et 2019, l'OMS, l'Europe et la France, considèrent l'antibiorésistance bactérienne comme un problème majeur en santé publique et soulignent que l'environnement joue probablement un rôle dans l'émergence et la dissémination de la résistance des bactéries aux antibiotiques (Berendonk, 2015, O'Neill, J., 2014). Dans ce contexte, l'OMS recommande de suivre une démarche, selon le concept « *One Health* » (une seule santé), dans laquelle la dissémination de l'antibiorésistance est appréhendée dans les différents compartiments (environnement, animaux, Homme), avec les mêmes marqueurs. Dans un environnement aquatique, il est ainsi nécessaire d'identifier les niches environnementales « *hot spots* », telles que les sédiments ou les biofilms, exposées d'une part à une multi-contamination chimique dont les ATB, les pesticides (biocides et produits phytopharmaceutiques) et les métaux traces, et d'autre part à une contamination microbiologique, notamment par des bactéries d'origine fécale, résistantes aux ATB (Wales and Davies, 2015, Wright, 2019). Dans ces niches, la présence de contaminants chimiques est susceptible de favoriser la sélection de bactéries co-résistantes à ces contaminants et aux ATBs.

Dans un tel environnement, il apparaît nécessaire d'étudier le rôle potentiel de la faune sauvage comme vecteur de dissémination de bactéries ATBr dans l'environnement.

Dans le bassin versant de la Seine, nos précédents travaux ont montré la présence d'intégrons cliniques dans les sédiments et les biofilms de rivière, ainsi que la présence de bactéries ATBr dans le microbiote cutané et digestif de différentes espèces de poissons de l'Orge (Marchand et al, in prep). Au delà de ces constats, l'objectif de cette action est d'approfondir l'étude menée sur les sédiments et les biofilms le long d'une rivière dont le bassin versant est caractérisé par un fort gradient d'urbanisation amont-aval (l'Orge), afin de mieux comprendre l'exposition et le rôle potentiel de l'ichtyofaune dans la dissémination de l'antibiorésistance en milieu aquatique. Il a été retenu de travailler sur l'espèce *Gobio gobio*, le goujon commun, un petit poisson fouisseur, qui utilise ses barbillons pour se nourrir principalement de larves d'insectes, crustacés, oligochètes et mollusques dans les sédiments. L'année 2021 a été mise à profit pour analyser et conforter les résultats obtenus sur les biofilms et sédiments de l'Orge afin de comprendre la dynamique de contamination par des bactéries fécales ATBr et par des ATB et pesticides des sédiments et biofilms, base de la chaîne trophique. En parallèle, une expérimentation d'exposition *in situ* a été menée sur des goujons sauvages pêchés dans l'Orge, et encagés en amont et en aval des rejets de la STEU d'Ollainville (résultats non présentés ici).

Cette action s'appuie sur des expertises en écotoxicologie, chimie et microbiologie et sur une collaboration étroite entre les UMR M2C et METIS. Elle s'intègre également dans le cadre du doctorat d'Etienne Marchand (2020-2023) sur le projet interdisciplinaire ICAR, financé par le programme MITI du CNRS et le projet PANDORE co-financé par l'ANSES.

2. Méthodologie et Stratégie d'échantillonnage

2.1. Biofilms et sédiments

Le bassin versant de l'Orge, affluent de la Seine en amont de Paris, est un site atelier du programme PIREN-Seine, caractérisé par un important gradient d'anthropisation croissant de l'amont vers l'aval et supporte 41 structures hospitalières. Des pièges à biofilms et des systèmes de collecte de sédiments de surface récemment déposés ont été positionnés sur trois sites : un site de référence amont (Gué d'Orge, à proximité de Saint-Martin-de-Bréthencourt ; noté GO), un site en aval du rejet de de la station d'épuration des eaux usées (STEU) d'Ollainville (Saint-Germain-lès-Arpajon ; noté SGA) et un site en zone la plus urbanisée et situé à l'aval de la confluence avec l'Yvette, (Viry-Châtillon ; noté VC). Chaque site a été équipé de 5 pièges à biofilms à la même date, récupérés successivement à chaque campagne. En revanche, un seul système de collecte de sédiments (système d'alvéoles) a été installé sur chacun des sites, et remis en place après chaque prélèvement. Ainsi, l'âge des biofilms échantillonnés s'étend de 2 à 10 mois, alors que les sédiments correspondent à une collecte pendant la période entre deux campagnes (un mois).

La STEU d'Ollainville (site SGA) étant équipée d'un système d'ultrafiltration, la dégradation de la qualité microbiologique de l'eau, au niveau et en aval du site SGA, ne sera observée que lors d'événements pluvieux majeurs pouvant surcharger temporairement la capacité de traitement de la STEU. De plus, sur la partie aval, il a été identifié plus de 10 rejets d'eaux usées dus à des raccordements dysfonctionnels. En amont du bassin versant, des études préliminaires, menées sur l'un des affluents de l'Orge, ont montré une très faible contamination en ATB (~10 ng/L) des cours d'eau en amont de rejets de STEU, alors qu'en aval des rejets, les concentrations peuvent atteindre entre 200 et 5000 ng/L en fonction des concentrations en ATB dans les rejets des STEU (Dinh et al, 2017a et 2017b). Les prairies situées en zone inondable le long de l'Orge sont également utilisées comme zone de pâturage du bétail et sont donc susceptibles de générer des apports diffus dans le cours d'eau lors d'événements pluvieux. Lors de ce projet, sur le site amont (GO), la rupture de canalisation des réseaux d'assainissement consécutive à un événement pluvieux extrême (11 juin 2018, 78 mm de pluie en 24 h), a occasionné une contamination accidentelle. Trois campagnes de prélèvement ont été réalisées, en période de basses eaux (17 septembre, 23 octobre et 27 novembre 2018) et hautes eaux (19 mars, 24 avril et 27 mai 2019) ainsi que deux campagnes supplémentaires, sur le site de SGA uniquement, pour la collecte de biofilms (11 et 29 juillet 2019).

Les marqueurs bactériens de la dissémination de l'antibiorésistance recherché sont 1) les profils phénotypiques de la résistance aux antibiotiques d'*E. coli* et 2) la recherche d'intégrons cliniques de classe 1, considérés comme des contaminants xénogénétiques (Gillings et al, 2015). Le profil d'antibiorésistance a été effectué selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA- SFM, <http://www.sfm-microbiologie.org/>). Les isolats porteurs d'intégron clinique de classe 1 ont été détectés par analyse PCR (Bass, 1999) à partir de la collection d'*E. coli* et d'entérobactéries non *E. coli* isolés

des biofilms et sédiments prélevés sur les trois sites (trois campagnes). La quantification moléculaire de l'ADNr 16S et des intégrons cliniques a été réalisée en triplicat à l'UMR UNILIM (ADNr 16S et 3 classes d'intégrons cliniques), et à l'UMR M2C (intégrons cliniques de classe 1, et ADNr 16S).

Pour chaque campagne, des antibiotiques, des biocides (triclosan, irgarol, tebuconazole¹ et parabènes) et des produits phytosanitaires ont été recherchés dans l'eau (prélèvements ponctuels et préleveurs passifs de type POCIS), les sédiments et les biofilms, selon les protocoles développés à l'UMR METIS-EPHE (Dinh et al, 2011 ; Thiebault et al., 2021 ; Tamtam et al, 2011, Blanchoud et al, 2020). Les données hydrologiques ont été collectées et analysées par l'UMR METIS.

2.2. Ichtyofaune

En 2021, des goujons sauvages pêchés dans l'Orge (en amont du rejet de la STEU d'Ollainville) ont été encagés à l'amont (60 m) et à l'aval (200 m) du rejet de la STEU d'Ollainville. Cette exposition *in situ* a duré 20 jours, au cours desquels des prélèvements ont été réalisés pour rechercher i) les marqueurs bactériens de l'antibiorésistance, au sein de leurs microbiotes intestinal et cutané selon une approche culturomique et génomique (temps en jours : J0, J7, J20), ii) les marqueurs chimiques de l'antibiorésistance dans le muscle, et iii) les marqueurs du stress oxydant (temps en jours : J0, J7, J14, J20).

3. Occurrence et devenir de marqueurs chimiques (ATB) et bactériens de l'antibiorésistance (*E. coli* ATBr, et intégrons cliniques) dans les biofilms et sédiments de l'Orge

3.1. Les marqueurs bactériens de la dissémination de l'antibiorésistance au sein des biofilms

Le long de la rivière, sur les trois sites, on observe une colonisation des biofilms par la composante bactérienne, qui n'évolue plus entre le deuxième mois et le dixième mois. Le nombre de copies d'ADNr 16S atteint une densité maximale de $2,8 \pm 1,0 \cdot 10^7$ copies / cm² de support, dont une densité des bactéries métaboliquement actives (*i.e.* possédant une C8 estérase positive, détectable en cytométrie phase solide), qui atteint une valeur maximale de $1,3 \pm 0,7 \cdot 10^7$ cellules/cm², et qui, comme le nombre de copies d'ADNr 16S, n'augmente plus à partir du deuxième mois, et ce quel que soit le site.

On observe la présence d'une population d'*E. coli* cultivables piégées au sein des biofilms sur les trois sites. Les plaques du dispositif étant rincées avec un tampon PBS/Tween 80 avant la récupération du biofilm, les bactéries associées de façon transitoire à la surface du périphyton ont été éliminées. Sur l'ensemble des 6 campagnes, donc sur des biofilms âgés (immergés) pendant de 2, 3, 4 et 8, 9 et 10 mois, la densité moyenne en *E. coli* cultivables était significativement plus élevée sur le site le plus urbanisé (VC= $2,5 \pm 2,2 \cdot 10^3$ UFC /100 cm²) comparativement aux deux autres sites GO et SGA (Kruskal-Wallis, P= $4,5 \cdot 10^{-8}$). Sur le site SGA, la densité de $6,5 \pm 3,7 \cdot 10^2$ UFC /100 cm² évolue peu dans le temps. En revanche, sur le site amont, à la suite de la contamination accidentelle mentionnée précédemment, on observe une forte dispersion des valeurs, qui se stabilisent après la réparation du système collecteur des eaux usées. La quantification moléculaire d'*E. coli* (du gène *ybbw*), ne montre pas d'augmentation de l'ADN d'*E. coli* au sein de ces biofilms au cours du temps. Ces résultats suggèrent que les biofilms sont des lieux qui piègent les *E. coli*, mais qu'elles ne s'y accumulent pas, ni leur génome, au cours du temps.

La caractérisation phénotypique de la résistance aux ATB et la recherche d'intégrons cliniques ont été réalisées sur une collection de 406 *E. coli* isolées de biofilms prélevés lors des trois premières campagnes (22 à 50 isolats par site et par campagne). Sur le site aval le plus urbanisé (VC), la proportion d'*E. coli* sensibles aux 16 antibiotiques (ATB) est la plus faible ($63 \pm 30\%$), avec $17 \pm 6,7\%$ de d'*E. coli* résistantes à au moins 1 ATB. Sur le site (SGA), cette proportion est de $83 \pm 5\%$ d'*E. coli* sensibles, avec $10 \pm 7\%$ de bactéries résistantes à au moins 1 ATB. Sur ces deux sites, il n'est pas observé de variations significatives entre les campagnes. En revanche, sur le site amont (GO) la rupture de la canalisation se traduit par une proportion de bactéries sensibles plus faible de $47 \pm 4,7\%$, avec $21 \pm 18 \%$ de bactéries résistantes à au moins 1 ATB. Sur l'ensemble de la collection, 16% des isolats portent un intégron clinique de classe 1, sans que ne soit observée de différence significative entre les deux sites urbanisés SGA et VC. Sur le site amont (GO), la proportion d'isolats portant un intégron clinique de classe 1 au sein de la population d'*E. coli* suit la même logique que l'abondance d'*E. coli* AATBr, avec des valeurs qui diminuent au sein des biofilms prélevés après réparation du réseau collecteur (Fig. 1).

¹ Le tebuconazole a un usage en tant que biocide et produit phytosanitaire

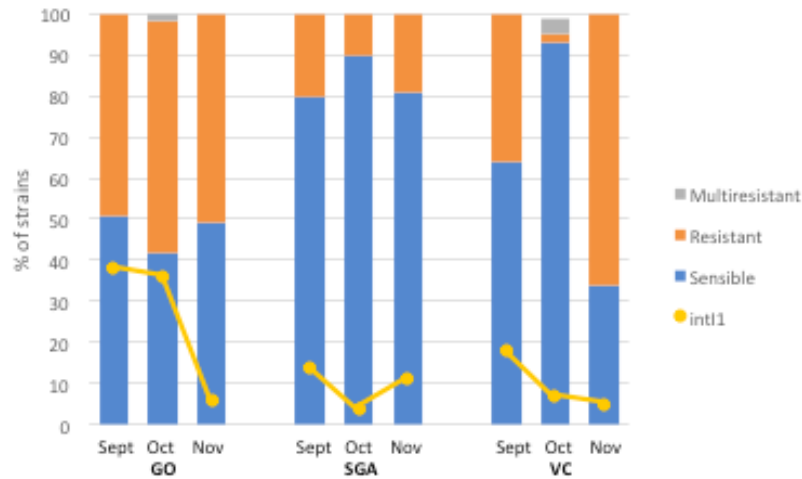


Figure 1. Proportion d'*E. coli* résistant à au moins un antibiotique ; ou à 3 antibiotiques appartenant à des familles différentes (multirésistant) ; et porteurs d'un intégron clinique de classe I, isolés de biofilms le long de l'Orge : GO (Gué d'Orge (GO), Saint-Germain-lès-Arpajon (SGA) et Viry-Châtillon (VC).



Figure 2. Quantification moléculaire des intégrons cliniques de classe I dans les ADN extraits de biofilms le long d'un transect amont-aval d'une rivière urbanisée (Orge) : GO site amont, exposé à une rupture de canalisation les 3 premiers mois ; le site SGA exposé aux rejets de STEUs (les rejets de la STEU la plus proche sont ultrafiltrés), et VC le site le plus urbanisé. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité d'ADNr16S estimée par PCR. Les résultats sont issus d'un triplicat méthodologique (3 biofilms /sites/campagnes) et triplicat technique (3 analyses par PCR). La quantification des ADNr16S et de l'intégrons cliniques de classe I a fait l'objet d'une démarche d'intercalibration entre les UMRs M2C et Inserm 1092.

Le maintien de ces intégrons au sein des ADN totaux des biofilms a été évalué en estimant l'abondance relative des intégrons cliniques de classe I (rapport du nombre de copies *intI1* / ADNr16S, Fig. 2) dans tous les ADN extraits de biofilms. Les intégrons cliniques *intI1* ont été détectés par PCR dans tous les biofilms. Toutefois, même si lors de cette étude nous avons montré que d'autres genres d'entérobactéries sont porteurs d'intégrons cliniques (résultats non montrés), il n'est pas observé d'enrichissement du résistome en intégron clinique *intI1* en fonction de l'âge du biofilm, et donc de son temps d'exposition à la contamination microbiologique de la rivière (Fig. 2). Sur le site amont (GO), on observe une augmentation entre le deuxième et le quatrième mois, puis une diminution de ces deux marqueurs à partir du neuvième mois, soit 5 mois après la réparation du réseau collecteur.

3.2. Les marqueurs bactériens de la dissémination de l'antibiorésistance dans les sédiments

Les sédiments de surface ont été prélevés le long du transect amont-aval de l'Orge en même temps que les biofilms. Les résultats obtenus montrent que, quels que soient le site et les conditions hydrologiques, des *E. coli* ont été isolées dans les sédiments de l'Orge. Les abondances varient de 2.10¹ à 3.5.10³ UFC par gramme de sédiment humide, avec des valeurs maximales observées en septembre 2018, octobre 2018 et avril 2019. Les sédiments du site aval sont statistiquement les plus contaminés (Kruskal-Wallis test, p=0.0019, Fig. 3). Sur le site amont, une baisse significative de l'abondance en *E. coli* a été observée après la réparation de la canalisation des eaux usées en novembre 2018 et mars 2019 (Kruskal-Wallis test, p=2.2.10⁻⁸).

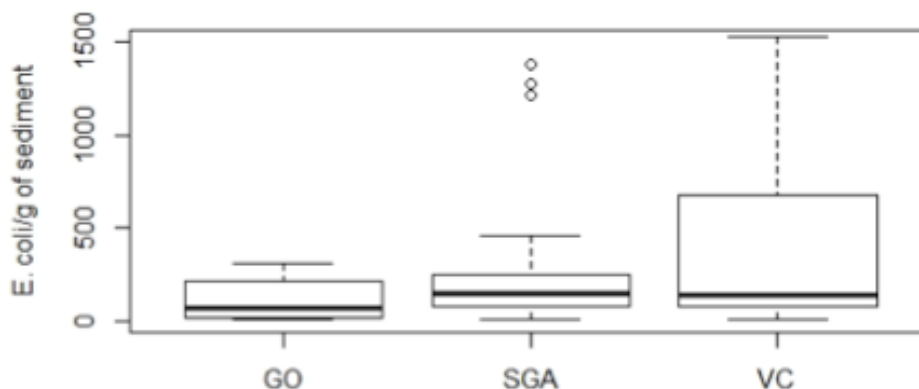


Figure 3. Variation spatiale de la contamination du sédiment de surface par des *E. coli* cultivables le long d'un transect amont-aval d'une rivière urbanisée : GO (Gué d'Orge site amont), SGA (Saint-Germain-lès-Arpajon) site impacté par des rejets de STEUs dont la plus proche traite ses effluents par ultrafiltration, et VC (Viry-Châtillon), site aval le plus urbanisé pour l'ensemble des campagnes.

La caractérisation phénotypique de la résistance à 16 antibiotiques et la recherche d'intégrons cliniques ont été réalisées sur une collection de 394 *E. coli* isolées du sédiment (3 premières campagnes). Des isolats d'*E. coli* porteurs d'intégrons cliniques sont présents dans les sédiments de surface, avec des valeurs maximales retrouvées sur le site amont lors de la rupture de la canalisation. Pour autant, l'abondance d'*E. coli* porteurs d'intégron clinique (*intI1*) n'est pas significativement plus importante dans les sédiments de surface du site aval le plus contaminé (VC), pour la période étudiée. Comme pour les biofilms, sur l'ensemble de la collection, aucune souche d'*E. coli* BLSE n'a été isolée. Seuls 3 isolats d'*E. coli* sont résistants à des antibiotiques appartenant à plus de 3 familles différentes (site aval le plus urbanisé (VC) le 17 septembre 2018).

En parallèle de cette approche culturomique, la quantification moléculaire des intégrons cliniques de classe 1 dans les ADN totaux extraits du sédiment montre que ces éléments génétiques sont toujours présents, avec une abondance plus importante en période de haut débit sur le site le plus urbanisé VC (Figure 4).

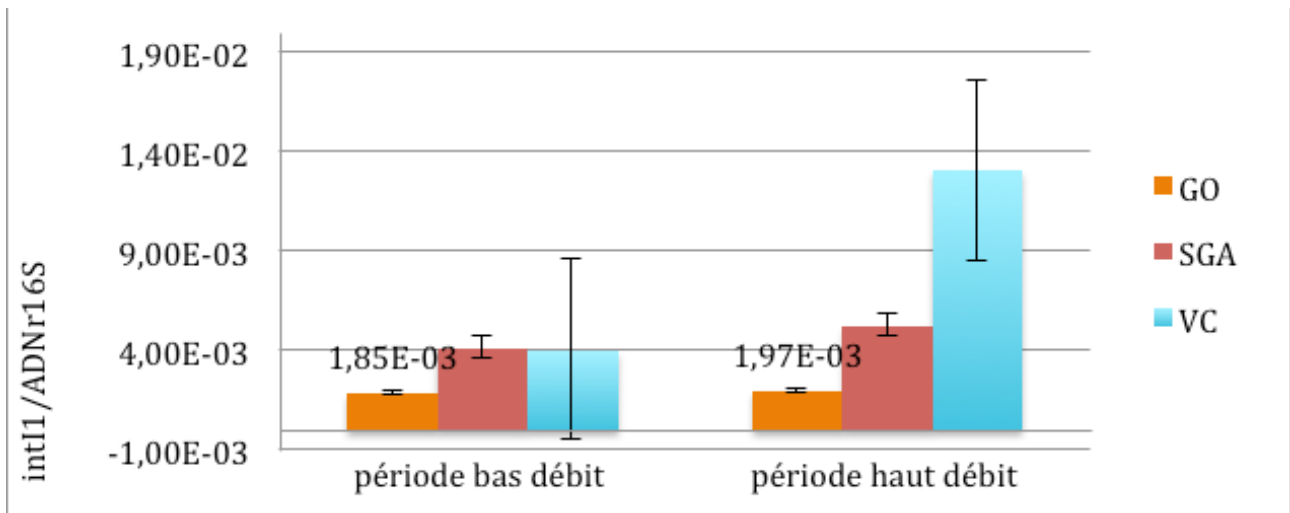


Figure 4. Quantification moléculaire des intégrons cliniques de classe 1 dans les ADN extraits de sédiments superficiels le long d'un transect amont-aval d'une rivière urbanisée (Orge), en période de haut et bas débits : GO site amont, exposé à une rupture de canalisation les 3 premiers mois ; le site SGA exposé aux rejets de STEUs (les rejets de la STEU la plus proche sont ultrafiltrés), et VC le site le plus urbanisé. Les résultats sont exprimés en fonction du nombre de copies d'ADNr16S estimée par qPCR. Les résultats sont issus d'un triplicat méthodologique (3 prélèvements /site /campagne) et triplicat technique (3 analyses par PCR). La quantification des ADNr16S et de l'intégron clinique de classe 1 a fait l'objet d'une démarche d'inter calibration entre les UMR M2C et UMR Inserm 1092.

3.3. Les marqueurs chimiques (co-sélecteurs) de la dissémination de l'antibiorésistance dans les biofilms et sédiments

La recherche des marqueurs chimiques dans les biofilms et les sédiments (Figure 5) montre que la contamination en antibiotiques est différente entre les deux matrices. Les teneurs dans les biofilms sont plus élevées que dans les sédiments et le profil moléculaire sur le site le plus aval (VC) est différent entre les biofilms et les sédiments. Il est à noter que les fluoroquinolones, comme l'ofloxacine et la ciprofloxacine, ainsi que la tétracycline, sont les molécules principalement détectées dans ces deux matrices et l'érythromycine pour les biofilms. Ces molécules sont les plus persistantes et peuvent se maintenir au cours du temps dans les sédiments (Tamtam et al, 2011, Thiebault et al, 2021). La différence de teneurs entre les biofilms et les sédiments suggère une adsorption privilégiée sur la matrice biologique, comme cela a pu être observé en Argentine par Valdès et al (2021). Ces molécules sont d'ailleurs peu ou pas quantifiées dans l'eau, les composés majoritaires dans l'eau étant l'amoxicilline et, dans une moindre mesure, le sulfaméthoxazole. Le pic de concentrations en ATB au niveau du site SGA confirme les travaux de Dinh et al. (2017a, 2017b) qui montraient que les rejets de STEUs sont la source principale de la contamination en ATB de l'Orge. Sur ce site, on observe une diminution des teneurs entre les périodes de basses eaux et de hautes eaux. Ceci peut s'expliquer par une réduction des usages d'ATB avec le printemps et par une plus grande dégradation des composés avec l'ensoleillement.

En revanche, la contamination en biocides, contaminants chimiques susceptibles de favoriser la sélection de bactéries ATBr *in situ*, présente un gradient différent de celui des ATB, suggérant des sources de contamination distinctes. Les teneurs en biocides augmentent le long du gradient d'urbanisation amont-aval avec un maximum au site de VC. Les parabènes, avec le méthylparabène, sont les composés dominants, suivis par le triclosan, ce qui est comparable avec l'étude de Huerta et al., 2016. De plus, l'augmentation des teneurs en méthylparabène à VC au printemps (figure 6) pourrait être liée aux raccordements dysfonctionnels présents entre SGA et VC ou aux apports par l'Yvette.

Dans le cadre de ces travaux, il a été recherché les produits phytosanitaires, récemment décrits comme molécules susceptibles de favoriser la sélection des bactéries ATBr (Søgaard Jørgensen et al., 2020). Comme pour les ATB, des profils de contaminants différents entre les biofilms et les sédiments sont observés. Par exemple, le tébuconazole, qui peut être utilisé aussi bien en tant que produit phytosanitaire que biocide, présente un comportement particulier. La teneur en tébuconazole dans les sédiments diminue sur le site GO après la réparation de la canalisation d'eaux usées. Le triclosan ayant la même dynamique sur ce site, cela suggère que la source de ces composés à cette période était probablement liée aux eaux usées et à leur usage en tant que biocide (figure 6).

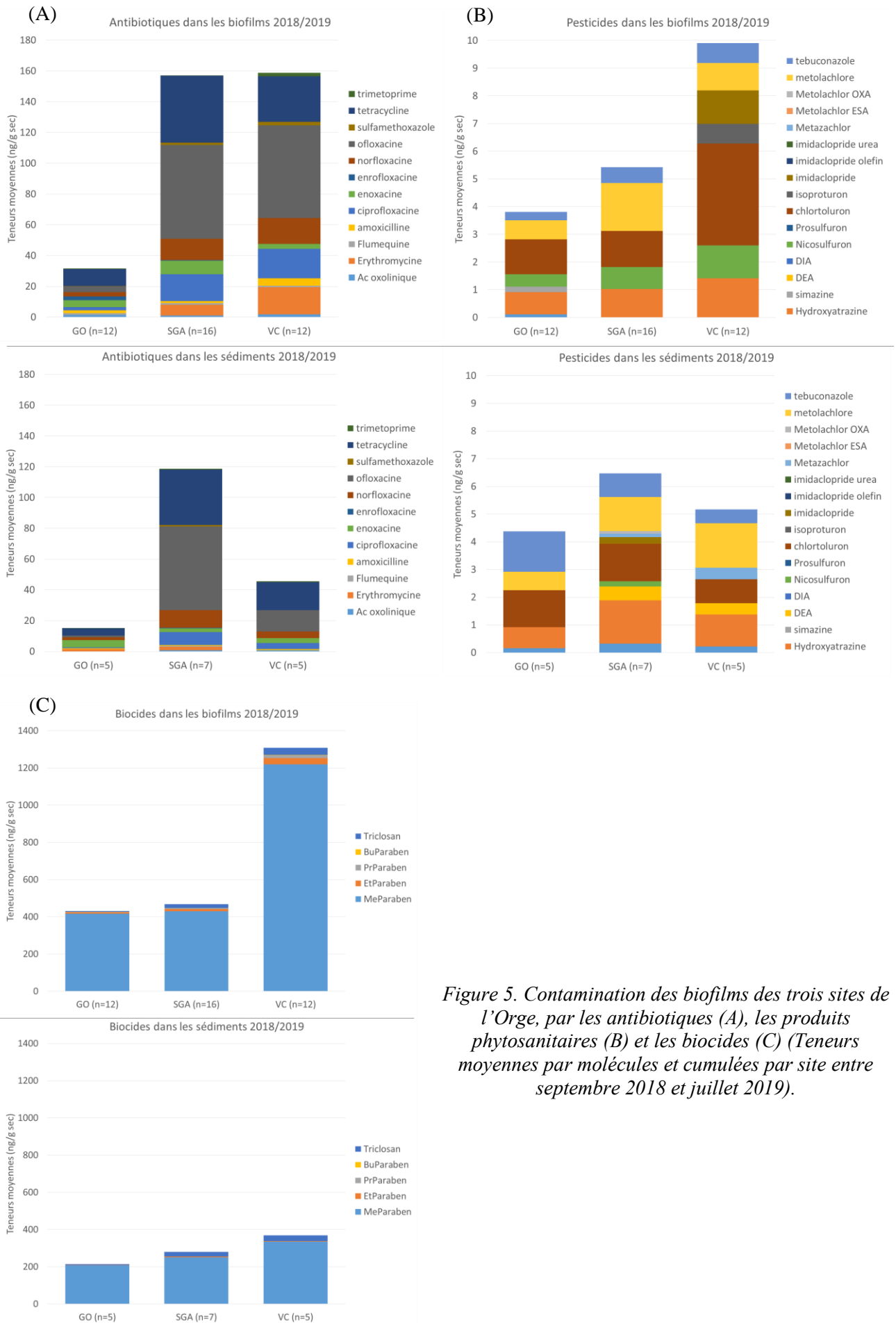


Figure 5. Contamination des biofilms des trois sites de l'Orge, par les antibiotiques (A), les produits phytosanitaires (B) et les biocides (C) (Teneurs moyennes par molécules et cumulées par site entre septembre 2018 et juillet 2019).

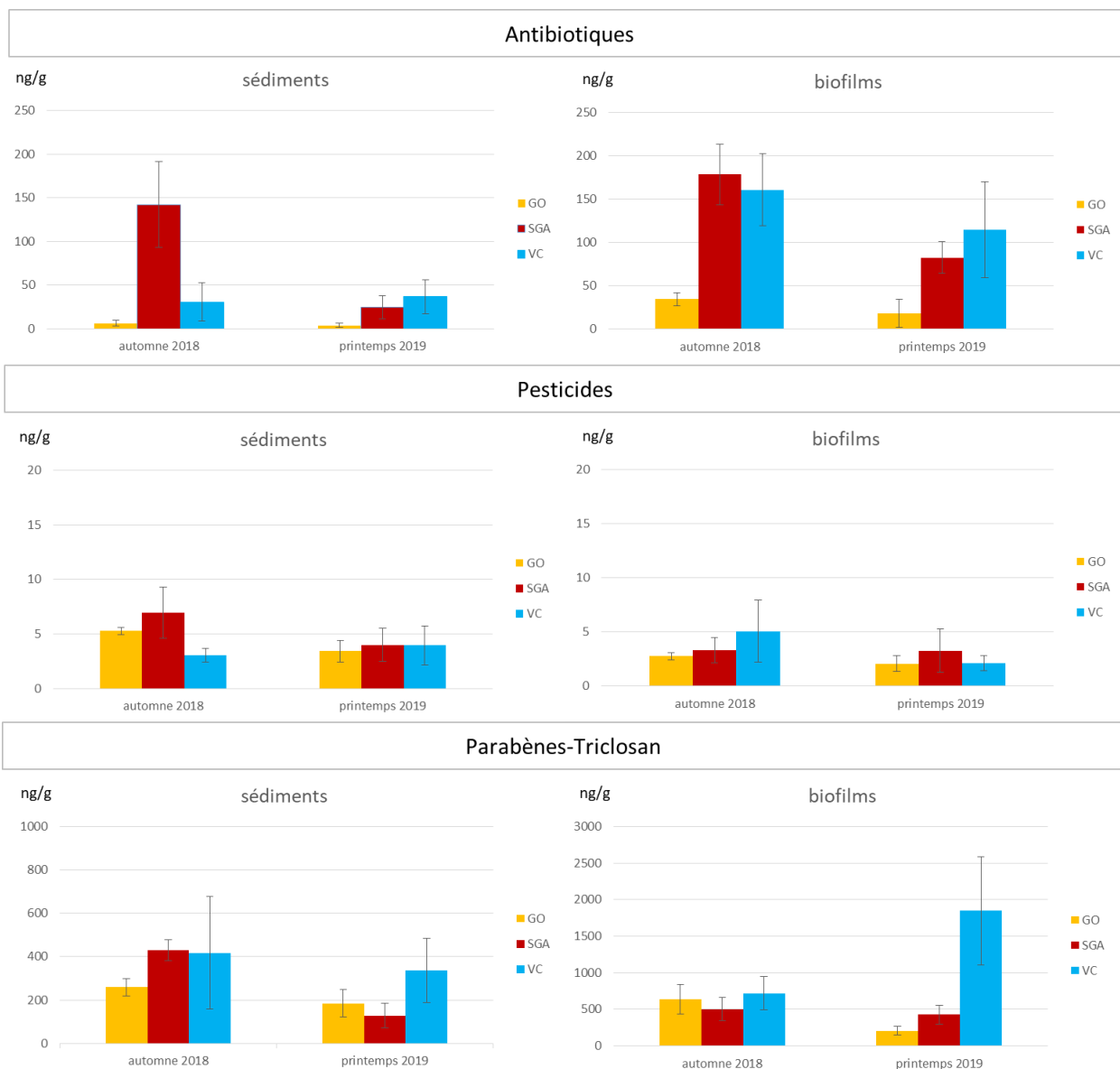


Figure 6. Evolution des teneurs moyennes cumulées par types de composés en condition de basses (automne) et hautes eaux (printemps)

Tableau 1. Facteur de bioaccumulation dans les biofilms (BAF) et pseudo coefficient de partage dans les sédiments (P-PC) pour les composés présents dans les matrices eau, sédiments et biofilm (calcul selon Valdes et al. 2021). Valeurs moyenne par site en L/kg (" - " indique qu'au moins une des concentrations (eau, sédiments ou biofilm) est inférieure à la limite de quantification).

Composés	GO				SGA				VC			
	BAF	sd	P-PC	sd	BAF	sd	P-PC	sd	BAF	sd	P-PC	sd
Amoxicilline	-	-	-	-	4,1	0,6	2,0	-	8,1	2,0	2,1	0,7
Sulfaméthoxazole	-	-	-	-	44	2,4	20	3,6	49	11	-	-
Tétracycline	417	-	240	-	272	-	180	-	813	-	595	-
Triméthoprime	-	-	-	-	169	-	110	24	211	45	106	39
Atrazine	-	-	9,6	0,7	-	-	14	2,2	-	-	15	4,5
Hydroxyatrazine	14	4,7	17	4,8	17	7,0	28	9,6	21	6,7	26	6,2
DEA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-
Chlortoluron	36	14	54	28	50	18	30	4,8	37	-	42	27
Imidaclopride	-	-	-	-	-	-	-	-	119	-	-	-
Métolachlore	80	-	201	-	52	-	48	-	4,5	-	30,1	-
Tébuconazole	80	-	465	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthyl Parabène	379 029	215 404	103 764	23 740	248 508	79 179	84 779	53 875	470 108	107 306	113 188	64 841
Ethyl Parabène	4 638	-	953	-	-	-	-	-	18 196	-	-	-
Propyl Parabène	121	-	223	-	-	-	-	-	1 295	687	263	-

Le tableau 1 présente les valeurs moyennes du facteur de bioaccumulation pour les biofilms (BAF) et du pseudo coefficient de partage entre les sédiments (P-PC) et l'eau (Valdes et al. 2021) :

$$\text{BAF} = [\text{Substance}]_{\text{biofilm}} / [\text{Substance}]_{\text{eau}}$$

$$\text{P-PC} = [\text{Substance}]_{\text{sédiment}} / [\text{Substance}]_{\text{eau}}$$

Pour les ATB et les biocides, les BAF sont supérieurs aux P-PC, alors qu'on observe l'inverse pour les pesticides. Les ATB auraient donc une tendance à être préférentiellement présents dans le biofilm plutôt que dans les sédiments, alors que ce serait l'inverse pour les pesticides. Les parabènes ont les valeurs de BAF et P-PC les plus élevées, indiquant leur adsorption préférentielle dans les biofilms et les sédiments.

Concernant les profils phénotypiques de résistance des *E. coli* isolées de ces matrices, aucune relation entre les résistances aux antibiotiques et les antibiotiques détectés dans les biofilms ou les sédiments n'a été observée. Dans les biofilms, alors que les fluoroquinolones, la tétracycline et l'érythromycine sont majoritairement détectées, 1 seul isolat est résistant à la norfloxacine et la ciproflaxine (sur les 406 isolats testés). Dans les sédiments, seuls 4 isolats sur les 394 isolats d'*E. coli* sont résistants à la norfloxacine ou la ciproflaxine, alors que les fluoroquinolones appartiennent à la famille d'antibiotiques prédominante dans les sédiments. De même, la contamination en ATB est plus élevée sur le site de SGA, mais l'abondance relative en intégron clinique de classe 1 est plus importante dans l'ADN total extrait des sédiments de VC.

4. Rôle de l'ichtyofaune de l'Orge dans la dissémination de l'antibiorésistance

4.1. Rappel des objectifs

Dans le contexte des résultats présentés ci-dessus, et selon une approche « *One health* » (une seule santé préconisée par l'OMS), cette étude concerne le volet biote de l'Orge, en nous focalisant sur l'ichtyofaune. L'objectif de cette action est d'évaluer si l'exposition chronique à des contaminants chimiques favorise l'émergence de bactéries ATBr au sein du microbiote intestinal et cutané de l'ichtyofaune d'une rivière urbanisée. Au sein de ces microbiotes, les communautés microbiennes, structurées en biofilm, se développent en symbiose mutualiste avec l'organisme. Une première expérimentation *in situ* de 20 jours a été menée en mars 2021 sur des goujons sauvages (*Gobio gobio*) pêchés en amont de la STEU d'Ollainville et engagés dans la rivière à l'amont et à l'aval des rejets de la STEU, afin d'étudier l'impact d'une exposition à l'aval des effluents traités et filtrés (sans bactéries fécales) de la STEU d'Ollainville au niveau du site SGA. Les goujons ont été prélevés à 7, 14 et 20 jours après engagement afin d'effectuer un suivi des marqueurs bactériens (7, 20 jours) et chimiques de l'antibiorésistance dans les microbiotes cutané et intestinal. En parallèle, une recherche des marqueurs de stress oxydant au niveau du tissu hépatique et des marqueurs chimiques dans les muscles a été menée.

Les méthodologies mises en œuvre sont identiques à celles menées sur les sédiments et les biofilms de l'Orge. Les premiers résultats obtenus par approche culturomique montrent que la proportion d'entérobactéries dans le microbiote cutané des goujons engagés en aval pendant 20 jours est significativement plus faible par rapport à ceux engagés en amont (test F, p-value= 0,02), et s'expliquerait par une diminution préférentielle des entérobactéries du genre *Serratia*, alors qu'il n'a pas été isolé d'*E. coli*. En termes d'antibiorésistance, les résultats montrent un portage d'entérobactéries et de *Pseudomonas* résistantes aux antibiotiques par les goujons. Ces données, d'intérêt sanitaire, sont en cours d'exploitation et font l'objet d'une collaboration avec des microbiologistes cliniciens (N. Grall, INSERM IAME ; et V. Cattoir, INSERM Rennes). Les extractions d'ADN de ces microbiotes sont en cours et seront envoyés à la société Mr DNA (Shallowater, TX 79363, USA) pour caractériser les communautés bactériennes par une approche de métagénomique ciblant la région variable V3-V4 des gènes codant les ARNr 16S (Colin et al, 2021).

Conclusion

Le suivi des marqueurs chimiques et bactériens de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement, préconisé par l'ANSES (2021), a été réalisé dans les sédiments, les biofilms et l'ichtyofaune d'une rivière urbanisée : l'Orge. Les résultats montrent que les biofilms et les sédiments sont des zones de piégeage d'entérobactéries ATBr et d'intégrons cliniques. Toutefois ces bactéries ATBr, leurs génomes, y compris les intégrons cliniques, ne s'y accumulent pas. Les contaminants chimiques, susceptibles de favoriser le maintien, voire l'émergence, de bactéries antibiorésistantes sont détectés dans les biofilms et les sédiments (ATB, biocides, produits phytosanitaires), avec des niveaux de contamination qui diffèrent selon les matrices. Toutefois, il n'y a pas de relation entre les profils de résistance aux antibiotiques des *E. coli* isolés des biofilms et des sédiments et la contamination en antibiotiques de ces matrices. Le déterminisme de cette contamination est complexe et, à ce stade de l'exploitation des résultats, aucune relation simple avec la pluviométrie ou le débit de la rivière n'a pu être établie. Les premiers résultats obtenus sur des goujons engagés et exposés dans la rivière contaminée par des rejets filtrés d'une STEU (Ollainville) montrent que cette exposition affecte la proportion d'entérobactéries du microbiote cutané, et que ces poissons sont porteurs d'entérobactéries et de *Pseudomonas*, pathogènes opportunistes, résistantes aux ATB.

Bibliographie

ANSES « Antibiorésistance et environnement - État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques, <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf>

- Bass, L., Liebert, C.A., Lee, M.D., Summers, A.O., White, D.G., Thayer, S.G., Maurer, J.J., (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2925–2929.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology* 13, 310–317.
- Blanchoud, H., Alliot, F., Chen, N., Valdes, D., 2020. Rapid SPE – LC MS/MS analysis for atrazine, its by-products, simazine and S metolachlor in groundwater samples. *MethodsX* 7, 100824. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100824>
- Colin, Y., Berthe, T., Molbert, N., Guigon, E., Vivant, A.-L., Alliot, F., Collin, S., Goutte, A., and Petit, F. (2021). Urbanization Constrains Skin Bacterial Phylogenetic Diversity in Wild Fish Populations and Correlates with the Proliferation of Aeromonads. *Microb Ecol*.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., and Zhu, Y.-G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9, 1269–1279.
- Dinh, Q.T., Moreau-Guigon, E., Labadie, P., Alliot, F., Teil, M.-J., Blanchard, M., and Chevreuil, M. (2017a). Occurrence of antibiotics in rural catchments. *Chemosphere* 168, 483–490.
- Dinh, Q., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuil, M., and Labadie, P. (2011). Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta* 85, 1238–1245.
- Dinh, Q., Moreau-Guigon, E., Labadie, P., Alliot, F., Teil, M.-J., Blanchard, M., Eurin, J., Chevreuil, M., 2017b. Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. *Science of The Total Environment* 575, 758–766.
- Huerta, B., Rodriguez-Mozaz, S., Nannou, C., Nakis, L., Ruhí, A., Acuña, V., Sabater, S., Barcelo, D., 2016. Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Science of The Total Environment*, 5th Special Issue SCARCE: River Conservation under Multiple stressors: Integration of ecological status, pollution and hydrological variability 540, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.049>
- O'Neill, J., (2014). Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. The review on antimicrobial resistance. https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf (last accessed, March 2021).
- Søgaard Jørgensen, P., Folke, C., Henriksson, P.J.G., Malmros, K., Troell, M., and Zorzet, A. (2020). Coevolutionary Governance of Antibiotic and Pesticide Resistance. *Trends in Ecology & Evolution* 35, 484–494.
- Tamtam, F., van Oort, F., Le Bot, B., Dinh, T., Mompelat, S., Chevreuil, M., Lamy, I., and Thiry, M. (2011). Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. *Science of The Total Environment* 409, 540–547.

Tamtam, F., Le Bot, B., Dinh, T., Mompelat, S., Eurin, J., Chevreuil, M., Bonté, P., Mouchel, J.-M., and Ayrault, S. (2011). A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments. *Journal of Soils and Sediments* 11, 852–859.

Thiebault, T., Alliot, F., Berthe, T., Blanchoud, H., Petit, F., and Guigon, E. (2021). Record of trace organic contaminants in a river sediment core: from historical wastewater management to historical use. *Science of The Total Environment* 145694.

Valdés, M.E., Santos, L.H.M.L.M., Rodríguez Castro, M.C., Giorgi, A., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Amé, M.V., 2021. Distribution of antibiotics in water, sediments and biofilm in an urban river (Córdoba, Argentina, LA). *Environmental Pollution* 269, 116133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116133>

Wales, A., and Davies, R. (2015). Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics* 4, 567–604.

Walker, D.I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C.A., Morgan, H., Mowlem, M.C., and Lees, D.N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Research* 126, 101–110.

WHO, OIE, FAO, (2020). International instruments on the use of antimicrobials across the human, animal and plant sectors

World Health Organization, (2015). Global action plan on antimicrobial resistance.

Wright, G.D. (2019). Environmental and clinical antibiotic resistomes, same only different. *Current Opinion in Microbiology* 51, 57–63.