

## **Thèse de doctorat**

**Université de Limoges**

**ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)**

**UMR 1092 : Anti-infectieux supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques**

**Université Saint Joseph de Beyrouth**

**École doctorale – Sciences et Santé**

**Laboratoire de microbiologie**

Thèse en co-tutelle pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'Université de Limoges**

Biologie et Santé

**Docteur de l'Université Saint Joseph de Beyrouth**

Sciences pharmaceutiques et biologiques

Présentée et soutenue par

**Wadad HOBEIKA**

Le 16 décembre 2021

## **Dissémination sous pression anthropique et de la saisonnalité de bactéries résistantes dans les fleuves du Liban**

Thèse dirigée par M. le Pr Christophe DAGOT, Mme. la Pr Dolla KARAM SARKIS et  
Mme. la docteure Elena Buelow

**JURY :**

Présidente

Mme. Marie-Cécile Ploy, professeure, Université de Limoges

Rapporteurs

Mme. Fabienne Petit, professeure, Université de Rouen

M. Thomas Guillard, professeur, Université de Reims

Examineurs :

M. Gaby Khalaf, professeur, CNRS-Liban

Mme. Carole Ayoub Moubareck, professeure associée, Université Zayed

M. Christophe Dagot, professeur, Université de Limoges

Mme. Dolla Karam Sarkis, professeure, Université Saint Joseph de Beyrouth



*À mes parents,*

*« J'ai combattu le bon combat, j'ai achevé la course, j'ai gardé la foi ».*

**2 Timothée 4 : 7**

## Remerciements

Tout d'abord je remercie Mesdames, Messieurs, Fabienne Petit, Thomas Guillard, Marie-Cécile Ploy, Gaby Khalaf, Carole Ayoub Moubareck, qui me font l'honneur d'évaluer mon travail.

Je remercie Madame Marie-Cécile Ploy d'avoir présidé le jury. Je remercie Madame Fabienne Petit et Monsieur Thomas Guillard mes rapporteurs, d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse en dépit de leur emploi du temps chargé et Mesdames, Marie-Cécile Ploy, et Carole Ayoub Moubareck ainsi que Monsieur Gaby Khalaf, mes examinateurs, dont la participation a enrichi l'échange scientifique.

Je remercie mes directeurs de thèses : Monsieur Christophe DAGOT, Madame Dolla KARAM SARKIS et Madame Elena BUELOW pour leur encadrement, soutien, expertise scientifique, corrections, et accompagnement pendant ces quatre années de préparation de thèse. Je tiens à remercier Madame Marie-Cécile Ploy qui a également contribué dans ce projet par son expertise scientifique, remarques, conseils et bienveillance. Je remercie Madame Elodie Couvé-Deacon pour l'expertise scientifique, remarques, propositions et gentillesse.

Je remercie les équipes du laboratoire des Agents Pathogènes de l'Université Saint Joseph et de l'UMR Inserm 1092 – RESINFIT : Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques pour leur agréable compagnie durant mes années de thèse. Je remercie le Conseil National de la Recherche Scientifique Libanais (CNRS-L) et le Conseil de la Recherche Scientifique de l'Université Saint Joseph pour m'avoir accordé des bourses de thèse. Je remercie Monsieur Pierre Germon pour sa disponibilité à répondre aux diverses questions techniques. Merci à Monsieur Joseph Absi pour le soutien et les encouragements. Merci à Thomas Jové pour les conseils et remarques. Merci à Charbel Akkawi, Micheline Hajjar et Gerges Rizkallah pour la disponibilité, idées, et nos discussions scientifiques. Merci à Messieurs Dominique Choueiter, Fadi Karam et Amine Shaban pour l'aide précieuse dans l'acquisition de documents. Merci à Margaux Gaschet de m'avoir formée sur nombreuses techniques, les conseils et la présence. Merci à Déborah Andouard pour l'aide technique, disponibilité et amabilité. Merci à Mazen Jabbour et Nada Osta pour l'aide précieuse et expertise technique. Merci à Mesdames Sandra Da Re, Cindy Demay et

Isabelle Baylet pour l'aide dans la gestion et avec Mesdames, Sophie Raheison et Sophie Alain pour leur gentillesse. Merci à Mesdames, Messieurs, Olivier Barraud, Cécile Pasternak et Fabien Garnier pour les commentaires constructifs.

Je suis très reconnaissante envers toutes les personnes que j'ai rencontrées et connues dans les deux laboratoires, avec qui j'ai de très beaux souvenirs, notamment, Rouba Khatib, Lucie Laval, Linda Tlili, May Mallah, Désirée El Hajj, Ana Catalina Hernandez, Clotilde Muller, Régina Geitani, Sylvain Meyer, Christelle Hajjar, Yohan Lacotte, Danielle Chaaya Myriam Mikhael, Maxime Rocher, Stecy Chollet et Camille Bataille. Je pense également à Mélissa, Nicolas, Mathieu, Mathis, Aurélien, Audrey, Damien, Manon, Camille, Jessie, Guillaume et Robin. Je pense également aux personnes qui sont passées par les deux laboratoires, notamment Tarek Itani, Mikhael Kozrecka, Raphaëlle Youf, Léa Moret, Carmen Cristescu, Mathilde Estreguil, Christine Haddad, Manon Gaudion, Rita Beirouty, Chloé Jaquet, Sadika Bernard, Martine Gatet, Claire Lallement, Malaika Padra et Laetitia Gaillard.

Je remercie le R.P. Salim Daccache, Recteur de l'Université Saint Joseph, Madame Lydia Rabaa Khabbaz, ancienne Directrice de l'école doctorale Sciences et Santé de l'Université Saint Joseph, Monsieur Nassim Fares, Directeur de l'école doctorale Sciences et Santé de l'Université Saint Joseph, Madame Marianne Abi Fadel, Doyenne de la faculté de pharmacie de l'Université Saint Joseph, Monsieur Bertrand Courtioux, ancien Directeur de l'école doctorale Sciences Biologie et Santé 615 de l'Université de Limoges et Madame Mireille Verdier Sage, Directrice de l'école doctorale Sciences Biologie et Santé 615 de l'Université de Limoges.

Je remercie mes parents pour leur grand amour, soutien, accompagnement et support sans lesquels rien n'est possible et réalisable.

Enfin, je remercie mon cercle d'amis proches pour leurs support et encouragements.

## Sommaire

Remerciements.....	5
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures .....	12
Liste des abréviations.....	15
Introduction .....	18
I. Étude bibliographique.....	22
1. Les antibiotiques .....	23
2. La résistance aux antibiotiques.....	23
2.1. La résistance aux antibiotiques dans l'environnement : une histoire ancienne .....	25
2.2. La pression anthropique : une sélection actuelle .....	27
2.2.1. Les stations d'épuration des eaux usées et la dissémination dans les eaux .....	30
2.2.2. Les pratiques agricoles et la dissémination dans les sols .....	34
2.3. Choix des indicateurs de l'antibiorésistance dans l'environnement .....	35
2.3.1. La quantification des gènes de résistances aux agents antimicrobiens .....	35
2.3.2. La quantification des éléments génétiques mobiles .....	36
3. Exploration du résistome environnemental .....	46
3.1. Les méthodes standards de culture.....	47
3.1.1. La détection de bactéries résistantes aux antibiotiques par méthode culturale .....	49
3.1.2. Les marqueurs viraux de contamination fécale.....	50
4. L'approche « One Health » .....	52
4.1. L'antibiorésistance au niveau du microbiote humain.....	54
4.2. La résistance au niveau du microbiote animal .....	54
4.3. La résistance au niveau du microbiote environnemental.....	55
5. Les résistances les plus étudiées en milieu environnemental.....	56
5.1. L'inactivation des antibiotiques .....	56
5.1.1. Les $\beta$ -lactamases .....	56
5.1.2. Les enzymes modifiant les aminosides .....	58
5.1.3. Streptogramine, lincosamide, macrolides (SLM) et Chloramphénicol .....	59
5.2. La modification de la cible bactérienne de l'antibiotique .....	60

5.2.1.	La résistance aux aminosides.....	60
5.2.2.	La résistance aux polypeptides .....	60
5.3.	L'interaction avec le métabolisme de protéines et d'acides nucléiques.....	61
5.3.1.	La résistance aux sulfamides.....	61
5.3.2.	La résistance au triméthopime .....	62
5.3.3.	Les quinolones .....	62
5.4.	Les inhibiteurs de synthèse protéique bactérienne : les tétracyclines.....	63
5.5.	Les systèmes d'efflux .....	63
6.	Les techniques de biologie moléculaire pour l'investigation du résistome.....	64
	La PCR quantitative (qPCR) .....	64
	Les méthodes métagénomiques.....	66
	La métagénétique .....	70
	La métatranscriptomique .....	71
	L'« Exon-Primed Intron-Crossing (Epic) » PCR .....	72
	Le séquençage à SMRT « Real-time, single-molecule sequencing ».....	73
	Le séquençage en nanopore .....	73
	La nanotechnologie.....	73
7.	Les fleuves anthropisés.....	74
8.	Les estuaires et la pression anthropique .....	76
9.	L'antibiorésistance dans les eaux de surface au Liban .....	78
II.	Étude descriptive environnementale des eaux de fleuves au Liban.....	82
A.	Matériel et méthodes .....	83
1.	Plan de l'étude .....	84
2.	Échantillonnage.....	86
2.1.	En contexte estuarien .....	86
2.2.	Prélèvements le long des fleuves.....	91
3.	Détection de bactéries résistantes pathogènes par des méthodes de culture .....	92
4.	Identification spécifique des bactéries pathogènes résistantes par des méthodes de cultures standards .....	92
4.1.	Coloration de Gram.....	92
4.2.	Identification des bactéries à Gram négatif.....	93
4.3.	Identification des bactéries à Gram positif.....	93
5.	Susceptibilité et profils de résistance des BRAs.....	94



6.	Filtration de l'eau pour extraction ultérieure de l'ADN.....	95
7.	Extraction de l'ADN pour la qPCR à haut débit.....	95
8.	Gènes ciblés .....	96
9.	Conception des amorces.....	97
10.	qPCR à haut débit.....	97
11.	Quantification des gènes .....	98
12.	qPCR ciblant le crAssphage en simplex.....	99
B.	Résultats.....	100
1.	Étude phénotypique réalisée à partir d'échantillons pris aux points les plus proches et accessibles à (aux) source(s) et le long des fleuves en hiver (janvier 2018).....	101
1.1.	Bactéries résistantes sélectionnées par les méthodes de culture sur milieux sélectifs en contexte estuarien des fleuves libanais .....	102
1.2.	Profils de résistance d'isolats bactériens résistants ciblés .....	120
2.	Étude en contexte estuarien et comparaison des résultats entre deux saisons (Printemps 2017 et Hiver 2018) .....	121
2.1.	Bactéries résistantes sélectionnées par les méthodes de culture sur milieux sélectifs en contexte estuarien des fleuves libanais.....	121
2.2.	Analyse du résistome des Enterobacterales productrices de BLSE détectées en contexte estuarien des fleuves libanais .....	130
2.3.	Détection et quantification du crAssphage à partir de l'ADN extrait des échantillons d'embouchures au printemps et en hiver .....	133
2.4.	Analyse et comparaison du résistome de l'ADN total extrait des échantillons d'embouchures au printemps et en hiver .....	134
C.	Discussion.....	145
	Impact des saisons .....	146
	Pression anthropique.....	147
1-	Urbanisation, agriculture, activités récréatives et pression de l'afflux de réfugiés sur les infrastructures .....	147
2-	Contamination fécale.....	147
	Pertinence du portage de bactéries résistantes aux antibiotiques de la population.....	153
	Corrélation entre les EGMs et les GRAs au niveau des embouchures.....	156
	Comparaison entre indicateurs de la résistance.....	156
-	Les BRAs .....	156
-	La détection et la quantification de GRAs.....	157
-	Les indicateurs viraux de contamination fécale.....	158

Conclusion.....	160
Annexes.....	164
Références .....	183
Résumé en français.....	212
Résumé en anglais .....	212
Article.....	213

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des principales méthodes d'exploration du résistome environnemental .....	74
Tableau 2 : Longueurs, moyenne des volumes annuels, moyenne des débits annuels, débits maximums et débits minimums des fleuves majeurs (Kassem and Gökçekuş 2019).....	88
Tableau 3: Coordonnées et températures au niveau des point de prélèvements en contexte estuarien du Nord au Sud .....	91
Tableau 4 : Dissémination des Enterobacterales résistantes, des bactéries résistantes du genre <i>Pseudomonas</i> et les SARM dans les fleuves majeurs au Liban au mois de janvier de l'année 2018 .....	102
Tableau 5: Résistance (R+I) des isolats de SARM sélectionnés dans les fleuves en hiver .....	120
Tableau 6: Espèces d'Enterobacterales, de <i>Pseudomonas</i> et de SARM résistantes, détectées au printemps (Avril 2017) et en hiver (Janvier 2018) dans les échantillons d'embouchures des fleuves.....	122
Tableau 7: Profils de résistance (I+R) aux antibiotiques d'isolats d'Enterobacterales et de <i>Pseudomonas spp.</i> résistants sélectionnés au printemps et en hiver. ....	125
Tableau 8: Profils de résistance (I+R) aux antibiotiques des SARM au printemps .....	130
Tableau 9 : Résultats de qPCR pour le crAssphage dans les échantillons d'eau des 10 embouchures au printemps et en hiver .....	133
Tableau 10 : Coefficient de corrélation $r$ entre les abondances normalisées cumulées des groupes de GRAs et les abondances normalisées cumulées du groupe des EGMs (a) au printemps et (b) en hiver .....	143

## Liste des figures

Figure 1: Cibles bactériennes des grandes familles d'antibiotiques (Lewis 2013) .....	23
Figure 2: Schéma représentatif des mécanismes de la résistance acquise et intrinsèque (Surette and Wright 2017).....	24
Figure 3: Représentation schématique des principales étapes classiques d'une STEU (Manaia <i>et al.</i> 2018).....	31
Figure 4 : Dessin d'un système de lits à roseaux pour le traitement de boues ( <i>Matamoros et al.</i> 2012) .....	32
Figure 5: Représentation de la structure d'un intégron (Gillings 2014).....	37
Figure 6: Schéma modifié représentant des séquences d'insertion et des éléments transposables (Lallement 2018) .....	43
Figure 7: Représentation des voies de transmission de la résistance aux agents antimicrobiens entre l'homme, l'animal et l'environnement (Walsh 2018) .....	54
Figure 8: Représentation schématique modifiée de Shendure <i>et al.</i> 2017 des méthodes de séquençage à haut débit (Shendure <i>et al.</i> 2017) .....	69
Figure 9: Représentation schématique modifiée (Spencer <i>et al.</i> 2016).....	72
Figure 10 : Schéma stratégique de l'échantillonnage.....	84
Figure 11: Représentation schématique de l'étude au niveau des fleuves.....	86
Figure 12 : Moyennes des précipitations et des températures par mois entre les années 1950 et 2015 (Shaban 2020).....	89
Figure 13 : Coupe frontale montrant les variations des moyennes de précipitations à différents niveaux par rapport au niveau de la mer entre les années 1950 et 2015 (Shaban 2020).....	89
Figure 14: Carte du Liban adaptée de Hourri & El Jeblawi, 2007, représentant les sites de prélèvements au niveau des embouchures et la localisation du Liban dans la zone géographique méditerranéenne (Europe Atlas. (2021, February 3) <a href="https://www.euratlas.net/geography/europe/">https://www.euratlas.net/geography/europe/</a> ).....	90
Figure 15 : Schéma représentatif des zones sous haute pression anthropique révélées par la détection de BRAs .....	119
Figure 16 : Résistance des isolats testés d'Enterobacterales (a) et de <i>Pseudomonas spp.</i> (b) aux antibiotiques au printemps et en hiver .....	129
Figure 17: Les résistomes des E-BLSE détectées au printemps et en hiver à partir de 1 mL d'eau étalé sur MacConkey mélangé à de la céftriaxone, ertapénème, et céfépime. ...	131
Figure 18 : Carte représentant les abondances normalisées de chaque gène ciblé par rapport au gène de l'ARN 16 S 1. au printemps et 2. en hiver au niveau de chaque embouchure. ....	136
Figure 19 : Distribution des abondances normalisées cumulées des GRAs des échantillons d'embouchures.....	140

Figure 20 : Représentation graphique montrant les augmentations significatives des moyennes d'abondances normalisées de groupes de GRAs et EGMs du printemps à l'hiver ( $p < 0.05$ ).....	148
Figure 21 : a - Cartes géostratégiques du Liban.....	149
Figure 22 : Géolocalisation des échantillons d'eau où des bactéries résistantes ont été détectées, identifiées et caractérisées phénotypiquement le long des fleuves libanais (Shaban and Hamzé 2017).....	150
Figure 23 : Figures représentant la section moyenne du fleuve Litani. ....	151
Figure 24 : Les zones d'urbanisation, industrielles et de réfugiés.....	152

## Liste des annexes

Annexe 1: Les différentes familles d'ISs, modes de transposition, caractéristiques et GRAs associés.....	164
Annexe 2: Les normes selon les standards US EPA et SEQ-EAUX-2003 .....	168
Annexe 3: Coordonnées au niveau des points de prélèvements à la / aux sources, le long des fleuves et jusqu'aux embouchures des fleuves débouchant au niveau de la mer ou jusqu'aux derniers points avant les frontières pour les fleuves internes .....	168
Annexe 4: Les séquences des couples d'amorces pour les gènes ciblés.....	175
Annexe 5: Profils de résistance (I+R) aux antibiotiques des isolats d'Enterobacterales et de <i>Pseudomonas spp.</i> résistantes sélectionnés en hiver le long des fleuves .....	177
Annexe 6: Courbe standard « Standard Curve » de la qPCR du crAssphage.....	182

## Liste des abréviations

A : adénosine

ADN : acide désoxyribonucléique

AQ : ammonium quaternaire

ANSES : Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

Asp : asparagine

BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu

E-BLSE : enterobactérie sécrétrice de BLSE

EC-BLSE : *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE

BRA : bactérie résistante aux agents antimicrobiens

C ou c : concentration

C : cytosine

CMI : concentration minimale inhibitrice

CP : Pont de couplage

dNTP : déoxynucléoside triphosphate

ECOFF : « epidemiological cut-off value »

EGM : élément génétique mobile

ESKAPE : Pathogènes critiques de la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et espèces d'*Enterobacter*)

EUCAST : « European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing »

EPIC : « Exon-Primed Intron – Crossing »

Ex : exemple

G : guanine

Glu : acide glutamique

GR : gène de résistance

GRA : gène de résistance aux agents antimicrobiens

HT-qPCR : qPCR à haut débit

ICE : élément intégratif conjugatif

IFC : circuits fluidiques intégrés

IM : intégron de multirésistance

IM1 à IM5 : intégrons de multirésistance de classe 1 à 5

IS : séquence d'insertion

MM : masse molaire

Mpf : appareil d'appariement

Nbre pb : nombre de paires de bases

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : cadre de lecture ouverts

pAmpC-E : *Escherichia coli* productrice de céphalosporinase ampC plasmidique

PCR : « polymerase chain reaction »

SARM ou MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SLM : Streptogramine, lincosamide, macrolides

SMRT : « Real-time, single-molecule sequencing »

STEU : station d'épuration des eaux usées

T : thymine

TE : élément transposable

TTV : Torque Teno virus

UFC : unité formant colonie

UTR : région non traduite



UV : ultra violet

V ou v : volume

VRE : *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine

## Introduction

La résistance aux antibiotiques constitue un risque majeur de santé publique selon l'Organisation Mondiale de la Santé (Willyard 2017 ; Pehrsson *et al.* 2016 ; (Laxminarayan *et al.* 2016), aggravée par le manque d'eau et de gestion de la pollution à l'échelle mondiale (Collignon *et al.* 2018).

Le microbiome environnemental pourrait servir de réservoir de gènes de résistance aux agents antimicrobiens (GRAs) attesté par le nombre considérable d'études qui soulignent la transmission probable de déterminants de la résistance de l'environnement aux pathogènes humains (Thornton *et al.* 2020 ; Jiang *et al.* 2017 ; Amos *et al.* 2018 ; Larsson *et al.* 2018 ; Zhu *et al.* 2017 ; Calero-Cáceres *et al.* 2017).

L'exacerbation de cette résistance serait essentiellement due à la pression de sélection exercée par la pollution antibiotique des matrices environnementales (Dickinson *et al.* 2019 ; Ben *et al.* 2018 ; Nijssingh, Munthe, and Larsson 2019) favorisant l'augmentation, l'évolution et la persistance de la résistance antimicrobienne dans l'environnement, dénommée « résistome environnemental » (Lundborg and Tamhankar 2017 ; Buelow *et al.* 2020 ; Thornton *et al.* 2020 ; Laffite *et al.* 2020). En effet, l'usage à large échelle et de façon inappropriée d'antibiotiques en médecine humaine, comme facteur de croissance ou en prophylaxie d'infections bactériennes chez les animaux d'élevage, ou encore en aquaculture, accumule des résidus d'antibiotiques éventuellement transmis aux environnements naturels connectés (OMS 2018 ; Vaz-Moreira *et al.* 2019 ; Lundborg and Tamhankar 2017). D'autres contaminants, en particulier les biocides et métaux traces, induisent également la diffusion de la résistance aux antibiotiques par co-sélection au niveau d'éléments génétiques mobiles (EGMs) (Bethke *et al.* 2020 ; Östman *et al.* 2017).

Les activités anthropiques ont été démontrées comme étant un facteur clé de la résistance microbienne aux agents antimicrobiens dans l'environnement (Hernando-Amado *et al.* 2019 ; Zhang *et al.* 2019 ; Goulas *et al.* 2020). Le rejet d'effluents partiellement traités des stations d'épuration des eaux usées (STEU) dans les fleuves avec la décharge continue de GRAs, bactéries résistantes aux antibiotiques (BRAs) et EGMs associée à des micropolluants, dont des résidus d'antibiotiques (Pärnänen *et al.* 2019 ; Buelow *et al.* 2020 ;

Dunachie, Day, and Dolecek 2020 ; Auberttheau *et al.* 2017 ; Pazda *et al.* 2019) sont référencés comme des « hot-spots » (points chauds). Les activités d'agriculture telles que l'amendement des sols avec du fumier ou de la boue d'épuration en provenance de STEUs, ou l'irrigation avec les effluents de STEUs, augmentent de façon similaire le résistome environnemental (Lau *et al.* 2020 ; Xiang *et al.* 2018 ; Vaz-Moreira *et al.* 2019 ; Lundborg and Tamhankar 2017). Le déchargement continu de BRAs, GRAs et polluants anthropiques dans l'environnement altère les écosystèmes naturels (Chatterjee *et al.* 2018 ; Dickinson *et al.* 2019 ; Xiang *et al.* 2018), induirait la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Chatterjee *et al.* 2018 ; Larsson *et al.* 2018 ; Tan *et al.* 2018). Ces éléments représentent un risque de transmission aux microbiomes humains (Mortimer, Winchell, and Holden 2020 ; Ben *et al.* 2018 ; Huijbers *et al.* 2015). La dissémination de la résistance dans l'environnement serait ainsi liée à l'interaction entre l'homme, les animaux et le microbiote environnemental à l'échelle mondiale (Pehrsson *et al.* 2016 ; Hernando-Amado *et al.* 2019 ; Larsson *et al.* 2018 ; Östman *et al.* 2017 ; Essack 2018). La mobilité des GRAs, leurs fonctions démontrées et les routes de transmission aux hommes et aux animaux dans l'environnement sont pris en compte dans une approche « One Health » d'évaluation du risque de la transmission de la résistance aux agents antimicrobiens (Bengtsson-Palme and Larsson 2015 ; Hernando-Amado *et al.* 2019).

Le littoral méditerranéen est densément peuplé et témoin d'une activité intense de pêche, d'activités portuaires, industrielle et récréative (Kazour *et al.* 2019). Le bassin méditerranéen semi-clos constitue le réceptacle ultime des effluents de STEUs et des déchets de la région, suggérant un impact anthropique important (Kazour *et al.* 2019 ; Pereda *et al.* 2020 ; Desbiolles *et al.* 2018). Le Liban, localisé à l'Est de la Méditerranée, possède une bande côtière de 220 km de long (Kazour *et al.* 2019) et est considéré comme un havre hydrologique en dépit de sa petite superficie à travers laquelle diffusent, sur des dizaines de kilomètres, quinze fleuves majeurs traversant, de l'extension du Mont Liban et se dirigeant vers l'Ouest jusqu'à la mer Méditerranée (Shaban 2020). Ainsi, le réseau de ces fleuves à moins de 10 km les uns des autres (Shaban and Hamzé 2017) partage les mêmes caractéristiques de bassins (Shaban 2020).

Le premier objectif de ce projet consistait à rechercher des bactéries de haut risque par des méthodes de culture au niveau de prélèvements d'eau de fleuves, effectués sur tout

le territoire libanais, pour évaluer le niveau de contamination par ces bactéries et le risque de transmission à l'homme en cas d'exposition aux eaux de ces fleuves. Le choix des pathogènes recherchés dans le cadre de ce projet a été fait en fonction de la classification des pathogènes prioritaires de l'Organisation Mondiale de la Santé, importants du fait de leur capacité à transmettre leur mécanismes de résistance (OMS 2017). Ainsi, les Enterobacterales productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu ou productrices de carbapénémase résistantes à la majorité des  $\beta$  lactamines et carbapénèmes présentant une menace de santé publique ont été recherchées. Les SARM étant des pathogènes hautement résistants et critiques et faisant partie des pathogènes « ESKAPE » (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et espèces d'*Enterobacter*)(Rice 2008) ; Paiva and Eggimann 2017 ; Thapaliya *et al.* 2017 ; Paiva and Eggimann 2017) et les *Pseudomonas spp.* résistants ont aussi fait l'objet d'une recherche dans tous les échantillons. Des GRAs de ces bactéries sont localisés sur des plasmides conjugatifs pouvant être échangés entre bactéries de différentes espèces (Leonard *et al.* 2018 ; Wyres and Holt 2018 ; Leonard *et al.* 2018 ; Becker *et al.* 2018). Ensuite, l'évaluation de la contamination des embouchures de fleuves libanais par les BRAs et les GRAs a été effectuée par les méthodes de culture standard et par qPCR à haut débit, outil pertinent de caractérisation pour une surveillance environnementale (Pärnänen *et al.* 2019). Des mesures d'abondances relatives ont été effectuées au niveau des embouchures pour quatre-vingt gènes de résistance aux antibiotiques et métaux traces identifiés dans la littérature sur des EGMs (Buelow *et al.* 2020 ; Zhu *et al.* 2017 ; Zhang *et al.* 2019) et douze intégrons et éléments transposables (Buelow *et al.* 2020). Enfin, des indicateurs viraux de contamination fécale humaine, crAssphage et Torque Teno Virus ont été recherchés afin d'établir une corrélation entre la contamination fécale d'origine humaine et l'abondance en GRAs (ANSES 2020 ; Thornton *et al.* 2020 ; Huijbers, Flach, and Larsson 2019 ; An *et al.* 2020).

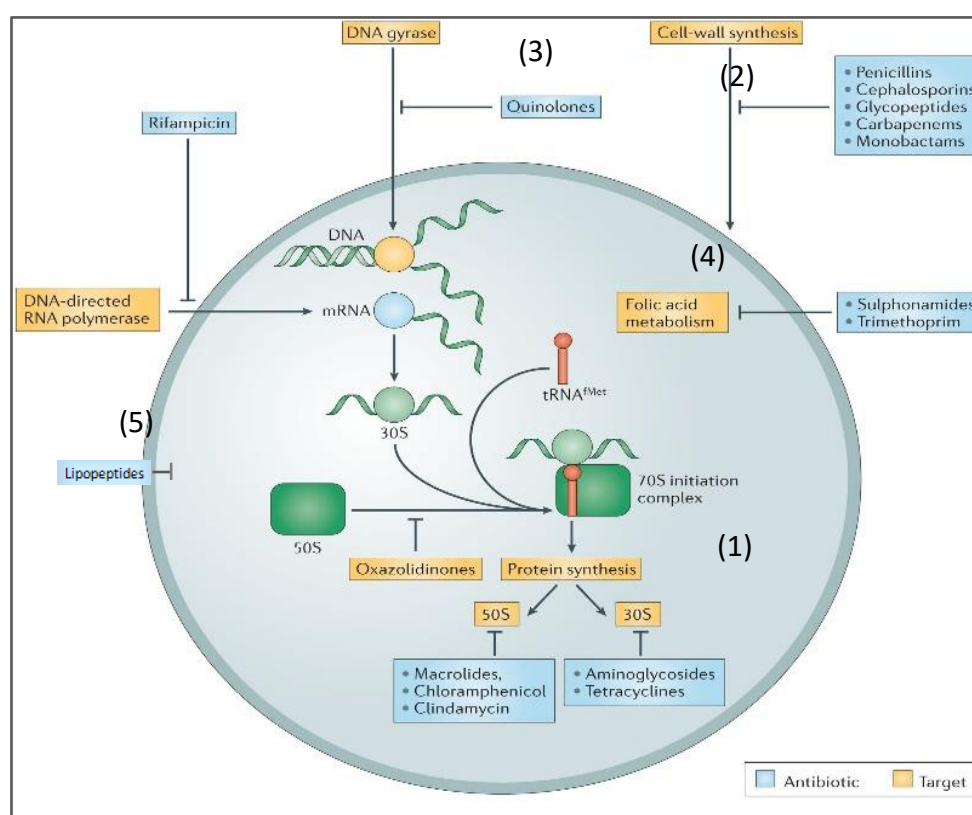
Le présent manuscrit de thèse est divisé en deux parties : « Étude bibliographique » et « Étude descriptive environnementale des eaux de fleuves au Liban ». Dans la première partie, un rapport de recherche bibliographique extensive est présenté autour de la surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement en général et dans les eaux de surface anthropisées en particulier, dans le monde et au Liban. La deuxième partie comporte tout d'abord la méthodologie de recherche des BRAs, GRAs et indicateurs viraux de

contamination fécale dans les fleuves au Liban, suivie par les résultats de recherche. Une discussion et une conclusion clôture ce manuscrit.

# **I. Étude bibliographique**

## 1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique et agissent au niveau de cibles bactériennes (Mohit Kumar *et al.* 2019) à travers les mécanismes illustrés dans la figure 1, principalement : l'inhibition de la synthèse de la paroi (ex :  $\beta$  lactamines, glycopeptides, fosfomycine), l'inhibition de la synthèse des protéines (ex : aminosides, macrolides, tétracyclines, rifampicine), l'inhibition du fonctionnement de l'ADN (ex : quinolones, imidazolés, sulfamides) et la destruction de la membrane cytoplasmique (polymyxines).



**Figure 1: Cibles bactériennes des grandes familles d'antibiotiques (Lewis 2013)**

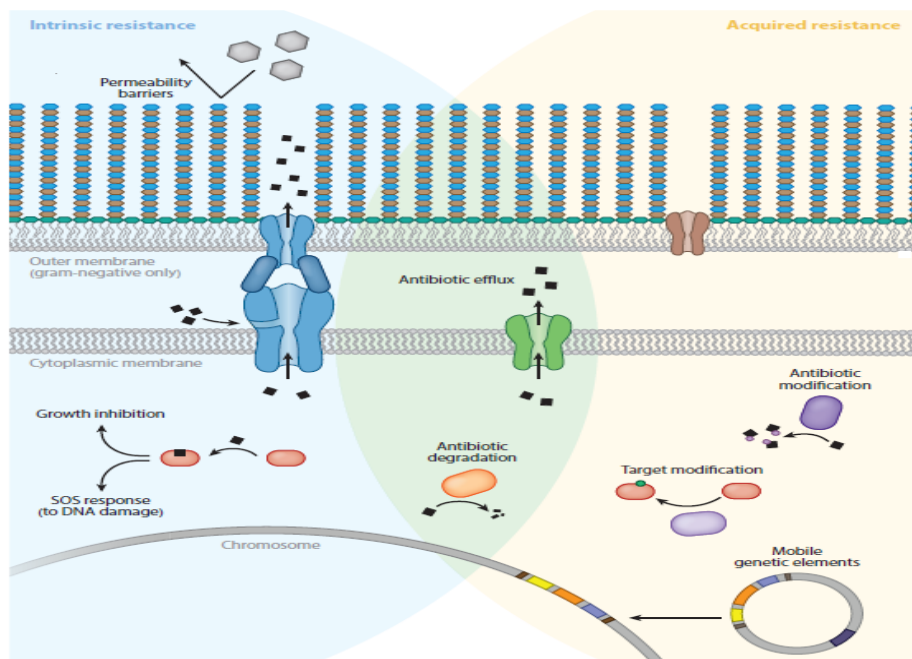
Mécanismes d'action des antibiotiques : (1) inhibition de la synthèse protéique bactérienne, (2) altération de la synthèse de la paroi bactérienne, (3) interférence avec la réplication de l'ADN, (4) interférence avec la biosynthèse du folate, et (5) altération de l'intégrité de la membrane cellulaire.

## 2. La résistance aux antibiotiques

Les espèces produisant les antibiotiques possèdent au sein de leur génome des gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent devenir accessibles par transferts horizontaux au

sein et entre différents environnements grâce à des associations aux éléments génétiques mobiles (EGMs) (Lee *et al.* 2020 ; Vikesland *et al.* 2019).

Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques sont les suivantes: (1) l'inactivation de l'antibiotique par dégradation enzymatique ou modification des systèmes enzymatiques, (2) la modification de la cible des antibiotiques, (3) l'altération de la perméabilité de la membrane cellulaire, et (4) l'expression de pompes à efflux qui rendent insuffisantes les concentrations intracellulaires d'antibiotiques (Vikesland *et al.* 2019). Les mécanismes de résistance bactérienne sont illustrés dans le schéma représentatif de la figure 2. Les mécanismes de résistance bactérienne peuvent être acquis par transferts verticaux en présence d'une forte sélection positive entraînant une sélection clonale, ou par transferts horizontaux au sein de la population pouvant s'effectuer en l'absence de sélection positive (Stevenson *et al.* 2017). La modification de l'antibiotique et l'altération des cibles bactériennes codées par des gènes mobilisables constitue un mécanisme de résistance acquis.



**Figure 2:** Schéma représentatif des mécanismes de la résistance acquise et intrinsèque (Surette and Wright 2017)

Des mécanismes de résistance naturelle existent aussi tel que la régulation positive des mutations génomiques, la réponse SOS de réparation des dommages de l'ADN, la



diminution de la perméabilité membranaire et l'induction d'export d'antibiotique à travers un système d'efflux de la double membrane. De plus, certaines pompes d'efflux de la membrane interne des bactéries, et la dégradation de l'antibiotique peuvent constituer des mécanismes de résistance naturels ou acquis.

### **2.1. La résistance aux antibiotiques dans l'environnement : une histoire ancienne**

La résistance aux antibiotiques est un phénomène environnemental naturel qui existe bien avant leur utilisation en clinique (Roberts 2018 ; Perry, Waglechner, and Wright 2016). Le résistome intrinsèque chez les agents pathogènes est connu depuis longtemps, mis en évidence entre autres, chez *Yersinia pestis*, agent de la peste noire (14e siècle) ou Justinienne (6e au 8e siècle), et chez *Vibrio cholera* agent de l'épidémie du choléra (1849) à Philadelphie (Surette and Wright 2017). Cependant l'utilisation des antibiotiques en médecine au XXe siècle a été suivie d'une augmentation des échanges génétiques chez les microorganismes entraînant l'accumulation de résistance aux antibiotiques (Czekalski *et al.* 2015).

Le séquençage de génomes microbiens de divers phylums et environnements révèle la présence d'éléments de résistance en majeure partie intrinsèques (Jardine, Mavumengwana, and Ubomba-Jaswa 2019). De plus, l'analyse de la composition des gènes de résistance montre que les agents pathogènes environnementaux ont une richesse plus importante que les agents pathogènes de l'ère pré-antibiotique (Surette and Wright 2017). Les avancements dans les domaines du séquençage et de la bio-informatique ont permis de comparer l'ancienneté des gènes de résistance et de déterminer des génomes complets sans connaissance préalable de séquences (J. Perry, Waglechner, and Wright 2016). Ainsi, les études de métagénomiques fonctionnelles de séquençage et de clonage de génomes microbiens dans un vecteur d'expression, transformés au sein d'un hôte (*Escherichia coli*), et sélectionnés sur un antibiotique, décèlent des gènes de résistance non révélés par cultures ou par « polymerase chain reaction » (PCR) (J. Perry, Waglechner, and Wright 2016). Ces études permettent de déterminer l'ancienneté de la biosynthèse des gènes de résistance en prenant en compte le taux approximatif par an de modification de nucléotides par site (J. Perry, Waglechner, and Wright 2016)(Surette and Wright 2017). Leur conclusion est que la biosynthèse et la résistance aux antibiotiques auraient évolué avec les bactéries pendant des millions et des milliards d'années (Surette and Wright 2017). Les analyses phylogénétiques de

la famille des OXA  $\beta$ -lactamases par exemple, ont présenté les mobilisations multiples ( $\sim 42 \pm 9$  et  $116 \pm 25$  millions d'années) et le transfert qui a eu lieu entre *Streptococcus* et *Bacillus* depuis 320 à 520 millions d'années (J. Perry, Waglechner, and Wright 2016). L'analyse des séquences des sous-classes B1 et B2 métallob- $\beta$ -lactamases, suggère leur apparition il y a un milliard d'années avant la séparation en gammaprotéobactéries et  $\beta$ -protéobactéries (Perry, Waglechner, and Wright 2016 ; Surette and Wright 2017). La sous-classe B3 serait apparue il y a 2,2 milliards d'années (J. Perry, Waglechner, and Wright 2016). Dans le cas de l'érythromycine, la biosynthèse daterait de  $880 \pm 134$  million d'années (Surette and Wright 2017).

La conservation de l'ordre des gènes appelée syntonie de séquences au sein de ces métagénomés a permis de déterminer l'ancienneté de la résistance retrouvée actuellement (Roberts 2018 ; Perry, Waglechner, and Wright 2016). Mais généralement, les études de phylogénie ne sont pas concluantes en raison du phénomène de dégradation de l'ADN et des protéines avec le temps au sein de fossiles (Loog and Larson 2019). La détermination de l'ancienneté d'un phénomène génétique nécessite l'accès à de l'ADN ancien bien conservé comme dans le cas d'ADN récupéré à partir de sols perpétuellement gelés des régions subpolaires (appelés permafrosts ou pergélisol) ou du système de grottes de Lechuguilla séparés de l'extérieur depuis quatre millions d'années (Pawlowski *et al.* 2016). Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif qui y sont récupérées (ex : *Paenibacillus*) expriment des résistances comparables aux isolats cliniques ( $\beta$ -lactamases, enzymes modifiant les aminosides) ou environnementaux (ex : *Brachybacterium faecium* et *Bacillus*) (Perry, Waglechner, and Wright 2016 ; Surette and Wright 2017). Des gènes de résistance à différentes classes d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, tétracycline, et glycopeptides) datant de plus de 30 000 ans ont ainsi été récupérés du permafrost (Jardine, Mavumengwana, and Ubomba-Jaswa 2019). D'autres travaux investiguant le microbiote de momies colombiennes ont montré des homologies et une conservation de l'intégralité de séquences de gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, à la fosfomycine, au chloramphénicol, aux aminosides, aux macrolides, aux sulfamides, aux quinolones, à la tétracycline, à la vancomycine, à la bacitracine, et aux bactériocines (Perry, Westman, and Wright 2014 ; Perry, Waglechner, and Wright 2016).

Concernant les plasmides, EGMs, vecteurs de la dissémination de la résistance, ils ont pu être retrouvés sans gènes de résistance aux agents antimicrobiens (GRAs), à partir de l'ADN d'un pergélisol béringien vieux de 5000 ans soulignant leur fonction initiale de mobilité (Surette and Wright 2017). Nombreuses études ont permis d'isoler des GRAs dans des milieux naturels et ruraux éloignés, peu anthropisés, bien qu'en partie cliniquement pertinents (Zhou *et al.* 2018), soulignant le caractère ubiquitaire de la résistance aux agents antimicrobiens dans l'environnement. Parallèlement, les plasmides de résistance portant une multitude de GRAs, transforment actuellement certains agents bactériens en « super pathogènes » responsables d'infections nosocomiales incontrôlables (San Millan 2018). Le coût de leur maintien et les adaptations compensatrices qui en découlent détermineraient la réussite des associations bactérie-plasmide et l'évolution de la résistance (San Millan 2018). Ainsi, l'environnement serait une source potentielle de certaines résistances rencontrées en milieu clinique (J. A. Perry, Westman, and Wright 2014).

La différence du profil de résistance entre les bactéries environnementales et les bactéries pathogènes qui existait avant les années 1940, témoigne de la multitude de contraintes écologiques du microbiome environnemental (Surette and Wright 2017). Suite à l'usage des antibiotiques en agriculture et en médecine, le résistome environnemental a évolué et s'est enrichi significativement (Perry, Waglechner, and Wright 2016). La période entre 1935 et 1975 est marquée par un constant enrichissement de la résistance (Perry, Waglechner, and Wright 2016). Actuellement, il est donc fondamental d'analyser le problème de la dissémination de la résistance par une approche globale pour éviter d'entrer dans l'ère post-antibiotique où le traitement des infections bactériennes deviendra très difficile (Surette and Wright 2017). De plus, l'approche environnementale de la résistance devrait permettre d'anticiper l'émergence de résistances en clinique sous pression de sélection (Perry 2016).

## **2.2. La pression anthropique : une sélection actuelle**

L'activité humaine influence l'émergence et la diversité des BRAs/GRAs et EGMs dans les écosystèmes environnementaux. Les principales voies d'accès identifiées sont l'application du fumier ou l'épandage de boues d'épuration sur les sols pour l'engraisement des champs (Surette and Wright 2017 ; Roberts 2018 ; Anthony *et al.* 2019), ou par la contamination des eaux de surface par les effluents d'origine variées, même traités

classiquement (Roberts 2018). Les effluents hospitaliers, de stations d'épurations des eaux usées (STEU), d'industries pharmaceutiques, et de domaines confinés d'élevage des animaux sont considérés comme des zones à risque de contamination (Karkman, Pärnänen, and Larsson 2019 ; Bielen *et al.* 2017 ; Laquaz *et al.* 2018 ; Duan *et al.* 2019). Ainsi fleuves, lacs, sédiments, et eaux souterraines recueillant les effluents, véhiculent des BRAs, GRAs, antibiotiques et leurs résidus, mais aussi, contaminants chimiques et métaux traces (Chen, Bai, Li, *et al.* 2019a ; O'Flaherty and Cummins 2017 ; Peng *et al.* 2019 ; Yang *et al.* 2016 ; (Andrade *et al.* 2020 ; Vikesland *et al.* 2019).

Le microbiome environnemental (de sol, d'eau et d'effluents de STEUs) décrit comme réservoir de GRAs, est alors analysé par des approches génomiques et métagénomiques montrant dans les différentes niches écologiques une composition et une abondance variée de GRAs (Zhang *et al.* 2019 ; Chen *et al.* 2016 ; Guo *et al.* 2017). Le séquençage complet de GRAs de ces niches écologiques pose l'hypothèse d'un transfert horizontal vers des bactéries pathogènes isolées en milieu clinique (Li, Xia, and Zhang 2017 ; Lundborg and Tamhankar 2017). L'environnement impacté par l'homme devient par conséquent un terrain de sélection d'organismes résistants et de pathogènes opportunistes (Buelow *et al.* 2018).

Les eaux de surface contaminées pourraient être le siège potentiel de transmission de la résistance à l'Homme par contact au niveau de nombreuses interfaces (Manaia 2017 ; Surette and Wright 2017 ; Huijbers *et al.* 2015). Les différents microbiomes en écologie terrestre interagissent de façon directe ou indirecte au niveau de différentes interfaces et ceci est illustré par l'exemple de l'avoparcine utilisée comme facteur de croissance dans les fermes d'élevage (Roberts 2018). L'avoparcine utilisé dans l'élevage des animaux, a conduit au développement de la résistance à la vancomycine chez *Enterococcus faecium* (VRE), isolés en premier dans la viande mais ultérieurement détecté dans le microbiote des personnes en contact avec ces animaux. Ces VRE ont été isolées par la suite chez des personnes hospitalisées. Dans d'autres parties du monde, la vancomycine a été utilisée uniquement en milieu hospitalier mais les VRE ont fini par être isolés chez la population, des animaux et des eaux de surface (Roberts 2018).

La diversité et l'extension du résistome au sein du microbiome environnemental suggère une longue évolution naturelle (J. Perry, Wagglechner, and Wright 2016) et l'influence

de l'Homme (Vikesland *et al.* 2019). Cette évolution est due à la contamination de l'environnement par des métaux traces, biocides et autres composés induisant une émergence de la résistance par co-sélection (Waglechner 2021 ; Surette and Wright 2017 ; Vikesland *et al.* 2019). La co-résistance c'est-à-dire la présence de plusieurs gènes de résistance sur un même EGM, la résistance croisée conférant par un même mécanisme biochimique une résistance à plusieurs composés, ou la co-régulation du fait de la présence de plusieurs gènes de résistance sur une seule région codante transcrite de l'ADN, sont les mécanismes sous-jacents de la co-sélection (Vikesland *et al.* 2019 ; Imran, Das, and Naik 2019). Les bactéries ont aussi développé des mécanismes de résistance pour faire face aux enjeux de compétition territoriale (Surette and Wright 2017 ; Holmes et al. 2016). Cette interaction est partiellement élucidée en termes de corrélation avec les phénomènes d'émergence, de persistance et de dissémination de la résistance (Vikesland et al. 2019).

L'évolution rapide du résistome environnemental est intimement liée au transfert horizontal de gènes fortement induit sous la pression anthropique (Lee *et al.* 2020) et favorisée par l'abondance des bactéries naturellement transformables, de phages transducteurs et d'éléments conjugatifs dans l'environnement (Perry, Westman, and Wright 2014 ; Manaia 2017). L'induction du transfert horizontal des gènes par la présence d'antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices est controversée (Lopatkin and Collins 2020) ; de cette façon la dynamique de conjugaison peut être induite comme elle peut être inhibée (Lopatkin *et al.* 2016). En France, en 2018 en médecine humaine et vétérinaire, respectivement 863 et 471 tonnes d'antibiotiques ou leurs métabolites ont été vendus (ANSES 2020) mais la quantité qui rejoint l'environnement est difficile à évaluer. L'impact de la présence d'antibiotiques, de métaux traces et de biocides sur la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement n'est toujours pas complètement élucidé (ANSES 2020 ; Zainab *et al.* 2020 ; Alyamani *et al.* 2017). Alors que certains auteurs rapportent des corrélations positives entre les concentrations d'antibiotiques et l'abondance de GRAs dans certains environnements (Xu *et al.* 2017), d'autres n'en ont pas trouvé (Jia *et al.* 2018). Cependant, la co-contamination par des microplastiques, métaux et antibiotiques développerait une multi-résistance par le mécanisme de co-sélection (Imran, Das, and Naik 2019). Contrairement à certains antibiotiques qui sont dégradés dans l'environnement, les métaux s'accumulent et se présenteraient comme agents de co-sélection de résistance aux

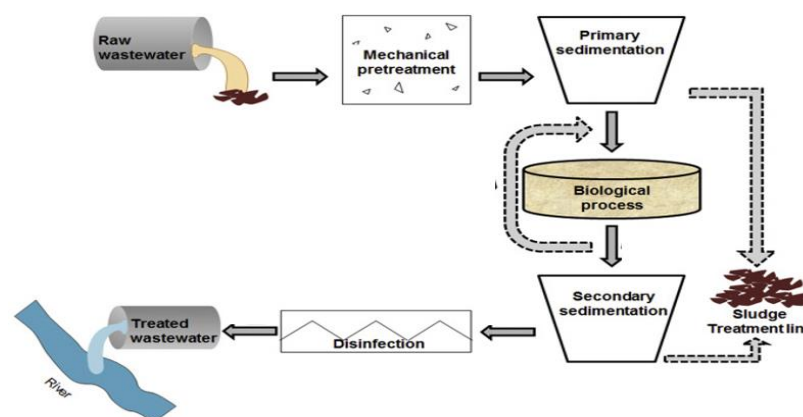
antibiotiques (Zhao *et al.* 2019). La présence d'antibiotiques n'est donc pas l'unique facteur pour favoriser la survie des BRAs et la persistance des GRAs dans l'environnement. De plus, la biodisponibilité et la bioaccessibilité sont deux notions à prendre en compte pour évaluer la pression de sélection des antibiotiques (ANSES 2020). La présence de co-sélecteur(s), la diversité des communautés bactériennes et les facteurs environnementaux (pH, complexité des micro-niches, état de viabilité mais non culturabilité des bactéries, etc..) sont susceptibles d'influencer la dynamique spatio-temporelle de l'antibiorésistance (Zainab *et al.* 2020)(ANSES 2020).

### 2.2.1. Les stations d'épuration des eaux usées et la dissémination dans les eaux

Les STEUs visent à diminuer la charge organique des eaux usées et diminuent, corollairement, les charges en microorganismes, composés inorganiques et composés organiques toxiques (ex : résidus d'antibiotiques, biocides, pesticides et substances récalcitrantes) par une combinaison de traitements physico-chimiques et biologiques (Krzeminski *et al.* 2019 ; Manaia *et al.* 2018 ; Ju *et al.* 2019). Ces procédés de traitements constituent une avancée technologique majeure permettant le retour dans l'environnement d'une eau de meilleure qualité (Manaia *et al.* 2018).

#### Principe de fonctionnement des STEUs

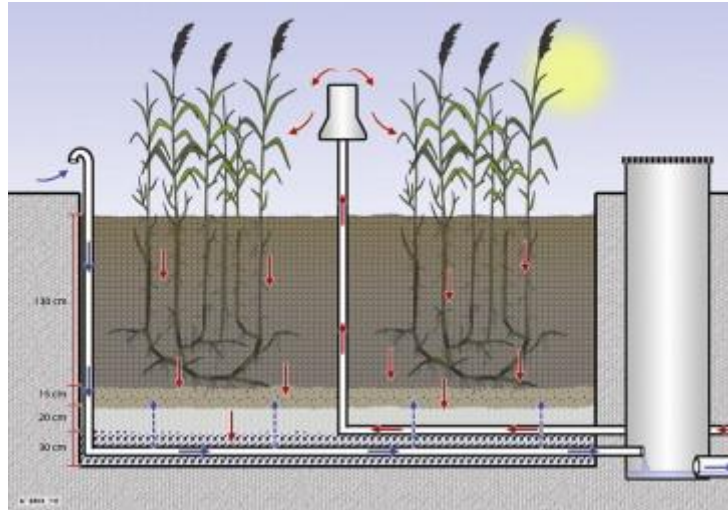
Les traitements conventionnels font intervenir plusieurs étapes consécutives : les prétraitements, les traitements primaires, secondaires et tertiaires (Manaia *et al.* 2018 ; Bourgin *et al.* 2018), chacune étant spécifique d'une action sur un type de polluant, illustrée par la figure 3.



**Figure 3: Représentation schématique des principales étapes classiques d'une STEU (Manaia et al. 2018)**

Les effluents bruts sont pré-traités pour séparer mécaniquement les solides encombrants, le sable et les graisses des eaux ; une décantation primaire peut éventuellement suivre. Les effluents du traitement primaire subissent un traitement secondaire biologique aérobie pour réduire la matière carbonée puis, selon la qualité du rejet requise, un traitement tertiaire anoxique des formes azotées oxydées, et un traitement anaérobie ou physicochimique du phosphore. Un décanteur secondaire permet la séparation liquide-solide, la pollution soluble ayant été transformée en « boue » conglomérat de matières organique, minérale et de microorganismes sous forme de floccs décantables. L'effluent traité est rejeté dans les eaux de surface tandis que la boue résultant du traitement biologique est partiellement recyclée et traitée par des installations de traitements de boue (épaississement, déshydratation, hygiénisation).

La réutilisation des eaux traitées (reuse) est actuellement développée pour l'irrigation des sols agricoles ou la recharge de nappes souterraines (Marano et al. 2019). Des améliorations ont été apportées aux STEUs pour obtenir des effluents finaux de meilleure qualité bactériologique, comme la désinfection, la nanofiltration, l'osmose inverse ou le passage en zone humide de l'effluent secondaire (Pei et al. 2019 ; Arola et al. 2019). Les procédés de désinfection sont utilisés seuls ou en combinaison, instaurées en zone sensibles principalement (baignade, conchyliculture), par exemple : chloration, rayonnement UV, membrane et ozonation (Anthony et al. 2019) mais restent loin d'être systématiques même dans les pays développés comme la France. Le système de passage en zone humide dont le système de lits à roseaux (Kowal et al. 2021), représenté dans la figure 4, est une approche écologique et économique permettant la dégradation de microorganismes et polluants après assimilation des effluents secondaires par des plantes (Chen et al. 2019). La combinaison de technologies permet l'obtention d'une eau à faible fraction microbienne, exempt de composés organiques métabolisables, nutriments (azote/phosphore) pour éviter l'eutrophisation des eaux souvent considérée comme le 1<sup>er</sup> effet néfaste et micropolluants récalcitrants (Ju et al. 2019 ; Manaia et al. 2018 ; Xiaohui Liu, Guo, et al. 2019). Cependant une partie des GRAs persistent même après combinaison de procédés de traitement tertiaires ou même augmentent en abondance relative (Yan Zhang et al. 2018 ; Lin et al. 2016).



**Figure 4 : Dessin d'un système de lits à roseaux pour le traitement de boues (Matamoros et al. 2012)**

Le lit à roseaux (*Phragmites australis*) est établi dans un bassin imperméable et est composé de bas en haut d'une couche de drainage constituée de gravier, de roseaux, et de boue distribuée après pompage sur la surface du lit. Les canaux de drainage s'étendant dans l'atmosphère et permettent l'aération dans le système.

#### **Les STEUs : première source de contamination environnementale**

Les bassins biologiques des STEUs agissent comme des réacteurs où interagissent bactéries, EGMs et GRAs et peuvent être le siège de phénomènes d'amplification et/ou de transmission de résistances (Surette and Wright 2017 ; Ju et al. 2019 ; An et al. 2018 ; Anthony et al. 2019). La pression de sélection à l'intérieur des STEUs favoriserait l'enrichissement des effluents en GRAs (Amarasiri, Sano, and Suzuki 2020 ; Bondarczuk and Piotrowska-Seget 2019). Ainsi, les zones de rejets de ces effluents sont susceptibles d'être colonisées par les BRAs (Brown et al. 2019) et par conséquent être enrichies en GRAs (Yang et al. 2016 ; Thornton et al. 2020). En raison de la non spécificité des procédés de traitement, les effluents de STEUs constituent alors une source de dissémination de BRAs/GRAs (Karkman, Pärnänen, and Larsson 2019 ; J. Chen et al. 2019 ; Buelow et al. 2018) et de résidus d'antibiotiques dans l'environnement récepteur (Roberts 2018 ; Voigt et al. 2020 ; Anthony et al. 2019). Les quinolones, macrolides et sulfamides sont les antibiotiques les plus fréquemment quantifiés et les plus persistants dans les effluents de STEUs hospitalières (ANSES 2020).

En Allemagne, les études de Brown et al. 2019 ont démontré par des méthodes de culture et de qPCR que l'abondance absolue de bactéries pathogènes (nombre de bactéries



pathogènes par mL d'échantillon) (enterocoques, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) et GRAs (*ermB*, *bla*<sub>TEM</sub>, *tetM*, *qnrS*) augmentait en aval du point de déversement d'effluents d'une STEU dans le fleuve receptr (Brown *et al.* 2019). Cependant, les concentrations d'antibiotiques (ANSES 2020) et de BRAs (Thornton *et al.* 2020) dans la phase dissoute des eaux de surface décroissaient progressivement entre deux zones de rejets ou au fur et à mesure de l'éloignement du point source de contamination à cause de la dilution, la sorption et la dégradation dans le milieu récepteur (Thornton *et al.* 2020) ; ces phénomènes de dégradation comprenant aussi la lyse et de la prédation, sont appelés « résilience du milieu naturel » (ANSES 2020).

À l'échelle de l'Europe entière, une étude menée par Cacace *et al.* 2019 a investigué par qPCR l'abondance absolue et la dissémination de GRAs (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, *bla*<sub>KPC-3</sub>, *sul1*, *tetM*, *mcr-1*) au niveau de STEUs et des systèmes aquatiques recevant leurs effluents (Cacace *et al.* 2019). Selon les auteurs, les variations biogéographiques et les facteurs environnementaux n'influenceraient pas le résistome des effluents de STEUs. L'impact sur l'environnement récepteur serait associé à la concentration en GRAs de l'effluent et du régime hydrologique local (Cacace *et al.* 2019).

L'abondance relative des BRAs/GRAs est significativement plus élevée dans les effluents d'hôpitaux et de STEUs d'hôpitaux par rapport à ceux de STEUs municipales à cause de l'utilisation spécifique et importante d'antibiotiques dans les systèmes de soins hospitaliers (Buelow *et al.* 2018 ; Manish Kumar *et al.* 2020 ; Lorenzo *et al.* 2018). En revanche, les effluents de STEUs urbaines et rurales comportent des abondances relatives en GRAs comparables, même dans le cas des déversements de rejets d'hôpitaux dans les STEUs urbaines (Buelow *et al.* 2020 ; Buelow *et al.* 2018 ; Cacace *et al.* 2019 ; Sib *et al.* 2020). Buelow *et al.* 2020 ont surveillé la dynamique du résistome et du microbiome des effluents hospitaliers et urbains traités et non traités pendant quatre ans aux quatre saisons en France. Des signatures distinctes et robustes du résistome et du microbiote, en particulier pour les effluents hospitaliers et urbains non traités, sont distinguées et restent stables au fil du temps (Buelow *et al.* 2020). Certains pathogènes comme *Escherichia coli* productrice de shigatoxine et les virus entériques peuvent être détruits au bout de quelques mois dans les STEUs (Rouch *et al.* 2011 ; Roberts 2018). D'autres pathogènes prolifèrent et peuvent adhérer aux particules

organiques/inorganiques récalcitrantes (Manaia *et al.* 2018) ou persistent des années à l'état de spores (*Clostridium spp.*, *Clostridium perfringens*, et *Clostridium difficile*)(Roberts 2018). Les bactéries multi résistantes redoutables du groupe ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*) et *Escherichia coli* sécrétrice de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) ont été détectées au niveau de STEUs non spécifiques (Savin *et al.* 2020).

### 2.2.2. Les pratiques agricoles et la dissémination dans les sols

Les sols agricoles irrigués par les eaux usées traitées ou amendés par de la boue en provenance de STEU, deviennent les réceptacles des antibiotiques et résidus, GRAs et BRAs (Christou *et al.* 2017). Les sols agricoles sont assimilés à un réacteur géant où interagissent les communautés bactériennes, résidente et exogène sous la pression de sélection exercée par les contaminants antibiotiques (Christou *et al.* 2017). De plus, les écoulements drainés en provenance de ces sites ainsi que de terrains amendés par du fumier contaminent les environnements connectés tels que eaux de surface, eaux souterraines et sédiments (ANSES 2020 ; Christou *et al.* 2017). L'effet sur le long terme de la réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation de sols agricoles est actuellement caractérisé. Pan and Chu 2018 montrent dans leur étude menée dans la région agricole du fleuve Delta en Chine que les abondances de deux antibiotiques (tétracycline et sulfaméthoxazole) et 11 GRAs (*tet A*, *tet B*, *tet C*, *tet E*, *tet M*, *tet O*, *tet S*, *tet X*, *sul I*, *sul II* et *sul III*) sont significativement corrélées à leurs concentrations dans l'eau usée d'irrigation (Pan and Chu 2018).

Les traitements appliqués au fumier et aux boues de STEU (ex : compostage ou digestion anaérobie) réduisent leur abondance en GRAs et limiteraient le risque de transmission de ces GRAs à d'autres environnements (ANSES 2020 ; Wang *et al.* 2020). L'étude de Gou *et al.* 2018 démontre une réduction de la diversité et de l'abondance du résistome du fumier de bétail après compostage. La co-occurrence négative de GRAs et d'EGMs expliquerait la réduction du transfert horizontal des GRAs et par conséquent la diminution du risque de leur transmission à la flore résidente (Gou *et al.* 2018). Flores-Orozco *et al.* 2020 étudient l'effet de la digestion anaérobie du fumier de bovins et observent également une réduction de l'abondance totale et relative de plusieurs GRAs et une réduction

de la co-occurrence de groupes de GRAs localisés sur les mêmes EGMs (Flores-Orozco *et al.* 2020).

### **2.3. Choix des indicateurs de l'antibiorésistance dans l'environnement**

Le risque associé au transfert génétique est lié aux GRAs pouvant être mobilisés de l'environnement vers des bactéries capables d'infecter l'homme (Martínez, Coque, and Baquero 2015). L'évaluation du risque passe par la définition d'indicateurs de résistance. Ils doivent permettre d'évaluer qualitativement et quantitativement l'occurrence de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens dans les environnements naturels et anthropisés (ANSES 2020 ; Huijbers, Flach, and Larsson 2019 ; Goulas *et al.* 2020 ; Amarasiri, Sano, and Suzuki 2020). La surveillance de l'antibiorésistance au niveau de l'environnement, comme les eaux de surface et les sols, vise à évaluer le risque sanitaire et/ou environnemental afin que des mesures limitant la dissémination de l'antibiorésistance soient prises ou proposées (ANSES 2020 ; Goulas *et al.* 2020 ; Larsson *et al.* 2018). En outre, l'identification de sources de sélection de GRAs (Thornton *et al.* 2020) et la détection précoce des GRAs émergents (Chaturvedi, Singh, *et al.* 2021) mobilisables et jusque-là non détectés chez des pathogènes (ANSES 2020) font partie des objectifs.

#### **2.3.1. La quantification des gènes de résistances aux agents antimicrobiens**

La quantification des GRAs par les méthodes de biologie moléculaire constitue une méthode établie dans les études de surveillance de l'antibiorésistance au niveau de l'environnement (ANSES 2020 ; Marano *et al.* 2019 ; Zhao *et al.* 2017 ; Zhu *et al.* 2017 ; Cacace *et al.* 2019). Des organisations impliquées dans la surveillance de l'antibiorésistance comme le consortium du programme Européen COST et le Water JPI SCARE préconisent la quantification de certains gènes en particulier (*int11*, *sul1*, *sul2*, *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaNDM-1*, *blaVIM*, *blaKPC*, *qnrS*, *aac-(6')-Ib-cr*, *vanA*, *mecA*, *erm(B)*, *erm(F)*, *tet(M)*, *aph*, *aadA* et *qacEΔ1*) (Berendonk *et al.* 2015 ; Pärnänen *et al.* 2019 ; ANSES 2020). Le groupe de travail et le comité d'experts spécialisés en eaux de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) proposent les gènes *int11* ou *sul1* comme indicateurs de contamination environnementale par les BRAs et GRAs.

L'augmentation de l'abondance en GRAs est associée à la contamination fécale de l'environnement plutôt qu'à la sélection de GRAs par les bactéries environnementales (Huijbers, Flach, and Larsson 2019 ; An *et al.* 2020), à l'exception des environnements hautement impactés par les effluents d'industries de production d'antibiotiques (Huijbers, Flach, and Larsson 2019 ; Huijbers *et al.* 2015).

L'identification des espèces hôtes des GRAs demeure un défi d'actualité dans toutes les études, justifiant les recommandations de recherche de bactéries résistantes conjointement à la recherche de gènes de résistance aux antibiotiques (Pärnänen *et al.* 2019).

### **2.3.2. La quantification des éléments génétiques mobiles**

L'augmentation mondiale du niveau de contamination des environnements aquatiques recevant des effluents de STEUs, notamment des fleuves par les EGMs et autres déterminants de la résistance nécessite le développement de nouvelles technologies de désinfection des eaux (Singh *et al.* 2019). Un défi majeur à prélever serait d'aborder le problème de dissémination des EGMs associés aux agents pathogènes redoutables ESKAPEE, et de le résoudre (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* et *Escherichia coli*) (Partridge *et al.* 2018).

Les mécanismes d'échanges génétiques comprennent la conjugaison (transfert de plasmides et d'éléments intégratifs conjugatifs), la transduction (médiée par les bactériophages), et la transformation (intégration d'ADN extracellulaire)(Partridge *et al.* 2018).

Les EGMs facilitent l'échange des GRAs des bactéries environnementales non-pathogéniques aux bactéries pouvant causer des infections chez l'homme et vice versa, reflétant un risque d'émergence de résistance (Marano *et al.* 2019 ; Huijbers, Flach, and Larsson 2019). Ce risque est étroitement lié à la dose suffisante infectante (Huijbers, Flach, and Larsson 2019). Certains EGMs ont été proposés comme marqueur de la pression anthropique (Lee *et al.* 2020). Spécifiquement, le gène *intl1* (Marano *et al.* 2019 ; Huijbers, Flach, and Larsson 2019 ; Stalder *et al.* 2014) et le plasmide Inc-P1 (González-Plaza *et al.*

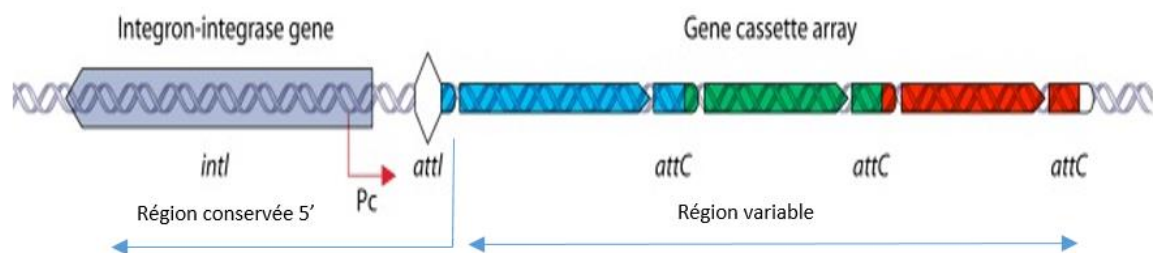
2019), sont considérés comme des marqueurs de la pression anthropique (ANSES 2020 ; Marano *et al.* 2019 ; Huijbers, Flach, and Larsson 2019 ; Lee *et al.* 2020).

### 2.3.2.1. Les intégrons

Les intégrons sont des systèmes génétiques de capture, d'acquisition et d'expression de GRAs (Stokes and Hall 1989). La régulation et l'activation des intégrons s'effectuent par le système de réponse SOS de la bactérie en conditions de stress (Stalder *et al.* 2014 ; Guerin *et al.* 2009). La résistance à de nombreuses classes d'antibiotiques peut être médiée à travers ces EGMs qui sont majoritairement décrits chez les bactéries à Gram négatif (Partridge *et al.* 2009 ; Razavi *et al.* 2017).

#### La structure des intégrons

Différents éléments constituent la structure des intégrons comme le montre la figure 5. Une plateforme fonctionnelle comporte le gène de l'intégrase, le promoteur d'expression des cassettes et un site de recombinaison *attI*. Le réseau de cassette se trouve en aval dans la région variable. Les cassettes sont originaires de taxons et d'environnements variés ; leur assemblage au sein de l'intégron contribue à la prolifération des bactéries du microbiote humain et à leur survie dans les contextes cliniques (Gillings 2017).



**Figure 5: Représentation de la structure d'un intégron (Gillings 2014)**

Les gènes portés par un intégron sont reliés par des sites de recombinaison *attC* formant des cassettes de gènes, ces gènes sont en général dépourvus de promoteur propre et sont exprimés à partir d'un ou de deux promoteur(s) *Pc* (Jové *et al.* 2017).

L'intégrase est responsable de la mobilité des cassettes. En effet, elle peut l'exciser du réseau par une recombinaison entre deux sites *attC*. La cassette passe alors d'une forme linéaire au sein du réseau à une forme libre circulaire. L'intégrase est aussi capable d'intégrer une cassette libre dans le réseau par une recombinaison site-spécifique s'effectuant entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* de la cassette et est catalysée par l'intégrase codée par le gène *intl* (Hall *et al.* 1999 ; Bouvier, Demarre, and Mazel 2005 ; Loot *et al.* 2010 ; Biskri and Mazel 2003). La structure du réseau de cassette de l'intégron est donc variable en fonction de la fonctionnalité (niveau d'activité de recombinaison) de l'intégrase.

### **La classification des intégrons**

Les intégrons sont classifiés en intégrons sédentaires ou mobiles.

- Les intégrons chromosomiques sédentaires, pouvant porter jusqu'à 200 cassettes, dont le gène code une protéine de fonction souvent inconnue et qui sont strictement chromosomiques. Ils servent de réservoir de gènes adaptatifs aux stress environnementaux pour les bactéries.

- Les intégrons de multirésistance ou intégrons mobiles, caractérisés par un nombre limité de cassettes, qui le plus souvent hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques et qui peuvent être véhiculés par des EGMs tels que plasmides et/ou transposons.

Les intégrons chromosomiques sont classifiés comme étant sédentaires lorsque leur fréquence dans le pan-génome est de 100%, ou s'ils comprennent plus de 19 sites *attC* alors qu'ils sont classifiés comme mobiles lorsqu'ils sont absents de plus de 40% du génome des différentes souches de l'espèce, s'ils sont présents au niveau de plasmides, ou lorsque le gène de l'intégrase fait partie des classes 1 à 5 (Cury *et al.* 2016). Les intégrons chromosomiques sont mobilisés au sein de plasmides conjugatifs chez les bactéries isolées en clinique et dans les écosystèmes impactés par l'homme en conditions de stress (Gillings 2017 ; Loot *et al.* 2017 ; McMillan *et al.* 2019). Les intégrons chromosomiques sont isolés chez *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Proteobacteria*, *Chlorobi*, *Spirochaetes* et *Planctomycetes* dans une multitude d'environnements y compris les fleuves; mais ils peuvent aussi être retrouvés chez des bactéries non pathogènes comme celles de la famille *Betaproteobacteria* (Gillings 2014).

Concernant les intégrons de multirésistance (IM), à ce jour, 5 classes d'IM sont définies (1 à 5) en fonction de la séquence de leur intégrase. Les IM1 et IM3 (Arakawa *et al.* 1995) sont associés au transposon Tn402 (Collis *et al.* 2002 ; Xu, Davies, and Miao 2007). Les IM2 sont principalement associés aux transposons dérivés de Tn7 (Ramírez, Piñeiro, and Centrón 2010). Ces trois classes sont celles qui sont les plus impliquées dans la diffusion de l'antibio-résistance. Les IM4 et IM5 sont responsables uniquement de la résistance au triméthoprime chez *Vibrio spp.*

Dans l'environnement, la fréquence des IM1 est significativement corrélée à l'abondance absolue (nombre de copies de gènes par mL d'échantillon) des GRAs (Karkman, Pärnänen, and Larsson 2019) et à l'activité anthropique (Aubertheau *et al.* 2017 ; Liping Ma *et al.* 2017). L'activité anthropique induirait la dissémination des IM1 (Lehmann *et al.* 2016 ; Amos *et al.* 2018). Les IMs aurait évolué à partir d'un ancêtre environnemental possédant une cassette de gène d'efflux *qacE*, puis aurait acquis le gène *sul1* de résistance aux sulfamides (Gillings 2017). L'insertion de l'IM1 au sein d'un transposon Tn402-like, Tn402 ou Tn21 a augmenté sa mobilité ; ensuite son association à des séquences d'insertion et des éléments inversés transposables a favorisé la diversification et les combinaisons génétiques (Gillings 2017). La quantification des IM1 est fréquente dans les études de surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement ou pour mesurer l'efficacité des STEUs (Zheng *et al.* 2020 ; Marano *et al.* 2019). Les méthodes de détection d'*int1*, l'intégrase des IM1, ne sont pas standardisées, notamment l'extraction de l'ADN à partir des matrices étudiées (ANSES 2020) ; ceci limiterait la comparaison entre les études menées dans un contexte environnemental et clinique ou au sein même du contexte environnemental. La normalisation des techniques est ainsi souhaitable.

Les IM2 sont moins détectés dans les environnements naturels ou impactés par l'homme (Aubertheau *et al.* 2017) mais ils sont associés à certains habitats agricoles, chez *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Providencia stuartii* et *Escherichia coli* (Gillings 2014). Dans les contextes cliniques, *int12* est majoritairement inactif à cause d'un codon stop dans sa structure nucléotidique (Engelstädter, Harms, and Johnsen 2016) résultant en une synthèse par la bactérie d'une intégrase tronquée (Hansson *et al.* 2002 ; Rådström *et al.* 1994 ; Jové *et al.* 2017). Des conditions environnementales stables et prolongées auraient levé la pression

de sélection pour le maintien d'une intégrase fonctionnelle (Engelstädter, Harms, and Johnsen 2016). La substitution au niveau du codon stop des IM2 (Jové 2010) chez *Escherichia coli* (Gillings 2014) et chez des *Proteae* (Couvé-Deacon *et al.* 2019) donne lieu à un codon permettant des recombinaisons génétiques et l'accumulation de cassettes et de pathogénicités (Márquez *et al.* 2008 ; Couvé-Deacon *et al.* 2019). Dans le cas des IM2 codant une intégrase active, le promoteur associé est de moindre efficacité, probablement pour équilibrer le coût énergétique élevé du maintien d'une *intI2* active (Jové *et al.* 2017).

Les IM3 sont retrouvés dans des environnements naturels et anthropisés par exemple chez *Delftia*, *Enterobacter*, *Neisseria* (Aubertheau *et al.* 2017 ; Stalder *et al.* 2019 ; Chen, Bai, Li, *et al.* 2019a ; Tchuinte *et al.* 2016) et chez *Acinetobacter* (Tchuinte *et al.* 2016). Dans les contextes cliniques, ces intégrons ont été initialement décrits au Japon (Gillings 2014).

L'incidence des intégrons augmente avec l'exposition à des agents sélectifs dans les environnements naturels ou dominés par l'Homme (Engelstädter, Harms, and Johnsen 2016 ; Lu *et al.* 2020). Les intégrons peuvent aussi augmenter en abondance longtemps après un évènement de pollution (Gillings, Westoby, and Ghaly 2018). Les communautés bactériennes sont altérées suite aux évènements de recombinaison génétique et de mutations favorisées par la transformation et la conjugaison induisant la réponse SOS (Lu *et al.*, 2020 ; Amos *et al.* 2015) ; ceci favorise la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement (Engelstädter, Harms, and Johnsen 2016 ; Ghaly *et al.* 2020).

### **La détection des intégrons dans l'environnement**

La détection et quantification des intégrons dans l'environnement par des approches indépendantes de culture permet de surveiller l'impact anthropique et la contamination par les GRAs (ANSES 2020 ; Gatica *et al.* 2016 ; Amos *et al.* 2018 ; Lekunberri, Balcázar, and Borrego 2018 ; Buelow *et al.* 2020). Parmi les IMs, ceux de classe 1 (possédant un gène d'intégrase intégron *intI1*) sont les plus détectés et investigués, suivis de ceux de classe 2 et 3 (possédant des gènes d'intégrase intégron *intI2* et *intI3* respectivement)(Yu *et al.* 2016).

Depuis l'ère pré-antibiotique, les IM 1 contenaient des déterminants de résistance aux ammoniums quaternaires ou au mercure et étaient associés à divers plasmides ou transposons au sein des bactéries environnementales (Stalder *et al.* 2014) ; la pression



sélective exercée suite à l'exposition aux métaux traces et ammoniums quaternaires dans différents écosystèmes expliquerait l'abondance élevée des IM1 dans ces milieux (Stalder *et al.* 2014). Les STEUs éliminent plus de 90% des intégrons présents dans les eaux usées et réduisent la diversité de la fraction récalcitrante (Stalder *et al.* 2014). Stalder *et al.* 2014 ont trouvé une plus grande diversité des cassettes de gènes des IM1 dans les effluents urbains par rapport aux effluents hospitaliers. La diversité des cassettes génétiques dans les effluents hospitaliers était faible mais une plus grande diversité a été rapportée le long du flux d'eaux usées sous la pression de sélection des antibiotiques (Stalder *et al.* 2014). En revanche, Buelow *et al.* 2020 et Laquaz *et al.* 2018 ont trouvé une abondance des IM1 supérieure dans les effluents de STEUs hospitalières par rapport aux effluents de STEUs urbaines (Laquaz *et al.* 2018 ; Buelow *et al.* 2020). En revanche, l'enrichissement des sols en IM1 est rapporté dans le cas d'application du fumier d'animaux d'élevage (Stalder *et al.* 2014) mais cependant n'était pas retrouvé dans le cas d'irrigation par les effluents de STEUs (Marano *et al.* 2019). Les cassettes de gènes portés par les IM 1 détectées par Tchuinte *et al.* 2016 codent pour des  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>OXA-368</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub> et *bla*<sub>GES-1</sub>) et des enzymes modifiant les aminosides (*aac(6')-Ib* et *aadA1*) (Tchuinte *et al.* 2016).

Une grande partie des IMs ont une intégrase non fonctionnelle ce qui limiterait, selon Stalder *et al.* 2014, leur rôle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement du fait de la stabilité du réseau de cassettes. Chaturvedi *et al.* 2021 démontrent le portage des gènes *intI1* et *intI2* par des bactéries multi résistantes isolées dans des échantillons de fleuves anthropisés à différentes conditions climatiques ; ces intégrons étaient associés aux gènes de résistance, au triméthoprimine (*dfrA*), au sulfonamide (*sul1*, *sul2*), aux aminosides (*aac(60)-Ib-cr*, *aph(30)-IIIa*), aux  $\beta$ -lactamines (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>), aux tétracyclines (*tetM*), aux macrolides (*ermB*), et aux quinolones (*qnrS*) (Chaturvedi, Singh, et al. 2021).

Tchuinte *et al.* 2016 démontrent une abondance élevée des IM3 dans les effluents d'hôpitaux et les échantillons de boue activée en provenance de STEUs urbaines (Tchuinte *et al.* 2016). Par comparaison, les IM3 n'ont pas été détectés par Um *et al.* 2016 chez les bactéries *Escherichia coli* multi résistantes isolées dans leur étude menée au niveau d'effluents de deux abattoirs en France (Um *et al.* 2016). Les cassettes de gènes de résistance à la triméthoprimine, aux aminosides, aux  $\beta$ -lactamines et au chloramphénicol (*dfrA1-aadA1*,

*dfrA17-aadA5*, *dfrA16-blaCARB2-aadA2-cm1A1*, *aadB-aadA1-IS*) ont été associées aux IM1 et les cassettes de gènes de résistance au chloramphénicol et à la streptothricine (*dfrA-sat2*, *estX-sat2* et *estX-sat2-aadA1*) ont été associées aux IM2 (Um *et al.* 2016).

L'utilisation d'un outil en ligne gratuit, nommé « IntegronFinder » ([http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::integron\\_finder](http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::integron_finder)), permet, à partir de séquences la caractérisation, l'analyse de la distribution et de la diversité des intégrons. IntegronFinder permet l'identification des intégrons et leurs composants comme les sites *attC*, *attI*,  $P_{\text{inti}}$  et  $P_C$  ainsi que les gènes associés avec une bonne sensibilité et spécificité (Cury *et al.* 2016).

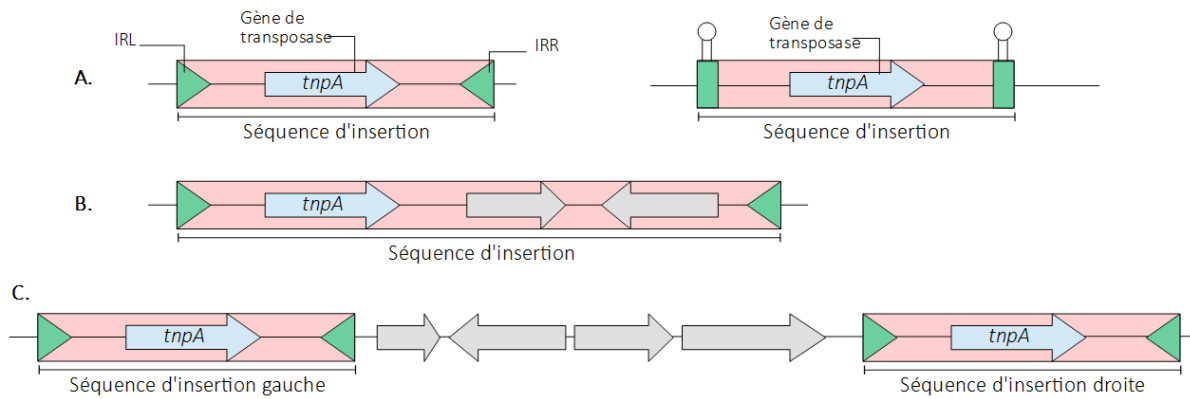
### **2.3.2.2. Les éléments transposables (TEs)**

Les éléments transposables sont situés au sein de plasmides, du chromosome bactérien et peuvent intégrer d'autres TEs (Levy and Marshall 2004). Les TEs sont dits mutagènes bactériens (Vandecraen *et al.* 2017) car ils sont responsables de pertes et gains de séquences du génome de l'hôte (Zeng *et al.* 2018) permettant une adaptation aux défis environnementaux et la colonisation de nouvelles niches (Vandecraen *et al.* 2017).

#### **Les structures des éléments transposables**

Les TEs se divisent en trois groupes suivant les motifs de sites actifs de transposases (enzymes permettant la mobilisation des TE) : DDE (Asp, Asp, and Glu), DEDD et HUH (deux résidus His séparés par un acide aminé hydrophobe) (Siguier, Goubeyre, and Chandler 2017). La classification est aussi basée sur le type de transposition : conservative ou répllicative.

Les séquences d'insertion (ISs) sont les structures les plus simples parmi les TEs et sont en général de petits EGMs portant un ou deux gènes de transposase essentiels pour leur mobilité (*tnp*) (Vandecraen *et al.* 2017). Les transposons composites sont constitués par deux ISs bordant un ou plusieurs gènes de résistance. Les TEs se mobilisent spécifiquement ou arbitrairement vers de nouvelles localisations (Vandecraen *et al.* 2017). La structure de ces éléments est représentée dans la figure 6.



**Figure 6: Schéma modifié représentant des séquences d'insertion et des éléments transposables** (Lallement 2018)

A et B : trois types d'IS sont représentés avec des séquences longues répétitives aux extrémités en vert (inversées ou non inversées) avec un gène de transposase *tnpA* en bleu. C : transposon composite comprenant deux copies d'IS aux extrémités. Les gènes d'autres fonctions ou de fonctions inconnues sont représentés en gris.

Des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques et de métaux traces (zinc, cadmium) peuvent induire la transposition de certaines ISs (Vandecraen *et al.* 2017). Les extrémités des ISs de type DDE sont délimitées en général par des séquences répétées terminales inversées ( $IR_R$ ) et ( $IR_L$ ) orientées par rapport au sens de la transcription du gène *tnp*, et sont les sites de liaison de la transposase (Siguier, Gourbeyre, and Chandler 2017). La transposition crée souvent des séquences répétées (DR), appelées aussi duplication site-spécifique (TSD) pouvant subir des délétions lors de transpositions (Partridge *et al.* 2018). Les ISs peuvent dans certains cas posséder un promoteur fort, et l'insertion d'une IS par exemple en amont d'un gène chromosomique intrinsèque peut influencer l'expression du gène, par exemple augmenter la résistance à un antibiotique (Partridge *et al.* 2018). Les impacts de l'insertion des éléments ISs sont nombreux et comprennent entre autres : l'inactivation des systèmes de transport d'antibiotiques, l'inactivation des gènes produisant les cibles bactériennes d'antibiotiques, l'induction de la formation de biofilms (Vandecraen *et al.* 2017), la modulation de l'expression de gènes par intégration au niveau de régions régulatrices ou codantes (Zeng *et al.* 2018), l'induction de recombinaisons (Jangam, Feschotte, and Betrán 2017), etc... Les délétions lors de transposition sont souvent décrites et permettent d'éliminer des gènes redondants ou métaboliquement coûteux et/ou d'exprimer des gènes suite à la création de promoteurs hybrides (Partridge *et al.* 2018)(Albalat and Cañestro 2016). La

dénomination des ISs comprenait initialement un nombre (ex: IS26) mais a évolué et maintenant comporte systématiquement l'espèce chez qui cela a été identifié en premier suivi par un nombre (Rahman and Roberts 2019) (ex : IS*Kpn5* chez *Klebsiella pneumoniae*).

Les transposons composites mobilisent des gènes de résistance au sein d'une région délimitée par deux copies d'ISs identiques ou proches ayant la même orientation (Siguié, Gourbeyre, and Chandler 2017). Une IS seule mobilisant une région adjacente contenant des gènes de résistance peut être rencontrée surtout chez les bactéries à Gram négatif (Harmer and Hall 2019).

Lorsque les TEs sont bordés par deux ISs, un code pour une transposase fonctionnelle et l'autre pour une transposase tronquée jouant le rôle de régulatrice (Zeng *et al.* 2018).

Les différentes familles d'ISs, les éléments constituant ces familles, le mode de transposition et les GRAs associés sont résumés dans l'annexe 1.

### **Les TEs investigués dans les études environnementales**

L'abondance relative de marqueurs de TEs (Tn3, ISS1N, ISC9c, Tp614, IS613) est mesurée dans de nombreuses études métagénomiques de systèmes hydriques, STEUs et eaux de surface afin d'évaluer et de surveiller l'évolution de la résistance (Buelow *et al.* 2020) ; (Lekunberri, Balcázar, and Borrego 2018 ; Godbole *et al.* 2018 ; H. Huang *et al.* 2019 ; Nagata *et al.* 2019). À titre d'exemple, Peng *et al.* 2019 identifient une forte corrélation entre des TEs (Tp614, *tnpA-03*, *tnpA-05*, et *tnpA-07*) et les gènes de résistance aux aminosides, chloramphénicol, streptogramine, lincosamide, macrolides, tétracycline et aussi de multirésistance dans le fleuve Houxi en Chine au niveau d'une zone urbaine (Peng *et al.* 2019). Pareillement, une corrélation positive est retrouvée dans l'étude de Yu *et al.* 2016 investiguant les gènes de résistance dans l'eau de STEUs entre les gènes *intl1*, *tnp* et les GRAs (Yu *et al.* 2016).

### **2.3.2.3. Les plasmides : structures, familles et détection dans l'environnement**

Les plasmides sont des éléments génétiques majoritairement circulaires, capables d'auto-réplication (Hülter *et al.* 2017). Ils jouent un rôle primordial dans la dissémination et l'évolution de la résistance aux antibiotiques principalement au travers de transferts horizontaux (San Millan *et al.* 2016 ; Ramsay and Firth 2017). Ces éléments de tailles variables, chimériques et modulaires, échangent du matériel génétique avec d'autres EGMs et peuvent même intégrer le chromosome bactérien (Jesus *et al.* 2019). Dans les environnements anthropisés, leur plasticité contribue à la grande dynamique des communautés bactériennes, et permet leur évolution en véhiculant des fonctions essentielles de viabilité/persistance lorsque les conditions de survie sont limitées (Hülter *et al.* 2017 ; Jesus *et al.* 2019). Les niveaux d'expression et fréquences de mutations augmentent avec le nombre de copies à l'intérieur de la cellule bactérienne (San Millan *et al.* 2016).

Les éléments conjugatifs (plasmides conjugatifs et éléments intégratifs conjugatifs (ICEs)) comportent des gènes codant pour un appareil d'appariement (Mpf) initiant la conjugaison entre les cellules donneuses et réceptrices ainsi que des gènes codant pour un pont de couplage (CP) entre les deux. Une région de transfert d'ADN (*dtr*) comprend un site *oriT* (origine de transfert) initiant le transfert de l'ADN suite à la reconnaissance par une relaxase. Les plasmides mobilisables non conjugatifs utilisent l'appareil conjugatif (Mpf) (Ramsay and Firth 2017 ; Ghaly and Gillings 2018).

Deux classifications permettent le suivi épidémiologique des plasmides : taxonomique et épidémiologique (Fernandez-Lopez *et al.* 2017). La classification épidémiologique permet le suivi des épidémies, détecte les expansions clonales et permet de faire la distinction entre les différentes souches bactériennes qui les portent (Fernandez-Lopez *et al.* 2017). La classification taxonomique fournit des informations phylogénétiques et fonctionnelles (Fernandez-Lopez *et al.* 2017).

Le premier typage des plasmides établi par Datta et Hedges en 1971 a permis l'organisation des plasmides en différents groupes phénotypiques (Inc) sur la base de l'incompatibilité de co-résidence au sein d'un même hôte (Datta and Hedges 1971). Les membres d'un même groupe Inc partagent une identité de séquence, d'où la classification distincte à l'époque en 5 groupes (IncP, IncN, IncI, IncW et IncF) suivie de 23 groupes (B, C, D, E, FI, FII, FIII, FIV, H, I $\alpha$ , I $\beta$ , I $\gamma$ , I $\delta$ , I $\zeta$ , J, K, M, N, P, T, V, W et X) (Rozwandowicz *et al.* 2018).

Une deuxième classification plus courante, Inc/rep, concerne les plasmides conjugatifs uniquement et est basée sur le typage de la protéine de réplication (Couturier *et al.* 1988). La relaxase conjugative requise pour l'initiation de la mobilisation des plasmides conjugatifs est aussi utilisée comme marqueur robuste et universel d'évolution à la fois des plasmides mobilisables et conjugatifs et a permis de distinguer huit classes différentes de mobilité, chacune divisée en familles (Fernandez-Lopez *et al.* 2017).

Les plasmides des groupes IncP-1 ou korB, IncN, IncQ, et IncW sont échangés entre un large panel d'hôtes éloignés phylogénétiquement et l'abondance de leur portage est en rapport avec la pollution environnementale par les antibiotiques (González-Plaza *et al.* 2019). Leur investigation et celle de IncP-1 en particulier (porteur de gènes de multi-résistance) en milieu environnemental est révélatrice du niveau de dissémination des GRAs (González-Plaza *et al.* 2019). Les environnements récepteurs d'effluents d'industries de production d'antibiotiques sont fortement enrichis en plasmides IncP-1 comme le démontrent Šimatović et Udiković-Kolić 2019 qui ont étudié l'impact des effluents d'une industrie de production d'azithromycine sur le fleuve Saga en Croatie (Šimatović and Udiković-Kolić 2019). L'augmentation significative au niveau des effluents de STEUs a été démontrée et cette mesure est maintenant adoptée pour surveiller l'efficacité des systèmes de traitements des eaux de rejets (Pallares-Vega *et al.* 2019).

### **3. Exploration du résistome environnemental**

Les environnements pollués par les rejets industriels d'antibiotiques présentent la plus grande abondance et diversité de GRAs, suivis par les effluents de STEUs et enfin l'environnement (Pal *et al.* 2016). La dissémination de la résistance est plus faible dans les pays à revenu faible et moyen par rapport aux pays à revenu élevé mais les facteurs à l'origine de cette dissémination sont moins bien analysés (Vikesland *et al.* 2019). En l'absence de réglementations ou de protocoles standards pour mesurer la dissémination de la résistance aux agents antimicrobiens dans les eaux de surface (Andrade *et al.* 2020), diverses techniques ont été utilisées dans la littérature. La combinaison d'approches offre une meilleure possibilité de compréhension des communautés microbiennes complexes (de Muinck *et al.* 2017).

### 3.1. Les méthodes standards de culture

L'analyse des profils phénotypiques réalisés par les méthodes de culture standard fournissent des informations considérables concernant le métabolisme, les conditions physico-chimiques de croissance, la capacité de formation de biofilm, la sporulation, et la tolérance aux conditions stressantes (Manaia *et al.* 2018). Cette mise en évidence de l'expression des gènes actifs n'est pas toujours possible avec les méthodes moléculaires qui ne sont pas toujours révélatrices de l'expression des gènes (Bondarczuk, Markowicz, and Piotrowska-Seget 2016). La co-résistance d'antibiotiques et de métaux traces est aussi recherchée à travers la supplémentation des milieux de culture avec des antibiotiques et métaux (Bondarczuk, Markowicz, and Piotrowska-Seget 2016). Le dénombrement des cellules viables et l'évaluation des profils de résistance aux antibiotiques sont aussi effectués par ces méthodes (Bondarczuk, Markowicz, and Piotrowska-Seget 2016 ; Manaia *et al.* 2018). Ceci facilite l'analyse des GRAs/EGMs associés, et identifie les espèces ayant un rôle clé dans la propagation de gènes étudiés (Manaia *et al.* 2018).

Le résistome environnemental, les phénotypes et les déterminants génétiques de la résistance ont longtemps été évalués par ces techniques de cultures (K. Lee *et al.* 2020). Ils ont rendu possible une évaluation du potentiel de transfert des gènes de BRAs dans les conditions environnementales (Manaia *et al.* 2018). La culture des bactéries pathogènes éventuellement caractérisées sur milieu sélectif, la corrélation des phénotypes de résistance avec leurs hôtes et l'analyse du risque sur la santé humaine sont rigoureusement établis par cette approche (Bondarczuk, Markowicz, and Piotrowska-Seget 2016).

Plusieurs bactéries cultivables ont été suggérées pour surveiller l'antibiorésistance à l'échelle mondiale. Un plan d'action mondial de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour lutter contre la résistance aux agents antimicrobiens, recommande la surveillance d'*Escherichia coli* sécrétrice de BLSE, candidat potentiel parmi une liste de priorité (Pal *et al.* 2016). Celle-ci, établie par l'OMS sur la base de virulence et de résistance d'agents bactériens, comprend: *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* résistant aux carbapénèmes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) productrices de BLSE, *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (OMS 2017).

L'émergence et la dissémination des bactéries productrices de BLSE et/ou résistantes aux carbapénèmes dans l'environnement devraient continuellement être surveillées (Bai *et al.* 2019). Les méthodes de culture standard d'*Escherichia coli* sécrétrice de BLSE, sont disponibles dans les pays à revenu bas, moyen et élevé, ce qui permet de comparer son occurrence entre les pays, dans l'environnement, ou avec les résultats d'analyse de la qualité microbiologique alimentaire et celles d'échantillons cliniques (Pal *et al.* 2016). Des procédures normalisées pour le contrôle de la qualité de l'eau, sont proposées pour élaborer des lignes directrices de surveillance de la résistance aux agents antimicrobiens en milieu aquatique sur la base de valeurs limites épidémiologiques (ex : ECOFF) (Manaia *et al.* 2018 ; WHO, Global tricycle surveillance 2021). Les méthodes de culture peuvent être utilisées seules pour la surveillance de l'antibiorésistance en évaluant le rapport de BRAs sur le nombre total de bactéries, dans des milieux complémentés et non complémentés d'antibiotiques (Manaia *et al.* 2018).

La prévalence de certains GRAs émergents conférant une résistance aux antibiotiques de dernier recours et de certaines BRAs pathogènes (ex : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, Enterobacterales productrices de carbapénémases, *Aeromonas spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, etc...) est extrêmement faible dans les échantillons environnementaux mais néanmoins préoccupante surtout parce qu'elle est négligée dans les études (Manaia *et al.* 2018) (Fang *et al.* 2018). Ces BRAs pathogènes et leurs gènes de résistance sont considérés comme des indicateurs de la résistance dans l'eau (Manaia *et al.* 2018). Leur détection dans les études environnementales a été effectuée par une combinaison de méthodes : culture sous pression sélective (en présence de l'antibiotique qui confère la résistance), méthodes moléculaires ciblées comme la qPCR (Fang *et al.* 2018 ; Manaia *et al.* 2018), et/ou méthodes de séquençage à haut débit (Fang *et al.* 2018 ; Manaia *et al.* 2018 ; Bae *et al.* 2019). Par exemple, l'analyse de l'évolution des groupes métaboliques ayant été favorisés ou défavorisés pendant le traitement des eaux de rejet a été effectué par des méthodes de culture associées à des méthodes métagénomiques (Manaia *et al.* 2018).

La détermination de l'identité spécifique des hôtes pathogènes porteurs de GRAs est idéale pour la surveillance des risques sur la santé publique (Anthony *et al.* 2019). La culturomique impliquant des méthodes de culture à haut débit permet de pallier aux longs



délais des cultures standards et à la nécessité de procédures de sécurité adéquates pour éviter les contaminations biologiques (Manaia *et al.* 2018).

La mesure de l'abondance en pathogènes comme *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* entéropathogénique (portant le gène *eaeA*), *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* (productrice de Shiga-toxine), *Shigella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Vibrio cholerae* et *Legionella pneumophila* dans les échantillons environnementaux, évalue le risque sur la santé suite à l'exposition à cette eau et identifie pour chacun les sources de pollution (zones industrielles, zones à proximité de fermes d'élevage ou zones d'agricultures, etc..) (Ahmed *et al.* 2018).

Cependant, les méthodes de culture standard ne sont pas adaptées pour explorer les bactéries environnementales non pathogènes qui sont en majorité non détectées par celles-ci (Vikesland *et al.* 2019) ou demeurent non-classées en genre bactérien (Pal *et al.* 2016).

### **3.1.1. La détection de bactéries résistantes aux antibiotiques par méthode culturale**

La détection et la quantification de BRAs par les méthodes de cultures sont considérées comme indicateur d'antibiorésistance environnementale (ANSES 2020 ; Martínez, Coque, and Baquero 2015). Ces méthodes sont basées sur la mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et du diamètre d'inhibition selon des recommandations internationales (Humphries and Hindler 2016). Des bactéries résistantes aux antibiotiques parfaitement caractérisées (ex : Enterobacterales et SARM) sont alors recherchées dans les échantillons environnementaux pour étudier le rôle des environnements naturels dans leur transmission à l'homme (Huijbers *et al.* 2015).

Une corrélation significative a été démontrée entre l'abondance relative de GRAs et des pathogènes humains résistants dans l'environnement, comme par exemple, *Escherichia coli* et *Klebsiella Pneumoniae* (Pärnänen *et al.* 2019) par la contamination fécale (Karkman *et al.* 2018). *Escherichia coli* est un indicateur fécal (Voigt *et al.* 2020). Son utilisation ainsi que celle des Enterobacterales comme marqueurs de la pression anthropique est liée à leur facilité de détection et au fait que certaines d'entre elles soient des agents de maladies humaines (Surette and Wright 2017). La détection d'*Escherichia coli* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EC-BLSE) et d'*Escherichia coli* productrices de céphalosporinase AmpC

(pAmpC-EC) à médiation plasmidique est en augmentation continue chez les animaux, dans les aliments, dans l'environnement et en clinique ; quoique les humains soient la principale source de portage d'EC-BLSE et d'pAmpC-EC, la propagation interhumaine à elle seule est peu susceptible d'entretenir leur transmission entre les différentes sources, d'où le besoin d'études longitudinales et d'une surveillance continue de ces pathogènes (Mughini-Gras *et al.* 2019) permettant d'évaluer l'ensemble des compartiments impactant la transmission. La méthodologie de leur détection par culture est standardisée, ce qui permet de comparer les résultats dans les différents compartiments de l'environnement à l'échelle mondiale et/ou avec des données chez l'homme et les animaux (WHO, Global tricycle surveillance 2021 ; ANSES 2020). Le groupe de travail et le comité d'experts spécialisés en eaux de l'ANSES recommandent la surveillance d'*Escherichia coli* résistante aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ou *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE au même titre que les gènes *int11* et *sul1*. La surveillance d'*Escherichia coli* résistante aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ou *Escherichia coli* BLSE pourrait être couplée avec la recherche de GRAs. La quantification absolue (UFC/L) ou relative (par rapport à la concentration d'*Escherichia coli* totaux) permet de déterminer la vulnérabilité du milieu et/ou les périodes ou zones à risque de contamination par les BRAs (ANSES 2020). La détermination par qPCR de leur abondance relative (copie du gène spécifique de la BRA recherchée/nombre de copies du gène de l'ARNr 16S) ou absolue (copie du gène spécifique de la BRA recherchée par litre pour les matrices liquides ou par g pour les matrices solides) est possible (ANSES 2020). De plus, Le couplage entre l'identification de bactéries résistantes pour la surveillance (K. Lee *et al.* 2020) et l'évaluation de la dissémination des GRAs, constitue un marqueur du potentiel de transmission du résistome entre les différents environnements posant le plus de risque de santé publique (Zhou *et al.* 2018 ; Pehrsson *et al.* 2016 ; Manaia 2017 ; Manaia 2017).

### **3.1.2. Les marqueurs viraux de contamination fécale**

La contamination fécale de l'environnement est surveillée par la recherche de germes bactériens indicateurs (tels que *Escherichia coli*) mais d'autres outils de surveillance de la contamination fécale sont proposés dans la littérature. Des virus entériques pathogènes à ADN, spécifiques d'hôtes, comme le polyomavirus humain et l'adénovirus ont été proposés comme marqueur anthropique mais leur prévalence, infectiosité et dissémination varient

entre les régions et leur détection est faible dans les fleuves (Ballesté *et al.* 2019). La prévalence et la stabilité des virus à ARN (norovirus et rotavirus) dans l'environnement sont encore plus faibles (Bivins *et al.* 2020 ; Sidhu *et al.* 2018). Le bactériophage « CrAssphage » et le « Torque Teno virus » (TTV) sont aussi proposés comme indicateurs de source de contamination fécale de la contamination microbienne de l'environnement et révélateurs de la contamination virale humaine.

### **Le CrAssphage : indicateur de contamination fécale et de pression anthropique**

Le crAssphage est identifié au sein de métagénomés fécaux humains (Karkman, Pärnänen, and Larsson 2019 ; Anthony *et al.* 2019 ; (Wu *et al.* 2020) et co occure avec les GRAs (Chen, Bai, Li, *et al.* 2019b) et donc suggère l'origine humaine de cette contamination dans les environnements impactés par les eaux de rejet (Bivins *et al.* 2020). Le crAssphage est ainsi utilisé au sein de stratégies de prévention et de contrôle de la dissémination des GRAs (Chen, Bai, Li, *et al.* 2019b) et est proposé comme outil de surveillance de l'efficacité des procédés de traitements des eaux (Wu *et al.* 2020). Plus abondant que les marqueurs viraux pathogènes et plus résistants aux paramètres environnementaux, le crAssphage présente aussi une meilleure performance en qPCR (Ballesté *et al.* 2019). Les analyses métagénomiques d'échantillons de fleuves et de sédiments montrant une forte corrélation entre crAssphage, GRAs, EGMs et *intl1*, suggèrent la contamination fécale humaine comme source primaire de dissémination de la résistance (Karkman, Pärnänen, and Larsson 2019 ; Chen, Bai, Li, *et al.* 2019b). Une faible abondance du crAssphage lorsque le dénombrement microbiologique des indicateurs fécaux bactériens est supérieur aux valeurs limites (Ahmed *et al.* 2018) ou lorsque l'abondance en GRAs est élevée (Karkman, Pärnänen, and Larsson 2019), serait expliquée par l'implication d'autres sources de contamination ou par une sélection directe de la résistance (Ahmed *et al.* 2018 ; Karkman, Pärnänen, and Larsson 2019). Les concentrations élevées de crAssphage associées à des précipitations météorologiques s'expliquent par la diffusion de l'eau en provenance de fosses septiques, l'intensification des déversements d'effluents de STEUs et/ou la mobilisation des sédiments - réservoirs de contaminants microbiens fécaux (Ballesté *et al.* 2019).

Les principaux enjeux de l'utilisation du crAssphage comme indicateur de source microbiologique sont l'efficacité limitée des méthodes de concentration du bactériophage et

les paramètres d'inactivation durant les saisons chaudes : irradiation, chaleur et activité supérieure des prédateurs (protozoaires et bactéries) (Ballesté *et al.* 2019).

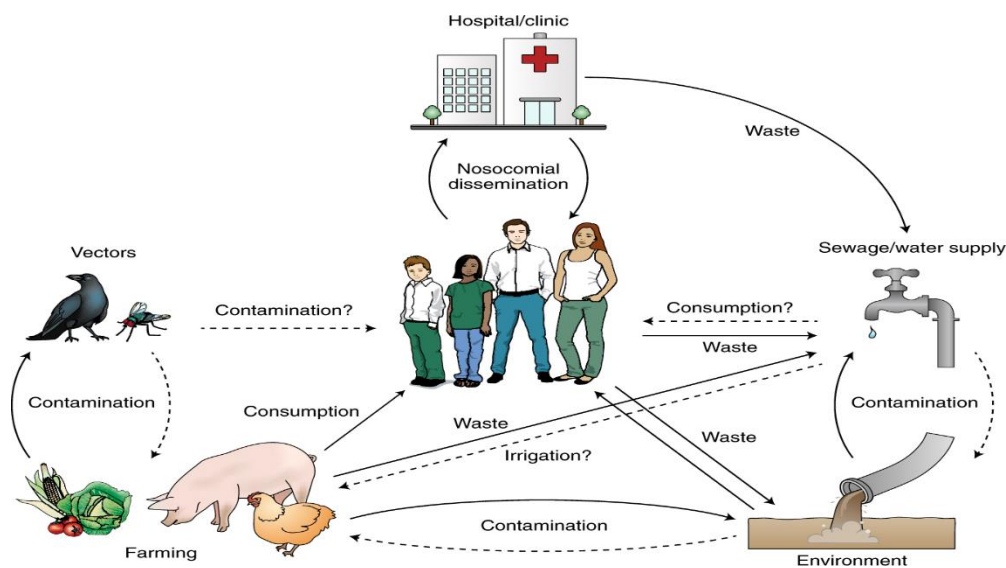
### **Le Torque Teno Virus : deuxième indicateur de contamination fécale**

Le TTV fait partie des petits virus à ADN simple brin et antisens de la famille des *Anelloviridae* constituant la plus grande fraction du virome sanguin (70%) (Focosi *et al.* 2016). La divergence des séquences du TTV est inégalement répartie sur le génome et présente au moins 4 cadres de lecture ouverts (ORF1 possède une région hypervariable) riche en GC. Une région non traduite (UTR) contient plusieurs séquences hautement conservées (plus de 90% d'identité), contrairement à la région traduite caractérisée par un haut niveau de diversité. La prévalence extrêmement élevée du TTV (95%) au niveau de la population mondiale, indépendamment de l'âge, des conditions socioéconomiques et de santé font qu'il soit proposé comme indicateur de la contamination fécale et de la qualité de l'eau dans les industries de l'eau (Bivins *et al.* 2020 ; Sidhu *et al.* 2018 ; Focosi *et al.* 2016). Le TTV humain s'est avéré utile comme marqueur pour la détection de la pollution fécale d'origine humaine (Focosi *et al.* 2016). Parmi les différentes régions ciblées du génome par qPCR, un petit segment hautement conservé de la région 5' non traduite (UTR) est une région qui peut être amplifiée chez toutes les formes génétiques du virus (Kulifaj *et al.* 2018 ; Ssemadaali *et al.* 2016). La détection du TTV pour déterminer l'efficacité des traitements des eaux, sa large prévalence (38 à 100% dans les eaux de rejets et 5 à 12% dans l'eau potable), et ses caractéristiques d'ubiquité font du TTV un modèle idéal pour les études environnementales de survie et de dissémination (Focosi *et al.* 2016).

#### **4. L'approche « One Health »**

L'augmentation et la constante évolution de l'antibiorésistance nécessitent une surveillance systématique de celle-ci pour évaluer le risque sur la santé et pour proposer notamment des actions correctives des systèmes de santé. La résistance aux antimicrobiens est un problème inter-disciplinaire dans lequel la santé humaine, la santé animale (élevage et vétérinaire) et l'environnement sont les composantes essentielles et interdépendantes (Tiedje *et al.* 2019 ; Amarasiri, Sano, and Suzuki 2019).

Les interactions entre les micro-organismes sont synthropiques (symbiose, stimulation de la croissance, libération des nutriments à partir des formes complexes, consommation d'oxygène), compétitives (pour les nutriments ou l'espace) ou antagonistes (production de substances inhibitrices de croissance)(Surette and Wright 2017). La résistance au sein des microbiomes humains, animaux et environnementaux interagit au-delà de la seule perspective clinique (Surette and Wright 2017). Ainsi, l'analyse et l'étude de la résistance aux antimicrobiens nécessite une approche multisectorielle impliquant des experts de la santé humaine, animale et environnementale (Van Puyvelde, Deborggraeve, and Jacobs 2018). De cette façon, tous les vecteurs (humains et animaux) et les transporteurs (eau, sol et chaîne alimentaire) favorisant le transfert de la résistance aux antimicrobiens entre micro-organismes sont pris en compte dans l'étude de l'évolution et de la dynamique de la résistance (Vikesland *et al.* 2019 ; Mills and Lee 2019). Le défi que l'action collective mondiale devra relever est de prendre aussi en compte les différents facteurs (politiques, socioéconomiques) intervenant dans la dissémination de la résistance dans chaque pays (Vikesland *et al.* 2019). Ainsi, des collaborations de recherche multisectorielles sont encouragées dans une approche « One Health » de lutte contre la résistance aux antibiotiques (Cars *et al.* 2016). Dans cette approche, un travail à l'échelle locale, régionale, nationale et mondiale prendrait en compte les humains, les animaux, et l'environnement représentés dans la figure 7 (Van Puyvelde, Deborggraeve, and Jacobs 2018 ; Vikesland *et al.* 2019).



**Figure 7: Représentation des voies de transmission de la résistance aux agents antimicrobiens entre l'homme, l'animal et l'environnement (Walsh 2018)**

Les effluents de STEUs et d'hôpitaux, l'élevage animal, l'agriculture et le cycle de l'eau potable constituent des sources de BRAs et de GRAs. L'antibiorésistance peut être transmise au niveau de différentes interfaces et peut faire intervenir des vecteurs comme les insectes.

**4.1. L'antibiorésistance au niveau du microbiote humain**

La microflore humaine comprend des milliers d'espèces codant plus de 3.3 milliards de gènes, soit 150 fois plus que le génome humain. La composition du microbiote intestinal en terme d'espèces varie en fonction des zones géographiques, modes de vie, âges et autres facteurs (Jin *et al.* 2017). L'exposition passive et/ou chronique du microbiote humain aux antibiotiques et polluants environnementaux (ex : pesticides), entraînent une dysbiose du microbiote et la prolifération de microorganismes résistants et pathogènes (Holmes *et al.* 2016 ; Jin *et al.* 2017).

**4.2. La résistance au niveau du microbiote animal**

Les profils de résistance aux antibiotiques des coliformes isolés des animaux sauvages en l'absence de sélection directe ou de résistance cliniquement pertinente varie entre les pays et les zones géographiques (Surette and Wright 2017). Les données sur la faune sauvage ne sont pas nombreuses cependant les animaux sauvages terrestres omnivores ou carnivores sont plus contaminés par les BRAs que les herbivores (ANSES 2020). L'antibiorésistance résistance chez ces animaux ainsi que chez les oiseaux marins augmente au fur et à mesure de la proximité avec les hommes (Roberts 2018 ; Surette and Wright 2017 ; ANSES 2020). La présence des BRA dans la faune sauvage aquatique ou terrestre est de même corrélée à la proximité de zones anthropisées (ANSES 2020). Les oiseaux et les insectes sont impliqués dans le transfert de BRAs des milieux agricoles, zones polluées ou fosses septiques vers les environnements naturels de ces animaux (Roberts 2018 ; Surette and Wright 2017).

En plus de la densité de la population humaine vivant à proximité des animaux, les facteurs écologiques notamment, les variations de saisons et l'intensité de l'agriculture animale (Surette and Wright 2017), affectent la dissémination des bactéries entériques au sein des populations animales (Surette and Wright 2017). En effet, l'influence du climat (notamment l'élévation de la température) sur l'augmentation du niveau de résistance des

souches cliniques d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de la majorité des classes d'antibiotiques a bien été démontrée (MacFadden *et al.* 2018).

L'administration d'antibiotiques comme facteur de croissance animale, en prophylaxie chez les animaux d'élevage et en médecine vétérinaire dépasse l'utilisation en médecine humaine (Moore 2019 ; Van Puyvelde, Deborggraeve, and Jacobs 2018). Des mesures d'interdiction de certaines utilisations des antibiotiques, comme celles appliquées en Europe depuis 2006 à l'élevage animal, ou l'interdiction de leur vente libre sans prescription aux États-Unis depuis 2017 permettent de diminuer la résistance aux antibiotiques (Van Puyvelde, Deborggraeve, and Jacobs 2018 ; Hudson *et al.* 2017).

L'homme peut acquérir également des BRAs et les GRAs correspondants par contact avec les animaux de compagnie porteurs ou infectés par des BRAs. La transmission des SARM, Enterobacterales et bactéries à Gram négatif non fermentaires résistantes sont transmises entre l'homme et son animal de compagnie (Pomba *et al.* 2017).

#### **4.3. La résistance au niveau du microbiote environnemental**

Si la surveillance de l'antibiorésistance chez l'homme et les animaux a débuté depuis une trentaine d'années, celle de l'environnement est plus récente (Huijbers, Flach, and Larsson 2019). Les conditions de croissance et de proximité entre les micro-organismes sont responsables chez les bactéries environnementales de profils de multi-résistance par mécanismes d'efflux essentiellement suivis par l'inactivation enzymatique ( $\beta$ -lactamases par exemple)(Surette and Wright 2017). Les densités bactériennes globales des fleuves, sédiments, lacs et systèmes marins sont plus faibles par rapport à celle du sol (Surette and Wright 2017) mais plus propices au développement de résistances (Amarasiri, Sano, and Suzuki 2020). Les particules de poussière et autres aérosols de l'air disséminent aussi des BRAs comme le montre l'exploration d'échantillons atmosphériques (Mao *et al.* 2019 ; Surette and Wright 2017). La charge environnementale est cependant plus élevée dans les établissements d'élevage et à l'intérieur des STEUs, environnements favorables à l'accumulation et l'expansion d'EGMs (Surette and Wright 2017 ; Uhrbrand *et al.* 2017). Quelques études récentes avec des résultats variables évaluent la transmission de bactéries multirésistantes, pathogènes (ex : *Klebsiella pneumoniae* et Enterobacterales résistantes) ou

environnementales des eaux de surface aux humains et l'impact potentiel sur la santé publique (Voigt *et al.* 2020).

## **5. Les résistances les plus étudiées en milieu environnemental**

L'abondance et la diversité des BRAs/GRAs, EGMs et antibiotiques est spécifique de chaque niche écologique et varient en fonction de plusieurs facteurs comme les saisons et l'abondance en nutriments et contaminants (Anthony *et al.* 2019). La plupart des enquêtes sur les GRAs et les phénotypes de bactéries environnementales non pathogènes des eaux de surface identifient des gènes d'efflux, de  $\beta$ -lactamases et d'enzymes modifiant les aminosides (Anthony *et al.* 2019). Ceux-ci sont aussi les premiers éléments de résistance retrouvés sur les EGMs des bactéries pathogènes (Surette and Wright 2017).

### **5.1. L'inactivation des antibiotiques**

La surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement est majoritairement basée sur l'investigation du niveau de contamination par les GRAs (Wu *et al.* 2020 ; Zhang *et al.* 2020 ; Buelow *et al.* 2020 ; Chen *et al.* 2021). Les GRAs les plus investigués dans les études de surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement et conférant la résistance aux familles d'antibiotiques majeures sont présentés ci-après.

#### **5.1.1. Les $\beta$ -lactamases**

Hydrolysant la famille antibiotique des  $\beta$ -lactamines, les gènes de  $\beta$ -lactamases sont les plus largement distribués de tous les GRAs (Roberts 2018). Des mutations variées modifient le spectre de la résistance aux différentes classes de  $\beta$ -lactamines (Gullberg *et al.* 2014) ; ceci permet une différenciation en quatre groupes: les pénicillinases, céphalosporinases,  $\beta$ -lactamases à spectre étendu et carbapénémases (Bush, Jacoby, and Medeiros 1995).

Les pénicillinases *bla*TEM, *bla*SHV et *bla*Z sont des gènes horizontalement transférables et confèrent une résistance à spectre étroit aux  $\beta$ -lactamines (Cafini, Romero, and Morikawa 2017).



Les gènes de céphalosporinases *ampC* sont horizontalement transférables et codent pour l'hydrolyse des pénicillines et céphalosporines, y compris de 3<sup>ème</sup> génération (Thomson 2010 ; acoby 2009 ; Philippon, Arlet, and Jacoby 2002). Différents types se distinguent : *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>DHA</sub>*, *bla<sub>ACT</sub>*, *bla<sub>ACC</sub>*, *bla<sub>MIR</sub>*, *bla<sub>MOX</sub>*, *bla<sub>FOX</sub>* et *bla<sub>CFE</sub>* (Coolen *et al.* 2019).

Les BLSE hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception des carbapénèmes et céphamycines (ex : céfoxitine), et sont inactivées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam et avibactam) (Tooke *et al.* 2019).

La résistance aux carbapénèmes est médiée principalement par les gènes fortement mobiles de carbapénémases type *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* et *bla<sub>OXA</sub>* (Coolen *et al.* 2019).

La classification moléculaire d'Amber, basée sur des homologies de structures des  $\beta$ -lactamases distingue 4 classes de  $\beta$ -lactamases : A, B, C et D, dont 3 sont composées de sérines-protéases (A,C,D) et une (B) étant composée de métallo-protéases (Tooke *et al.* 2019) (Lima *et al.* 2020). Les BLSE, céphalosporinases et pénicillinases font toutes partie de la classe A et sont essentiellement d'origine plasmidique ; les carbapénémases KPC, SME, GES et NMC font aussi partie de la classe A (Nagshetty *et al.* 2021). Les carbapénémases NDM, IMP, VIM font partie de la classe B. La classe C comporte les *ampC* et la classe D comporte les oxacillinases OXA dont certaines sont des carbapénémases (Nagshetty *et al.* 2021).

#### Au niveau de l'environnement :

Les gènes de  $\beta$ -lactamase sont identifiés dans des environnements non anthropisés, ce qui suggère leur occurrence de manière ubiquitaire dans la nature comme pour le cas de *bla<sub>CTX-M</sub>* retrouvés chez *Kluyvera spp.* environnementale (Humenuik *et al.* 2002) ; Roberts 2018 ; Gullberg *et al.* 2014). Ces gènes codés par des bactéries environnementales devenues pathogènes opportunistes, se sont mobilisés surtout chez les bactéries à Gram négatif isolées en milieu clinique (Gullberg *et al.* 2014 ; Roberts 2018). Les gènes *ampC* chromosomiques ou plasmidiques sont investigués dans les fleuves, lacs, eaux souterraines et océans ; la famille *ampC<sub>CMY-2</sub>* est la plus fréquemment isolée (Andrade *et al.* 2020). Une mutation du gène *ampC* induit sa surexpression, confère une résistance aux carbapénèmes et est devenu épidémique, isolé dans les environnements aquatiques (Roberts 2018). Les BLSE regroupent des variants

des gènes de pénicillinases *bla*<sub>TEM</sub> et *bla*<sub>SHV</sub>, et les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>VEB</sub> et *bla*<sub>GES</sub>, tous investigués dans les études épidémiologiques de fleuves (Zarfel *et al.* 2017 ; Said *et al.* 2016). Les gènes de carbapénémases les plus investigués et détectés dans les échantillons environnementaux (STEU, eaux de surface) sont : *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, *bla*<sub>SME</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, souvent associés au sein d'un même plasmide à au moins un des gènes circulant en clinique (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> et *bla*<sub>VIM</sub>) (Mills and Lee 2019 ; Van Puyvelde, Deborggraeve, and Jacobs 2018).

### 5.1.2. Les enzymes modifiant les aminosides

Ces antibiotiques inhibent la synthèse bactérienne de protéines en établissant des liaisons avec la sous-unité 30S ribosomale (Singh, Young, and Silver 2017). L'un des mécanismes de résistance acquise est la modification enzymatique de l'antibiotique diminuant son affinité et l'altération de son site d'action (Krause *et al.* 2016).

Plus de 100 enzymes modifiant les aminosides sont décrites, souvent retrouvées associées à des plasmides et classifiées en trois groupes sur la base de leur capacité à acétyler, phosphoryler, ou adényler les groupements amine ou hydroxyle différemment positionnés au niveau des aminosides (Krause *et al.* 2016). Ces trois classes : aminoglycoside N-acétyltransférases (AACs), aminoglycoside O-nucleotidyltransférases (ANTs), et aminoglycoside O-phosphotransférases (APHs) se divisent en sous-types selon le positionnement du groupement cible de l'aminoside (Krause *et al.* 2016).

#### Au niveau des compartiments aquatiques de l'environnement :

Les fleuves et autres environnements aquatiques font l'objet de recherche extensive de gènes de résistance aux aminosides (Dang *et al.* 2017 ; Anthony *et al.* 2019 ; Wu *et al.* 2020 ; Chen, Bai, Jing, *et al.* 2019). À titre d'exemple : *aadA1* dans les eaux souterraines et eaux de surface (D.-L. Wu *et al.* 2020), *aac6i*, *aadA2*, *ant2ia* et *aph6id* au niveau de sédiments d'un espace aquatique destiné à l'aquaculture (Chen *et al.* 2018) et *aph(3'')* et *aac(6')-Ib9* dans les eaux de surface et recevant les effluents de STEUs (Ng *et al.* 2017) sont décrits. Le gène *aadA*, parmi d'autres, non détecté à l'entrée d'une STEU, apparaît à la sortie dans l'étude de Thornton *et al.* 2020 reflétant la non adéquation des traitements actuels pour l'élimination de ce gène.

### 5.1.3. Streptogramine, lincosamide, macrolides (SLM) et Chloramphénicol

Ces antibiotiques altèrent et modulent la traduction en protéines suite à la liaison avec la sous-unité 50S de l'ARNr 16S (Vázquez-Laslop and Mankin 2018 ; Schwarz *et al.* 2016). Les SLM sont essentiellement actifs sur les bactéries à Gram positif bien que les cocci à Gram négatif (*Neisseria gonorrhoea*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* et *Neisseria meningitis*) rentrent dans le spectre d'action des macrolides (Dinos 2017 ; Schwarz *et al.* 2016). Le chloramphénicol agit sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Schwarz *et al.* 2016) et est inactivé par une chloramphénicol-O-acétyltransférase (Schwarz *et al.* 2016). Un grand nombre de gènes de résistance à ces antibiotiques sont localisés sur des EGMs (Schwarz *et al.* 2016). La contamination environnementale par ces gènes de résistance est investiguée dans les fleuves recueillant les effluents d'industries de production de ces antibiotiques ou à proximité de fermes d'élevage (Milaković *et al.* 2019 ; Rieke *et al.* 2018 ; Li *et al.* 2015 ; Wu *et al.* 2020).

La résistance aux SLM chez les bactéries environnementales intervient principalement à travers le mécanisme de méthylation d'un résidu adénine, site de liaison de l'antibiotique au niveau de la sous-unité 50S (Singh, Young, and Silver 2017). L'enzyme catalysant cette méthylation est l'érythromycine-résistance méthyltransférase (Erm) (Dinos 2017) (modifiant le nucléotide A2058 de l'ARNr de la sous-unité 50 S ribosomale bactérienne) (Dzyubak and Yap 2016).

#### La résistance aux SLM et chloramphénicol dans l'environnement :

Les gènes *erm* font partie du résistome des STEUs, enrichis et intégrant des EGMs dans les biofilms et les eaux de surface recevant les effluents de STEUs (Thornton *et al.* 2020). *ermF*, *mefA*, *linA*, et *catA* sont isolés chez *Bacteroides fragilis* environnementale dans les eaux usées brutes et traitées (Niestępski *et al.* 2019). Les gènes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermD*, *ermF*, *ermG*, *ermT*, *ermX*, *erm32*, *erm34*, et *erm35* sont investigués et retrouvés au niveau d'eaux de surface non impactées directement par les effluents de STEUs (Yi *et al.* 2019).

## 5.2. La modification de la cible bactérienne de l'antibiotique

### 5.2.1. La résistance aux aminosides

Un autre mécanisme de résistance acquis aux aminosides permet la modification de la cible bactérienne par une méthyltransférase de l'ARNr 16 S agissant au niveau de l'un de deux résidus nucléotidiques et codée par les gènes plasmidiques suivants : *armA*, *rmtB1*, *rmtB2*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtD2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, et *rmtH* (Krause *et al.* 2016).

### 5.2.2. La résistance aux polypeptides

#### Les polymyxine B (ou tigecycline) et polymyxine E (ou colistine)

Les mécanismes de résistance aux polymyxines, polypeptides de spectre large contre les bactéries à Gram négatif, codés par les gènes *arn* et *mcr-1* consistent en la modification du lipide A du lipopolysaccharide bactérien, cible de ces antibiotiques (Liu *et al.* 2016 ; Puja *et al.* 2020). La résistance à la colistine MCR-1 est mobilisable sur des plasmides isolés dans les écosystèmes aquatiques, et transmissible aux Enterobacterales et *Pseudomonas aeruginosa* (Liu *et al.* 2016 ; Van Puyvelde, Deborggraeve, and Jacobs 2018 ; MacNair *et al.* 2018 ; Zhu *et al.* 2019).

Le développement d'une résistance aux polymyxines ainsi qu'aux autres antibiotiques de dernier recours (tels que les céphalosporines et les carbapénèmes) est une préoccupation mondiale (Surette and Wright 2017 ; Vikesland *et al.* 2019 ; Voigt *et al.* 2020). L'association de la colistine à la rifampicine, rifabutine, clarithromycine, minocycline, ou novobiocine constitue une dernière option de traitement (MacNair *et al.* 2018).

#### La résistance à la bacitracine

La bacitracine bloque le transporteur (undécaprényl pyrophosphate) de précurseurs de la paroi bactérienne empêchant sa restitution (en undécaprényl phosphate) ce qui altère la formation de la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif (El Ghachi *et al.* 2018).

#### Les gènes de résistances à la bacitracine dans l'environnement :

Le gène *bacA* codant une pyrophosphatase est identifié en grande abondance dans les échantillons environnementaux et de fleuves (Chen, Bai, Li, *et al.* 2019a ; Yang *et al.* 2019 ;

Xuan Liu, Xiao, *et al.* 2019) ainsi que dans les échantillons en provenance de STEUs (Yin *et al.* 2019).

### **La résistance aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine)**

Les glycopeptides se lient au précurseur de la chaîne du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positif ce qui altère son intégrité (Singh, Young, and Silver 2017). La résistance à ces antibiotiques résulte de l'action d'enzymes produisant des précurseurs de moindre affinité à l'antibiotique (Zeng *et al.* 2016). Le transposon Tn1546 et les éléments apparentés codent pour la synthèse de neuf polypeptides responsables de la résistance à la vancomycine (VanH, VanB et VanA), d'hydrolyse de précurseur normal (VanX et VanY), de régulation de l'expression de la résistance (VanR et VanS), et de fonction inconnue (VanZ) (Zeng *et al.* 2016).

#### Description des gènes *van* dans les eaux de surface :

Les gènes de résistance aux glycopeptides *vanA* et *vanB* qui sont les principaux gènes de résistance à la vancomycine d'*Enterococcus faecium*, sont mesurés et caractérisés dans les affluents et effluents de stations d'épuration des eaux de rejets (Roberts 2018) recevant ou non les effluents d'hôpitaux (Oravcova *et al.* 2017) et dans les eaux de surface (Young, Rohr, and Harwood 2019).

### **5.3. L'interaction avec le métabolisme de protéines et d'acides nucléiques**

#### **5.3.1. La résistance aux sulfamides**

Les sulfamides ciblent la dihydroptéroate synthase, enzyme de synthèse du folate bactérien (Dennis *et al.* 2018 ; Lye *et al.* 2019). Les gènes de résistance *sul1*, *sul2*, *sul3* et *sulA* codent pour une dihydroptéroate synthase modifiée (Makowska, Koczura, and Mokracka 2016).

#### Détection des gènes de résistance aux sulfamides dans les eaux de surface :

La résistance aux sulfamides est couramment détectée dans les eaux souterraines, fleuves et eaux de surface (Wu *et al.* 2020 ; Anthony *et al.* 2019 ; Czekalski, Díez, and Bürgmann 2014 ;

Wang et al. 2020). Les gènes *sul 1* et *sul 2* sont considérés comme des indicateurs d'efficacité de traitement des eaux usées (Xiaohui Liu, Zhang, et al. 2019).

### 5.3.2. La résistance au triméthoprim

Le triméthoprim empêche la synthèse de l'acide folique bactérien en se liant à la dihydroptéroate réductase, enzyme intervenant après la dihydroptéroate synthase au niveau de la voie de synthèse de l'acide folique (Suhartono, Savin, and Gbur 2016).

#### Dans l'environnement aquatique :

La famille des gènes *dfr* conférant la résistance acquise au triméthoprim est investiguée dans les STEUs, lacs pollués et fleuves (Marathe et al. 2017 ; Czekalski, Díez, & Bürgmann, 2014 ; Ambrose and Hall 2019). Similairement au gènes *sul* de résistance aux sulfamides, les gènes *dfr* sont récalcitrants après traitement des eaux usées (Xiaohui Liu, Zhang, et al. 2019).

### 5.3.3. Les quinolones

Ce large groupe d'antibiotiques ralentit la croissance bactérienne par inhibition des enzymes de synthèse de l'ADN : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Singh, Young, and Silver 2017). Une résistance accrue aux quinolones se manifeste par l'altération d'un ou des deux sites de ces antibiotiques (Singh, Young, and Silver 2017).

#### Dans les écosystèmes environnementaux :

Médiée par les gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*) portés par un plasmide (Martínez-Martínez, Pascual, and Jacoby 1998 ; Jacoby et al. 2006 ; Hata et al. 2005 ; Wang et al. 2009 ; Cavaco et al. 2009) la résistance aux quinolones est mise en évidence dans de nombreux écosystèmes environnementaux et STEUs (L. Yan et al. 2017). L'efficacité des traitements actuels des eaux usées demeure limitée pour éliminer les gènes de résistance aux fluoroquinolones et sont même enrichis dans les effluents de STEUs (Oliveira et al. 2020 ; Thornton et al. 2020)

#### 5.4. Les inhibiteurs de synthèse protéique bactérienne : les tétracyclines

Ce groupe d'antibiotique inhibe la synthèse protéique bactérienne par liaison à la sous-unité 30S de l'ARN ribosomal 16S (S. B. Singh, Young, and Silver 2017). La résistance aux tétracyclines est horizontalement transférable et due à la surexpression de pompes d'efflux spécifiques ou à un mécanisme de protection du ribosome (Huang *et al.* 2015 ; Singh, Young, and Silver 2017).

##### Les gènes de résistance à la tétracycline dans les études environnementales :

Les bactéries portant des gènes de résistance à la tétracycline sont isolées dans les échantillons environnementaux variés : eaux de rejet, eaux de surface, et eaux souterraines (Roberts 2018). Les gènes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetM*, *tetO*, *tetS* et *tetQ* sont retrouvés dans des STEUs (Roberts 2018) ; *tetO*, *tetW*, *tetQ* et *tetM* codant pour la synthèse d'une protéine de protection du ribosome sont détectés dans des fleuves (Roberts 2018 ; Czekalski, Díez, & Bürgmann, 2014 ; Chen, Bai, Li, *et al.* 2019b), *tetA* et *tetB* (codant pour des pompes à efflux) au niveau d'eaux de surfaces (Czekalski, Díez, & Bürgmann, 2014 ; Makowska, Koczura, and Mokracka 2016), et *tetC* et *tetO* dans les eaux souterraines (Wu *et al.* 2020). Le gène *tetM* décrit pour la première fois sur le transposon Tn916 chez *Bacillus spp.* de fumiers et de sols sur lequel il est déposé (Roberts 2018), dissémine en même temps qu'*ermB*, gène conférant la résistance à la lincosamine-streptogramine, et *mefA* et *mfrD*, gènes codant pour des systèmes d'efflux (Czekalski, Díez, & Bürgmann, 2014). Makowska *et al.*, 2016 proposent le gène *tetB* comme indicateur d'impact anthropique dans les environnements aquatiques en raison de sa fréquence élevée par rapport aux autres gènes *tet(A)* et *tet(M)* quantifiés dans les environnements anthropisés.

#### 5.5. Les systèmes d'efflux

Le mécanisme d'efflux permet l'acquisition de nutriments, le maintien d'un équilibre de charge et de pH de la membrane cytoplasmique, et l'expédition de déchets métaboliques à l'extérieur de la bactérie (Schindler and Kaatz 2016). Sur la base de caractéristiques structurales, mécanistiques et sources d'énergie, les pompes d'efflux sont classées en six familles : ABC, MFS, MATE, RND, SMR et PACE (Du *et al.* 2018). Le système d'efflux contribue à la résistance bactérienne entraînant une faible spécificité de substrats ou d'une affinité

élevée (Schindler and Kaatz 2016) et reflète un potentiel de résistance chez les bactéries sensibles qui en portent les gènes (Li *et al.* 2015). Les gènes codant pour des pompes d'efflux spécifiques de substrats sont localisés sur des plasmides transférables et confèrent une résistance spécifique (*mfsA*, *mefA*, *macB*, *ermB/QacA*, *acrF*, *acrA*, *mdtO*, *mdtL*, *mdtF* et *tolC*) (Schindler and Kaatz 2016 ; Zhao *et al.* 2019 ; Zhao *et al.* 2019 ; Chen, Bai, Li, *et al.* 2019a). Les gènes codant pour les pompes d'efflux conférant les multi-résistances sont chromosomiques, pouvant être exprimés ou rester silencieux ; *qacA* et *qacC*, codant pour des pompes d'efflux de multirésistance, font exception car ils sont retrouvés sur des plasmides (Schindler and Kaatz 2016).

#### Les gènes des systèmes d'efflux dans les études environnementales :

Les études des environnements aquatiques naturels (lacs naturels et réservoirs) révèlent relativement une plus grande abondance des gènes de multi résistance, principalement des gènes de systèmes d'efflux (Liu *et al.* 2018). Une augmentation significative des gènes codant pour les pompes d'efflux ayant une grande variété de substrats (antibiotiques, surfactants, etc...) dans les environnements impactés par l'homme est enregistrée (Fahrenfeld *et al.* 2017 ; Chaturvedi *et al.* 2021).

## **6. Les techniques de biologie moléculaire pour l'investigation du résistome**

Les techniques de biologie moléculaire sont indépendantes de la culture et sont basées sur l'analyse du matériel génétique extrait directement à partir d'un échantillon.

### **La PCR quantitative (qPCR)**

L'exploration de la diversité et de l'abondance relative des GRAs et EGMs en plus de l'identification d'hôtes pathogènes dans les eaux de surface permet d'évaluer le risque sur la santé publique dans le cadre d'un programme de gestion de la qualité de l'eau (Bai *et al.* 2019).

La qPCR est une technique d'analyse spécifique et standard de laboratoires qui mesure l'abondance (sur le volume d'échantillon) ou la prévalence (sur le nombre total de bactéries) d'un ou de plusieurs gènes de résistance dans un échantillon donné (Luprano *et al.* 2016). Le



nombre total de bactéries est obtenu par mesure du gène de l'ARN 16S ribosomal (Luprano *et al.* 2016), ou d'un gène de ménage signature d'une espèce (ex : *uidA* pour *Escherichia coli*)(Walker *et al.* 2017). L'utilisation d'amorces spécifiques marquées par un colorant fluorescent (le plus utilisé étant un agent intercalant à double brin : SYBR Green) ou une sonde fluorescente (la plus utilisée étant la sonde TaqMan, basée sur une activité d'oligonucléotide et d'exonucléase à double marquage de la Taq polymérase) qui développe la fluorescence proportionnellement à l'amplification en temps réel du produit de PCR (Manaia *et al.* 2018). Le coût de ces deux systèmes est plus élevé que celui des cultures mais est relativement bas par rapport aux autres méthodes de biologie moléculaire (Lucius *et al.* 2019).

La spécificité élevée de la méthode permet de détecter les GRAs de l'ADN intra et extra cellulaire et d'estimer le transfert horizontal des gènes dans une analyse transversale (Zhang *et al.* 2018). En outre, l'analyse directe et la quantification des gènes codant l'ARN16S permet, en comparaison avec les méthodes de culture, l'exploration de bactéries qui peuvent être viables mais non cultivables capables d'infecter et de déclencher des mécanismes de virulence (Anthony *et al.* 2019). En revanche, un des inconvénients majeurs de la méthode est la limite d'extraction des ADN des différentes matrices lorsque les analyses sont critiques (Manaia *et al.* 2018) surtout dans des échantillons environnementaux qui sont en général complexes. De même cette analyse ciblée ne permet pas de détecter de nouveaux gènes ou des gènes inconnus vu que la méthode est basée sur la reconnaissance préalable de séquences de gènes par des amorces spécifiques (Liang *et al.* 2020).

L'extraction de l'ADN peut représenter un biais à cause de la présence d'inhibiteurs de PCR donnant lieu à des amplifications incorrectes dans les matrices complexes (ex : température de fusion incorrecte, épaulements, doubles pics)(Manaia *et al.* 2018). Des variants du gène ne sont pas détectés lorsque les amorces sont très spécifiques et différents types d'interférences ou d'agents inhibiteurs interviennent dans le cas des échantillons environnementaux (ex : les acides humiques) réduisant la sensibilité de la méthode (Manaia *et al.* 2018). Ainsi, il est capital que la méthode d'extraction des acides nucléiques soit la même dans toute analyse comparative (Manaia *et al.* 2018). Les analyses directes de l'ADN indépendantes de culture ne distinguent pas les cellules vivantes et mortes (Luprano *et al.* 2016). Le recours à des méthodes comme l'utilisation du monoazide de propidium (PMA)

permet de distinguer les cellules lésées des membranes intactes (Yuan *et al.* 2018). Quant aux analyses environnementales de l'ARN pour étudier l'expression de bactéries vivantes, elles ne sont pas courantes (Manaia *et al.* 2018).

La qPCR à haut débit (HT-qPCR) représente une avancée technologique et un excellent outil de surveillance en routine de la résistance dans les environnements aquatiques environnementaux pour nombreuses raisons (Zheng *et al.* 2017 ; Xiao, *et al.* 2019 ; Xu *et al.* 2016 ; Zhao *et al.* 2018). Cette approche permet de quantifier en un temps court un grand nombre de gènes de résistance (dans des volumes de l'ordre du nanolitre), de façon parallèle en un même temps, à prix relativement bas, et dans plusieurs échantillons. Ceci représente l'avantage d'une compréhension globale et meilleure de la dissémination des GRAs (An *et al.* 2018). Dans les analyses de la résistance dans l'environnement, la comparaison est permise par un rapport entre le nombre de copies de GRAs et le nombre de lectures rapportées à celle du gène domestique (ARNr 16 S par exemple) (Manaia *et al.* 2018 ; Xu *et al.* 2016). De plus, cette approche quantitative ne nécessite pas de compétences extensives en bio-informatique (Xiao, *et al.* 2019).

Les applications de cette méthode sont nombreuses, citons :

- Mesure de l'abondance et de la composition des gènes de résistance aux antibiotiques dans les échantillons environnementaux
- Études de l'efficacité de processus de traitement des eaux usées,
- Surveillance de l'antibiorésistance dans les systèmes de distribution de l'eau potable
- Caractérisation des distributions saisonnières et géographiques de la communauté résistante bactérienne (Xie *et al.* 2018 ; An *et al.* 2018).

### **Les méthodes métagénomiques**

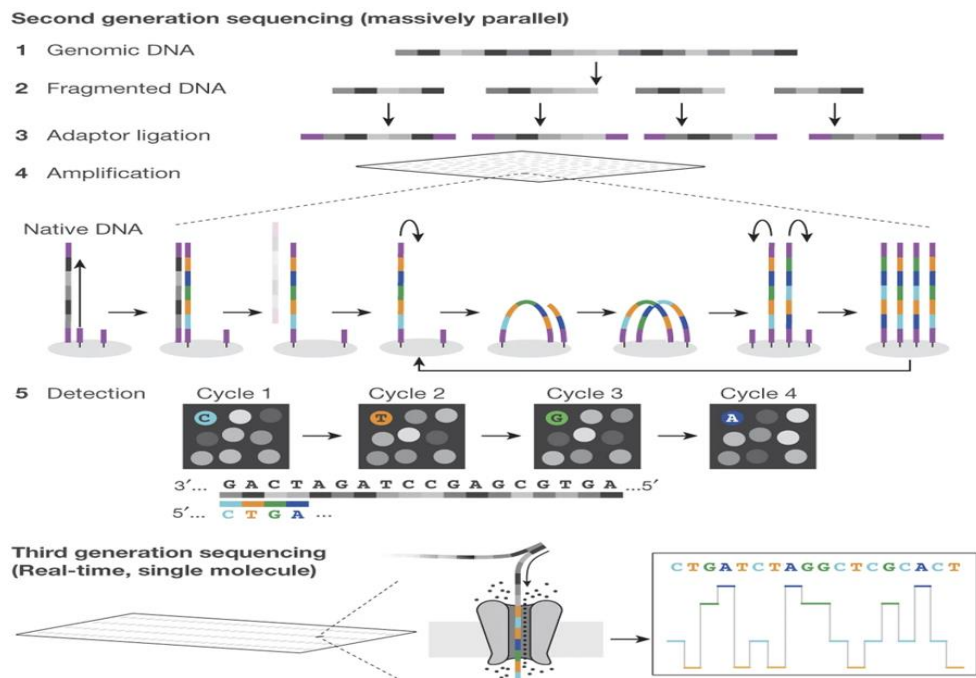
La métagénomique désigne les méthodes de séquençage à haut débit, représentées dans la figure 8, réalisant des analyses génomiques de tous les microorganismes présents dans un échantillon donné (Quince *et al.* 2017). L'investigation à grande échelle de microbiomes complexes est rendue possible : identification de phylums bactériens

environnementaux, mise en évidence d'endosymbiose, présence de gènes de résistance aux antibiotiques et de pathogènes humains, une association entre les microorganismes, et la détection d'une altération du microbiote après une perturbation (Quince *et al.* 2017 ; Hardwick *et al.* 2018). L'analyse des microorganismes hôtes du résistome environnemental se base ainsi de plus en plus sur la classification taxonomique des contigs métagénomiques hébergeant des GRAs (Lee *et al.* 2020 ; Lanza *et al.* 2018 ; Crofts, Gasparrini, and Dantas 2017). La métagénomique permet ainsi d'estimer les valeurs d'abondance relative, calculées en fonction du nombre de lectures spécifiques par rapport au nombre total de lectures, soit en fonction du nombre de lectures d'un gène de ménage, le plus souvent le gène de l'ARNr 16S (Manaia *et al.* 2018).

Les biais liés au choix de sondes spécifiques dans les qPCR sont évités avec la métagénomique et la découverte de nouveaux gènes de résistance avec mise à jour de bases de données en libre accès est rendue possible (Xiao, *et al.* 2019). La disponibilité des données métagénomiques dans ces bases de données contribue à l'analyse de l'évolution de la résistance aux antibiotiques (Manaia *et al.* 2018). Le prix des méthodes de séquençage de haut débit a diminué considérablement (Berglund *et al.* 2019). La longueur des séquences obtenues appelées « reads » a augmenté pour de meilleures identification et assemblage des gènes (Manaia *et al.* 2018). Ces « reads » sont ensuite assemblés en contigs. La longueur du chevauchement des contigs doit permettre un appariement de séquences suffisant pour la reconstitution de fragments initiaux (de Muinck *et al.* 2017). Cependant l'équipement sophistiqué requis pour faciliter l'inférence aux gènes de résistance ou aux hôtes putatifs nécessite de l'expertise en bio-informatique (Manaia *et al.* 2018). Cette dernière est loin d'être suffisante en raison de la génération importante et rapide de bases de données colossales et complexes. Ainsi, l'analyse des communautés microbiennes et la caractérisation de résistomes d'échantillons environnementaux de façon concomitante deviennent un des défis majeurs à relever avec ces nouvelles techniques d'analyse (Hardwick *et al.* 2018). L'assemblage de larges régions génomiques limite la caractérisation d'espèces peu abondantes ou est rendue difficile par l'abondance d'éléments répétitifs comme les ISs avec des contextes multiples comme par exemple les intégrons, transposons, et plasmides (Berglund *et al.* 2019). Les GRAs en particulier sont difficilement reconstruits à partir de données métagénomiques et sont négligés par les technologies disponibles (Berglund *et al.*

2019). La méthode métagénomique n'est pas suffisamment sensible pour la détection de pathogènes critiques comme les *Escherichia coli* résistants et qui sont facilement retrouvés et caractérisés en culture (Thornton *et al.* 2020).

La sensibilité de l'approche métagénomique pour surveiller les GRAs dans l'environnement est controversée. Une faible sensibilité limiterait la détection de gènes de résistance rares et/ou une faible spécificité réduirait l'identification de variants alléliques conférant un polymorphisme phénotypique (Lanza *et al.* 2018 ; Crofts, Gasparrini, and Dantas 2017). Des variations importantes des résultats sont aussi rapportées d'où l'importance de calculer des différences statistiquement significatives (Berglund *et al.* 2019). En terme de mesure de l'abondance de gènes spécifiques, les méthodes métagénomiques sont moins sensibles que les qPCR, notamment si seuls quelques millions de reads sont générés par échantillon (Bengtsson-Palme, Larsson, and Kristiansson 2017). La limitation de la détermination des phénotypes de résistance constitue l'inconvénient majeur de ces méthodes et limite à son tour l'analyse des risques associés à la présence des gènes et la description des hôtes (Lee *et al.* 2020 ; Manaia *et al.* 2018). Le coût prohibitif est non adapté pour un monitoring régulier (Vikesland *et al.* 2019) ce qui constitue un autre inconvénient de ces méthodes (Manaia *et al.* 2018). De plus, les biais d'analyses et de résultats du fait de bases de données utilisées en constante évolution (Manaia *et al.* 2018) sont à prendre en compte. En définitive, différents biais sont associés aux différentes étapes des méthodes métagénomiques (extraction d'ADN, amplification, séquençage, identification informatique), chacune s'appliquant préférentiellement sur des groupes taxonomiques plus que d'autres et avec une efficacité variable (McLaren, Willis, and Callahan 2019) induisent des biais de l'analyse métagénomique (Hardwick *et al.* 2018). Les biais variant selon les technologies et le nombre d'échantillons pouvant être analysés influencent le résultat final et empêchent la comparaison entre les études (McLaren, Willis, and Callahan 2019 ; Manaia *et al.* 2018). D'où la nécessité de développer des références standards pour contourner les difficultés analytiques. Les références standards mesurent les variables techniques qui causent des biais d'analyse du séquençage à haut débit et évaluent la précision de la quantification par normalisation (Hardwick *et al.* 2018).



**Figure 8: Représentation schématique modifiée de Shendure *et al.* 2017 des méthodes de séquençage à haut débit (Shendure *et al.* 2017)**

Le séquençage de deuxième génération par synthèse à haut débit, dérive du principe de la méthode de Sanger mais génère parallèlement et massivement les séquences (McCombie, McPherson, and Mardis 2019).

Les automates développés et disponibles sur le marché pour appliquer ce type de séquençage sont nombreux : Applied Biosystems™ 454 (Roche), Solexa™ (Illumina), Agencourt™ (Applied Biosystems), Helicos™ (Quake), Complete Genomics™ (Drmanac) et Ion Torrent™ (Rothberg) (Shendure *et al.* 2017).

La longueur des séquences à décrypter est en général inférieure à celle réalisable par la méthode de Sanger (McCombie, McPherson, and Mardis 2019 ; Shendure *et al.* 2017). Le principe consiste en l'incorporation des nucléotides et la détection des séquences en trois étapes: (1) fragmentation aléatoire de l'ADN (2) préparation des bibliothèques par attachement d'adaptateurs universels sur les extrémités des fragments, et (3) amplification après hybridation des adaptateurs avec des séquences d'oligonucléotides complémentaires attachés sur le dispositif (Shendure *et al.* 2017 ; McCombie, McPherson, and Mardis 2019 ; Quince *et al.* 2017). Les données sont générées et attribuées aux fragments positionnés spécifiquement. La séquence du nouveau brin synthétisé est obtenue suite à la détection de signaux fluorescents émis par incorporation de nucléotides (dNTP) marqués ou par la détection d'une

bioluminescence (libération d'un pyrophosphate à chaque incorporation de dNTP) ou par une sensibilité indirecte (transistor sensible au champs d'ions) (McCombie, McPherson, and Mardis 2019) ; Quince *et al.* 2017 ; Shendure *et al.* 2017).

La métagénomique dans la littérature est largement utilisée pour explorer la diversité et la biogéographie des résistomes environnementaux, présentant l'avantage de révéler des GRAs émergents ou jusque-là inconnus (Manaia *et al.* 2018). La technique du shotgun a été utilisée par exemple par Chen, Chen, *et al.* 2019, et par Thornton *et al.* 2020, pour décrire les GRAs présents et les phylums bactériens hôtes dans les fleuves Ganger indien, Chaobai chinois, Blue et Indian Creek américains respectivement (Chen *et al.* 2019 ; Reddy and Dubey 2019 ; Thornton *et al.* 2020).

### **La métagénétique**

Le séquençage à haut débit basé sur l'amplification par PCR d'un élément génétique, c'est-à-dire la métagénétique, est proposée en alternative de la métagénomique (Bohan *et al.* 2017 ; Quince *et al.* 2017). Une région conservée d'une séquence présentant des polymorphismes phylogénétiques (ex : ARN 16 S ribosomal) est ciblée spécifiquement pour explorer les microbiomes de l'environnement (Muinck *et al.* 2017). Les limitations ne sont pas moins nombreuses (Bohan *et al.* 2017). L'identification spécifique des hôtes de GRAs et le manque de standardisation ou d'utilisation d'outils universels dans les analyses métagénomiques réduisent la reproductibilité et la comparabilité des résultats (Manaia *et al.* 2018 ; Bohan *et al.* 2017). L'étude du devenir des BRAs et des GRAs au cours des traitements des eaux usées est complexe, influencée par une myriade de facteurs externes difficiles à contrôler et surveiller, d'où les résultats contradictoires (Manaia *et al.* 2018). Une méthodologie standard à suivre n'est pas encore définie pour l'étude de BRAs et GRAs dans les STEUs urbaines, alors que des recommandations unanimes sont établies afin d'arriver, au final, à éliminer les BRAs et les GRAs au cours des traitements (Manaia *et al.* 2018).

Le séquençage de la séquence codante du gène de l'ARNr 16 S est souvent associé à la qPCR à haut débit pour étudier l'impact anthropique sur l'environnement, comme dans les études de Buelow *et al.* 2020 et de Zheng *et al.* 2018. Buelow *et al.* 2020 associent ces deux

approches pour étudier la dynamique du microbiote d'échantillons d'eau usée en provenance de STEUs urbaine et hospitalière, avant et après traitement, sur une période de quatre ans ; le recours à ces deux méthodes a permis de découvrir des signatures distinctes du microbiote et de caractériser les résistomes des effluents de STEUs urbaine et hospitalière (Buelow *et al.* 2020). Zheng *et al.* 2018 ont comparé le résistome et la communauté bactérienne dans un écosystème riverin traversant des zones d'impact anthropique croissant sur deux saisons différentes à travers la métagénomique et la qPCR à haut débit (Zheng *et al.* 2018).

### **La métatranscriptomique**

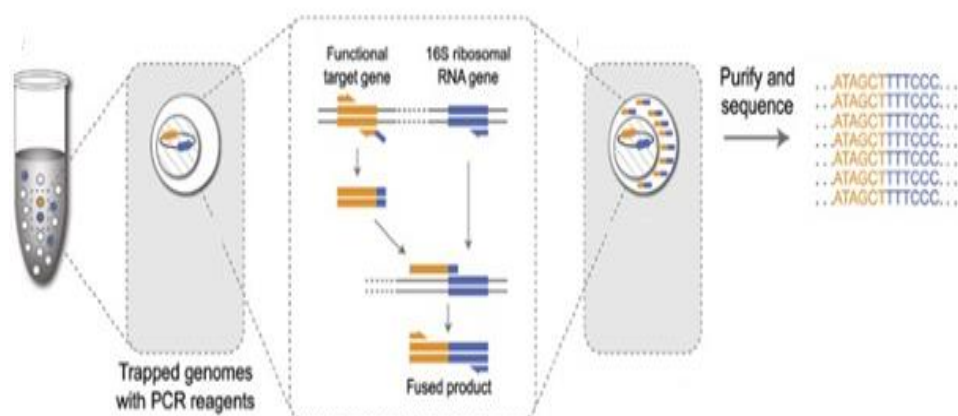
La métatranscriptomique consiste en l'extraction des transcrits d'ADN (ARN messagers) pour analyser l'expression des gènes (Falk *et al.* 2019). Les contigs obtenus sont analysés par un logiciel bio-informatique révélant la présence de GRAs cliniquement pertinent et l'hôte le plus associé à chaque GRA selon les bases de données du logiciel (Asante and Osei Sekyere 2019). Des études métagénomiques fonctionnelles de clonage bactériens permettent de confirmer le profil phénotypique des variations alléliques non décelées par les systèmes bio-informatiques et de prendre en compte les facteurs épigénétiques (Asante and Osei Sekyere 2019). En revanche l'analyse métatranscriptomique de l'expression des gènes au niveau de la communauté microbienne peut être biaisée par des facteurs comme la demi-vie courte des transcrits ou une sous-représentation de gènes (Rowe *et al.* 2017).

La métatranscriptomique dans les études d'environnements anthropisés permettent de surveiller dans des conditions déterminées la biosphère, d'analyser le fonctionnement des communautés bactériennes dans les systèmes aquatiques, et d'explorer la diversité microbienne (Falk *et al.* 2019). L'étude de Falk *et al.* 2019 portant sur des sédiments d'environnements pollués a mis en évidence l'adaptabilité des communautés bactériennes grâce à l'obtention de métatranscrits de transposons. L'impact anthropique sur les compartiments environnementaux et aquatiques a été caractérisé par des études portant sur l'environnement en associant aux méthodes métatranscriptomiques des méthodes métagénomiques pour révéler la diversité, l'abondance, et les phylums hôtes des GRAs (Yan *et al.* 2020 ; Liu *et al.* 2019 ; Rowe *et al.* 2017). Liu *et al.* 2019 ont analysé par la combinaison de ces deux méthodes 360 GRAs au niveau d'échantillons de boues activées en provenance

de 3 STEUs de Taiwan ; l'identification des phylums hôtes des GRAs était seulement possible avec cette méthode (Liu *et al.* 2019). Rowe *et al.* 2017 ont investigué l'abondance en GRAs des effluents d'un hôpital et d'une ferme d'élevage en Angleterre et ont étudié la corrélation entre les transcrits de GRAs obtenus à ces niveaux avec ceux de la source d'un fleuve à travers le couplage de méthodes transcriptomique et métagénomique (Rowe *et al.* 2017).

### L'« Exon-Primed Intron-Crossing (Epic) » PCR

À la différence des autres méthodes indépendantes de la culture, l'epic-PCR associe des gènes fonctionnels à leurs hôtes bactériens, cultivables ou non cultivables (Miguel, Jetten, and Welte 2020). Le principe de la méthode comporte plusieurs étapes. La première consiste en un isolement dans des billes d'hydrogel de cellules bactériennes isolées à partir d'un échantillon. Ensuite, à partir d'un nombre suffisant de cellules bactériennes isolées ( $2 \times 10^7$ ), une PCR fusion est réalisée au sein des billes utilisant des amorces du gène de résistance ciblé et du gène de l'ARNr 16 S et permettant de fusionner les deux amplicons obtenus pour une cellule bactérienne. Enfin, un séquençage des amplicons fusionnés obtenus permet d'analyser les hôtes bactériens associés au gène de résistance ciblé (Hultman *et al.* 2018). La concaténation et le séquençage sont illustrés dans la figure 9. L'étude de Hultman *et al.* 2018 portant sur des influents et des effluents de STEUs a ainsi permis d'associer des gènes de résistance (*int11*, *bla<sub>OXA-58</sub>*, *tetM* et *qacΔE*) aux genres de bactéries hôtes (Hultman *et al.* 2018).



**Figure 9: Représentation schématique modifiée** (Spencer *et al.* 2016)

Un nombre suffisant de cellules est intégré avec les amorces du gène ciblé et du gène de l'ARNr 16 S dans des billes d'hydrogel. Le gène ciblé est amplifié par des amorces spécifiques



reconnaissant en même temps le gène de l'ARNr 16 S. Les deux produits obtenus sont fusionnés pour former un amplicon qui sera séquencé.

### **Le séquençage à SMRT « Real-time, single-molecule sequencing »**

La synthèse médiée par la polymérase en temps réel permet de construire des reads de 10 kb à 100 kb par le système PacBio et la lecture des séquences est basée sur le principe de l'émission de signaux fluorescents lors de l'incorporation de dNTP marqués en de petits volumes (Shendure *et al.* 2017).

### **Le séquençage en nanopore**

Le concept de ces petits dispositifs portables est basé sur le principe de détection électronique à la différence des autres technologies. Une émission de flux d'ions, par le passage d'une molécule d'ADN simple brin à travers un canal étroit d'un système Oxford Nanopore Technologies™, révèle la séquence. Les reads construits atteignent 900 kb (Shendure *et al.* 2017).

### **La nanotechnologie**

Les biocapteurs conçus par des nanomatériaux sont pratiques et capables de détecter rapidement des GRAs avec une grande sélectivité et à faible coût. La présence du gène est mise en évidence par le changement de l'absorbance de la suspension par agrégation de nanoparticules. Des capteurs électrochimiques d'oligonucléotides fixés sur une électrode de carbone en verre sont aussi développés (Vikesland *et al.* 2019).

Le tableau 1 résume les principaux avantages et inconvénients des différentes méthodes utilisées pour l'exploration du résistome et du microbiome environnemental et permettrait la comparaison entre elles.

**Tableau 1: Avantages et inconvénients des principales méthodes d'exploration du résistome environnemental**

Avantages	Inconvénients
<b>Méthodes standards de culture</b>	
Caractérisation phénotypique Dénombrement de cellules viables Corrélation des gènes avec leurs hôtes Prix de la méthode réduit Disponibilité dans tous les pays Recherche spécifique et sensible de pathogènes critiques Reproductibilité, standardisation et comparaison entre les études	Longs délais d'attente Détection d'une faible proportion de la communauté bactérienne
<b>qPCR et qPCR à haut débit</b>	
Spécificité Exploration des gènes de bactéries cultivables et non cultivables Prix relativement bas	Présence d'un seuil de quantification Biais d'extraction de matériel génétique Détection limitée de variants Pas de détection possible de nouveaux gènes
<b>qPCR à haut débit</b> Quantification d'un grand nombre de gène Délai relativement réduit	
<b>Métagénomique et Métagénétique</b>	
<b>Métagénomique</b> Exploration de microbiomes et de résistomes complexes	Compétences en bio-informatiques Données complexes Sensibilité limitée Pas de caractérisation phénotypique Coût non adapté Biais de séquençage Caractérisations négligées d'espèces, GRAs et EGMs
<b>Métagénétique</b> Exploration de la communauté bactérienne	
<b>Métatranscriptomique</b>	
Exploration des gènes exprimés de bactéries cultivables et non cultivables	Demi-vie courte des transcrits Sous-représentation de gènes
<b>EPIC PCR</b>	
Association de GRAs aux genres bactériens	Nombre limité de gènes ciblés Pas de détermination d'espèces hôtes

## 7. Les fleuves anthropisés

Les fleuves sont les réceptacles finaux des effluents et des rejets de sources anthropiques diverses et jouent un rôle important dans la persistance et la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques. À ce titre, ils sont surveillés et étudiés pour contrôler la dissémination de la résistance aux agents antimicrobiens au sein des communautés bactériennes de l'environnement.

En France, Oberlé *et al.* 2012 ont étudié au niveau du fleuve Risle la relation entre la présence d'antibiotiques et l'abondance d'*Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques le long d'un continuum centre médical-STEU-fleuve Risle. La contamination de l'eau par les antibiotiques et *Escherichia coli* résistants aux antibiotiques, y compris *Escherichia coli* porteurs d'IM1, diminuait le long du continuum. L'ofloxacine ( $1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et le sulfaméthoxazole ( $4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) étaient les antibiotiques persistants détectés dans le fleuve bien que l'amoxicilline ait été l'antibiotique majoritairement prescrit dans le centre médical selon les auteurs. Les résistances d'*Escherichia coli* les plus élevées étaient les résistances aux quinolones (42,0%), sulfamides (24,0%), tétracyclines (38,0%) et pénicillines (38,0%), pourtant la tétracycline et le sulfaméthoxazole n'étaient pas administrés dans le centre médical ; une co-sélection de résistance aux antibiotiques au niveau des IM1 pourrait expliquer ce résultat (Oberlé *et al.* 2012).

Le fleuve Zenne en Belgique traverse une zone urbaine et est impacté par les effluents de STEUs, écoulements de zones de pâturage de bétails et de fermes d'élevage. La prévalence de GRAs (*sul1*, *sul2*, *tetW*, *tetO*, *blaTEM* et *qnrS*) a été investiguée le long du fleuve par qPCR et l'estimation de celle d'*Escherichia coli* résistante comme indicateur de contamination fécale par des méthodes de culture (Proia *et al.* 2018). Parmi les activités anthropiques, l'impact le plus élevé en terme d'abondance de bactéries fécales résistantes correspondait au déversement de STEUs surtout conventionnelles (Proia *et al.* 2018). Des analyses de corrélation entre l'abondance en GRAs et la concentration en antibiotiques étaient seulement significatives pour les gènes *tet* de résistance à la tétracycline (Proia *et al.* 2018).

En Chine, le fleuve Shanghai reçoit les affluents de trois fleuves associés chacun à une source anthropique différente : eaux usées brutes pompées, effluents d'une STEU et ruissèlements agricoles (Wu *et al.* 2019). Les GRAs investigués (*sul1*, *sul2*, *ermB*, *mefA*, *bla CTX-M*, *bla TEM*, *aadA1*, *strB*, et *int11*) étaient plus abondants en aval des zones d'impacts et l'abondance relative en GRAs la plus élevée a été enregistrée au point de confluence des trois fleuves (Wu *et al.* 2019). La zone du fleuve urbain recevant les déversements d'eaux usées pompées, était la plus enrichie en GRAs par rapport aux points de déversement des effluents de STEU ou d'impact agricole et contient aussi les niveaux les plus élevés d'agents sélectifs

(Wu *et al.* 2019). Un enrichissement en *int1* au niveau du point de confluence a été corrélé au fleuve recevant les effluents de STEUs (Wu *et al.* 2019). En Italie, l'abondance relative en GRAs (*tetA*, *sul2*, *ermB*, *qnrS*) et *int1* dans les effluents d'une STEU urbaine ne présente pas de différence significative lorsque les eaux usées urbaines reçoivent ou non des effluents industriels (Fiorentino *et al.* 2019), ce qui démontre leur origine humaine. L'étude de Thornton *et al.* 2020 au niveau du fleuve Blue River aux États-Unis démontre une grande corrélation entre quatre-vingt-huit GRAs et le crAssphage directement à la sortie de STEUs. L'abondance des GRAs et du crAssphage diminuait au fur et à mesure de l'éloignement du point de déversement des STEUs (Thornton *et al.* 2020).

## 8. Les estuaires et la pression anthropique

Les estuaires ou embouchure des fleuves dans la mer (Guo *et al.* 2019), constituent des zones transitoires entre la Terre et l'océan (Zhang *et al.* 2018) auxquelles sont attribuées d'importantes propriétés écologiques et économiques (Guo *et al.* 2018). L'estuaire peut servir d'espace récréatif, comme par exemple celui du fleuve Clyde en Écosse (Hitchcock and Mitrovic 2019), ou source d'eau potable comme l'estuaire Yangtze en Chine (Xiaoyu Guo *et al.* 2019) et même d'aquaculture comme celui du fleuve Jaune de Shandong en Chine également (Zhao *et al.* 2017).

Les estuaires sont soumis à de hautes pressions anthropiques représentant le débouché des fleuves et de leurs affluents (Wu *et al.* 2019 ; Guo *et al.* 2019). Ils constituent des zones à haut risque de contamination par des GRAs dont l'abondance est corrélée aux activités industrielles et à l'accélération de l'urbanisation (Wu *et al.* 2019 ; Guo *et al.* 2019). Les estuaires sont assimilés à des barrière et filtre entre la Terre et l'océan. En général, un cours d'eau traverse des zones de gradient de population croissant ce qui permet l'évaluation de l'influence anthropique sur le résistome environnemental le long du cours du fleuve jusqu'aux estuaires (Lee *et al.* 2020).

En France, Laroche *et al.* 2009 ont investigué l'abondance des IM1, IM2 et IM3 et les résistances d'*Escherichia coli* à 16 antibiotiques dans l'estuaire de la Seine (Laroche *et al.* 2009), majeur estuaire européen sous forte pression anthropique (Touron *et al.* 2007). Indépendamment des saisons, les résistances d'*Escherichia coli* à au moins un des antibioques

testés étaient élevées (30.2% à 56.6%) et comparables à celles de souches d'*Escherichia coli* (48.3%) isolées dans les effluents de la STEU à Rouen déversant les effluents dans l'estuaire de la Seine. Des niveaux élevés de résistance ont été rapportés dans la zones urbanisée de l'estuaire, particulièrement à proximité de la STEU. En zone rurale (à Caudebec), *Escherichia coli* était détectée seulement pendant des épisodes pluvieux, ce qui pourrait être dû selon les auteurs à la contamination fécale de l'estuaire de la Seine suite aux écoulement de surface (Laroche *et al.* 2009). Quoique l'embouchure de l'estuaire de la Seine soit faiblement contaminée par *Escherichia coli* en raison de la salinité, le niveau de résistance correspondant était élevé (50.1%) et comparable à celui d'*Escherichia coli* isolées dans les effluents de la STEU (Laroche *et al.* 2009). Dans cette étude, des résistances majeures (amoxicilline, ticarcilline et tétracycline), intermédiaires (chloramphénicole, céfalotine, kanamycine, ticarcilline-acide clavulanique, amoxicilline-acide clavulanique, triméthoprime-sulfaméthoxazole et acide nalidixique) et mineures (gentamicine, amikacine, ciprofloxacine, ceftazidime, cefotaxime et imipénème) détectées correspondaient aux antibiotiques fréquemment utilisés en médecine humaine et vétérinaire en France (Laroche *et al.* 2009). Seuls les IM1 et IM2 étaient détectés respectivement dans 11% et 1.43% des souches d'*Escherichia coli* et les cassettes de gène *aadA* (*aadA1*, *aadA5*) conférant la résistance à streptomycine/spectinomycine étaient les plus fréquemment retrouvées (Laroche *et al.* 2009).

Une autre étude intéressante a été menée au niveau de l'estuaire de la Seine par Touron *et al.* 2007 pour évaluer la contamination fécale et la présence de *Salmonella*. Les quantités d'*Escherichia coli* et d'entérocoques étaient supérieures aux limites énoncées par la directive européenne (2006/7/EC) pour les activités récréatives. Dans cette étude, le niveau de contamination par les bactéries fécales était le plus élevé au niveau des échantillons prélevés dans la zone urbanisée, impactée par les effluents de la STEU à Rouen et recevant les affluents du fleuve Robec (impacté par les effluents d'un hôpital) et par les affluents du fleuve Cailly. Aussi, le fleuve Eure, en amont de la zone urbanisée de l'estuaire de la Seine, recevait des effluents agricoles et constituait une source de bactéries fécales. Le mouvement de marée contribuait quant à lui à contaminer la zone en amont de la STEU. À l'embouchure de l'estuaire, Touron *et al.* 2007 ont retrouvé une faible abondance de tous les indicateurs bactériens à cause de la salinité. La proportion d'échantillons contaminés par

*Salmonella* et provenant de la région la plus en amont de l'estuaire était 10 fois supérieure quand le débit était élevé selon Touron *et al.* 2007. En revanche, pendant les périodes de faible débit, l'abondance de *Salmonella* était supérieure en zone urbaine, en aval du fleuve Robec. Enfin, les fleuves Eure, Risle et Robec étaient les affluents les plus contaminés par *Salomonella*, suivis par l'effluent de la STEU (Touron *et al.* 2007).

En Chine, les sédiments de 18 estuaires ont fait l'objet d'une étude portant sur 259 GRAs par qPCR à haut débit ; selon les auteurs, une forte corrélation entre les GRAs et les EGMs témoigne de l'impact humain sur la dissémination de la résistance (Zhu *et al.* 2017). Cette corrélation significative était aussi retrouvée dans les environnements côtiers en Australie (Port Philippe et fleuve Yarra) entre les EGMs (*int11* et transposases *tnpA1*, *tnpA2*, *tnpA3*) et GRAs détectés, ce qui révèle un transfert horizontal des gènes entre les communautés bactériennes (Zhang *et al.* 2019). Par ailleurs, dans la baie de Bohay en Chine, une abondance significativement supérieure des GRAs a été démontrée dans l'eau de surface de l'estuaire par rapport aux sédiments (Zhang *et al.* 2018). Zhao *et al.* 2017 décrivent quant à eux une diminution significative de l'abondance relative de 18 GRAs investigués par qPCR (aux fluoroquinolones, aminosides, MLS, tétracyclines, et  $\beta$ -lactamines) au niveau de l'estuaire du fleuve Jaune de Shandong par rapport à celles d'une zones d'aquaculture côtière de ce fleuve (Zhao *et al.* 2017). Les auteurs expliquent cette diminution de l'abondance relative des GRAs par l'effet de la salinité de l'eau de mer, contrairement à Zhang *et al.* 2019 qui ont rapporté une augmentation de la résistance aux antibiotiques dans les environnements côtiers (Zhang *et al.* 2019). La stratégie évolutionnaire des bactéries consiste à développer une seule réponse aux stress antimicrobiens ou environnementaux, vu que les composants et procédés bactériens ciblés sont les mêmes (Zhang *et al.* 2019). Ainsi, l'établissement de stratégies efficaces de lutte contre les stress environnementaux minimisent la dissémination des GRAs (Zhang *et al.* 2019).

## **9. L'antibiorésistance dans les eaux de surface au Liban**

L'abondance de molécules médicamenteuses dans cent échantillons de fleuves, lacs, puits et fontaines sur le territoire libanais a été évaluée par Mokh *et al.* 2017. Quatre antibiotiques : l'érythromycine et/ou résidus (52 à 2806 ng L<sup>-1</sup>), la rifaximine (155 à 542 ng L<sup>-1</sup>), l'ofloxacine (52 à 2806 ng L<sup>-1</sup>), et le sulfathiazole (4100 ng L<sup>-1</sup>) ont été retrouvés

et quantifiés respectivement dans 17 %, 16%, 5% et 1% des échantillons. Une contamination fécale était mise en évidence par la détection de souches d'*Enterococcus* et d'*Escherichia coli* dans respectivement 48 et 23 % des échantillons. De plus, *Pseudomonas aeruginosa* avait été recherchée et détectée dans 27% des échantillons. La résistance aux antibiotiques était fréquemment retrouvée en l'absence des antibiotiques correspondants. Tous les isolats d'*Enterococcus* étaient résistants à au moins deux de six antibiotiques testés (erythromycine (83% de résistance), ciprofloxacine (11%), norfloxacine (2%), tétracycline (34%), doxycycline (28%). De plus, cette résistance multiple correspondait aux *Enterococcus* de 43 % des échantillons de fleuves principalement à proximité du point de déversement d'effluent d'une STEU pour le fleuve de Beyrouth, et au niveau de points de prélèvement divers des fleuves Awali, Litani et Assi. Dans ces mêmes échantillons, la résistance d'*Escherichia coli* a été mesurée pour la fluméquine (53% de résistance), la norfloxacine (23%), la ciprofloxacine (15%), la tétracycline (15%), la doxycycline (15%) et le triméthoprime (15%) (Mokh *et al.* 2017).

Dagher *et al.* 2021 ont quantifié en 2018 les coliformes fécaux et *Escherichia coli* dans des échantillons prélevés en amont, au niveau central et en aval des fleuves majeurs au Liban. Parmi ces échantillons, 73.48 à 61.3 % dépassaient les limites acceptables de composition microbiologique pour l'irrigation selon des normes européennes (SEQ-EAU-2003) et 31.81 % dépassaient la limite acceptable des coliformes fécaux pour les activités récréatives selon des normes américaines (US EPA). Les normes selon les standards SEQ-EAU-2003 et US EPA figurent en annexe 2. Les auteurs ont trouvé que la majorité des échantillons non acceptables provenaient de régions agricoles au Nord et de la Bekaa. Les proportions de bactéries résistances d'*Escherichia coli* étaient de 40% à l'ampicilline, 42% à l'amoxicilline- acide clavulanique, 4% au céfépime, 14% au céfotaxime, 46% à la céfalexine, 17% au céfixime, 0.3% au doripénème, 0.5% à l'imipénème, 6% à la gentamicine, 9% à la kanamycine, 35% à la streptomycine, 35% à la tétracycline, 10% à la ciprofloxacine, 7% à la norfloxacine, 32% au triméthoprime-sulfaméthoxazole et 13% au chloramphénicol. Dans cette étude, des densités élevées des indicateurs bactériens de contamination fécale ont été retrouvées dans les échantillons de la zone centrale du fleuve de Beyrouth (en plein milieu de la capitale), du fleuve Ostuène et en aval des fleuves Bared, Janoubi, et Qadicha ; les fleuves Ostuène, Bared, Janoubi et Qadicha sont situées dans le Nord où il y a un manque d'infrastructure et la densité

de population et de réfugiés est élevée. Les échantillons à la source des fleuves étaient en majorité acceptables pour l'irrigation et contenaient moins de coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* sauf pour les échantillons en provenance des sources des fleuves Qadicha, Awali, et Hasbani. La résistance aux carbapénèmes était faible (3 souches en zones centrales des fleuves Bared et Qadicha) (Dagher *et al.* 2021).

Une autre étude intéressante a été conduite par Diab *et al.* 2018 en 2014 et 2015 pour rechercher au niveau d'échantillons de sources de fleuves et de l'estuaire du fleuve Qadicha les Enterobacterales résistantes aux céphalosporines ou aux carbapénèmes. Dix-sept isolats d'Enterobacterales productrices de BLSE (13 *Escherichia coli*, 3 *Klebsiella pneumoniae* et 1 *Citrobacter freundii*) ont été isolés à partir de 59.1% des échantillons de l'estuaire du fleuve Qadicha. Des isolats sécréteurs de carbapénémases (3 *Escherichia coli* et 1 *Klebsiella pneumoniae*) étaient retrouvés dans 18.2% des échantillons de l'estuaire. Le gène *bla*<sub>CTX-M15</sub> était le plus prévalent (82.4%) (10 UFC *Escherichia coli*, 3 UFC *Klebsiella pneumoniae* et 1 UFC *Citrobacter freundii*) dans les échantillons de l'estuaire de Qadicha. Le gène *bla*<sub>CTX-M-55</sub> était isolé dans un seul isolat d'*Escherichia coli*, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> dans 3 isolats, *bla*<sub>SHV-12</sub> dans 1 isolat et en même temps avec *bla*<sub>CTX-M-14</sub> dans un second isolat. Le gène *bla*<sub>CMY-42</sub> était détecté dans 3 *Escherichia coli* contenant le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Les gènes étaient portés par des plasmides IncF dans 16 isolats (13 *Escherichia coli* et 3 *Klebsiella pneumoniae*), par des plasmides IncY dans 2 isolats (*Escherichia coli* et *Citrobacter freundii*), et dans un plasmide non typé dans 1 isolat d'*Escherichia coli*. Les isolats résistants aux carbapénèmes portaient le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> (dans un seul isolat de *Klebsiella pneumoniae* et en combinaison avec un gène *bla*<sub>CTX-M-14</sub> dans un deuxième isolat d'*Escherichia coli*) ou le gène *bla*<sub>OXA-244</sub> (seul dans un isolat d'*Escherichia coli*, et en combinaison avec *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *bla*<sub>SHV-12</sub> dans un autre isolat d'*Escherichia coli*). Les deux gènes *bla*<sub>OXA-48</sub> étaient portés par des plasmides IncI alors que les deux gènes *bla*<sub>OXA-244</sub> ont été identifiés sur des plasmides IncHI2. Les taux de résistance rapportés à l'érythromycine étaient de 63.6%, au sulfonamides/triméthoprimine de 54.6%, à la streptomycine de 39.4%, à la kanamycine de 36.4%, à la gentamicine de 33.4% et aux fluoroquinolones de 48.5%. Les gènes de résistance aux fluoroquinolones *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* et/ou *oqxA* étaient identifiés pour 9 isolats. Les auteurs ont comparé les résultats obtenus avec ceux d'études évaluant l'abondance d'Enterobacterales productrices de BLSE dans les fleuves de Taiwan, de la Suisse, et de l'Allemagne qui étaient en moyenne de 30 à 36 %



d'abondance. 6.1% des échantillons d'eau de source étaient contaminés (5 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella pneumoniae* et 1 *Citrobacter braakii*, toutes productrices de BLSE) (Diab *et al.* 2018).

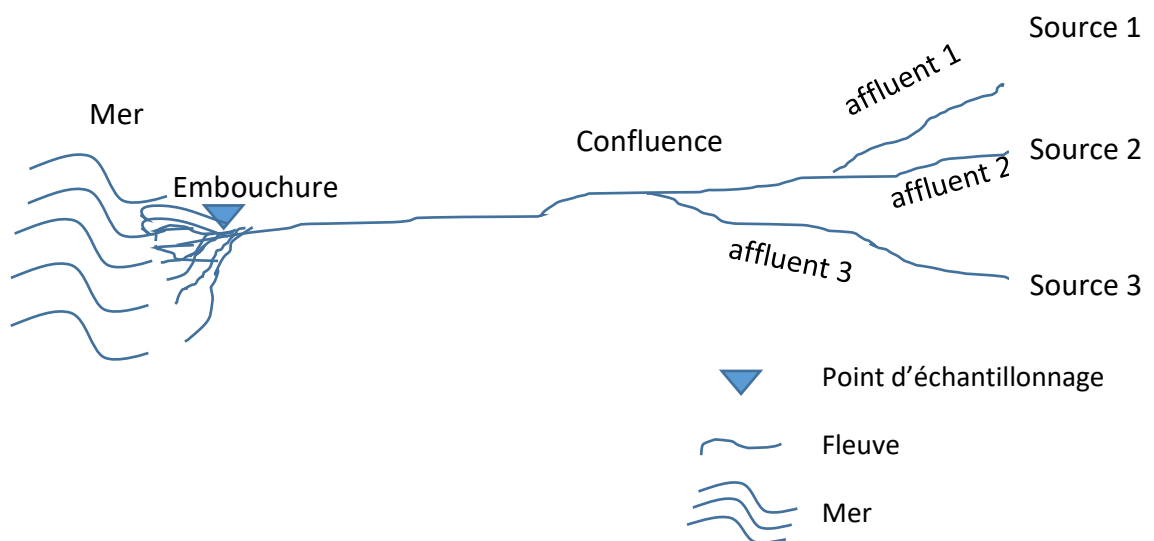
En l'absence de données officielles concernant la consommation d'antibiotiques au Liban, une étude menée par Khalifeh, Moore, and Salameh 2017 a fourni des renseignements utiles sur la consommation d'antibiotiques au Liban. Cette étude a été menée auprès de cinquante officines réparties sur le territoire libanais et dans lesquelles un questionnaire était rempli pour toutes les ventes d'antibiotiques. Le nombre d'antibiotiques (en dose définie journalière par 1000 habitants) sont comparables à ceux de régions ou pays voisins comme Abu-Dhabi, l'Iran, la Jordanie, et les pays de l'Europe du Nord et de l'Ouest. Le pourcentage d'auto-prescription (62.8%) est similaire à celui d'une étude plus ancienne évaluant la consommation d'antibiotiques au Liban. L'amoxicilline - acide clavulanique était l'antibiotique le plus vendu et auto-prescrit. De même, cet antibiotique est le plus vendu aux Émirats Arabes Unis (48.9%) et au Pakistan (Khalifeh, Moore, and Salameh 2017). En médecine vétérinaire, les antibiotiques oxytétracyclines, pénicilline G, streptomycine, et gentamicine sont utilisés dans l'élevage de bovins alors que les fluoroquinolones ne le sont pas ; les auteurs suggèrent donc une origine humaine de la résistance ou une co-sélection environnementale par d'autres contaminants (Diab *et al.* 2018).

## **II. Étude descriptive environnementale des eaux de fleuves au Liban**

## A. Matériel et méthodes

## 1. Plan de l'étude

La pression anthropique a été évaluée au niveau des fleuves majeurs libanais à travers des indicateurs de résistance antimicrobienne : des bactéries résistantes aux antibiotiques (BRAs) et des gènes de résistance aux agents antimicrobiens (GRAs). La contamination fécale, le plus associée à l'émergence de la résistance dans l'environnement, a été évaluée en contexte estuarien des fleuves majeurs libanais aux deux saisons, à travers la recherche de deux marqueurs viraux de contamination fécale. Une première campagne de prélèvements (36 échantillons) a été effectuée au printemps 2017 en contexte estuarien des fleuves majeurs au Liban. En hiver 2018, des prélèvements (155 prélèvements) ont été effectués au niveau de points les plus proches accessibles à la (aux) source(s) et jusqu'à l'embouchure de ces fleuves majeurs (Google Map®) selon le schéma stratégique de la figure 10. Une approche de culture a permis d'identifier des BRAs en contexte estuarien à deux saisons différentes (printemps et hiver) et le long des fleuves en hiver seulement. Une approche de qPCR à haut débit a été utilisée pour quantifier 92 GRAs et gènes d'éléments génétiques mobiles (EGMs), horizontalement transférables, en contexte estuarien aux deux saisons. Les marqueurs viraux de contamination fécale ont été recherchés par une approche de PCR en contexte estuarien aux deux saisons également.

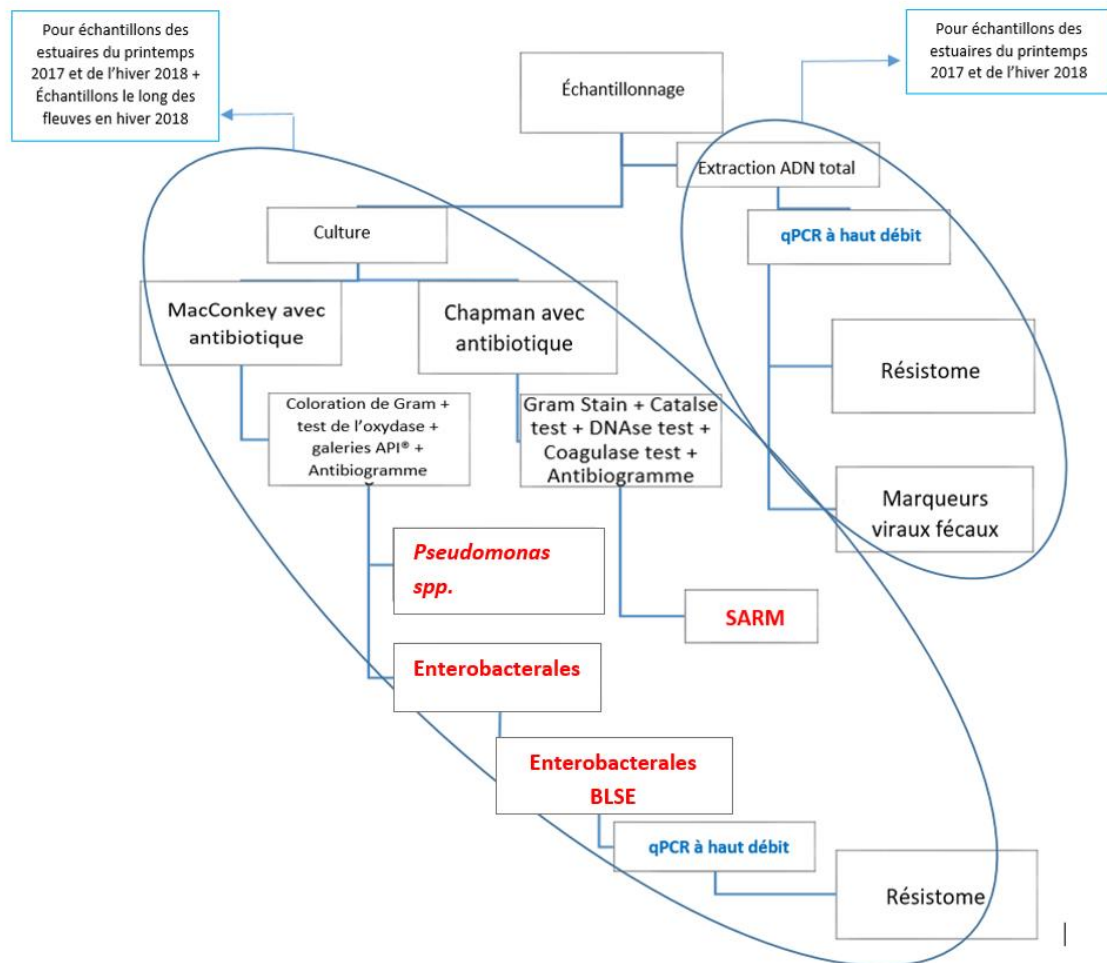


**Figure 10 : Schéma stratégique de l'échantillonnage**

Schéma illustrant l'échantillonnage a été effectué au niveau des points accessibles les plus proches à la (aux) source(s), des différents affluents, du (des) point(s) de confluence et jusqu'aux embouchures des fleuves en hiver 2018.

La détection de BRAs le long des cours des fleuves majeurs libanais traversant des zones de gradient de pollution variable a permis d'étudier la variation de la pression anthropique le long de ces fleuves. La comparaison des résultats de détection de BRAs et d'abondances en GRAs et EGMs en contexte estuarien entre le printemps 2017 et l'hiver 2018, a permis d'étudier l'impact des saisons sur l'abondance en GRAs et EGMs, et sur la détection de BRAs. L'évaluation de la contamination fécale en contexte estuarien a été évaluée à travers une détection par PCR des marqueurs viraux, le crAssphage et le Torque Teno virus (TTV), dans les échantillons totaux aux deux saisons (printemps et hiver). Les différentes étapes de l'étude sont schématisées dans la figure 11.

Pour chaque prélèvement effectué le long des fleuves en hiver 2018 et en zone côtière des fleuves au printemps 2017, un volume d'eau ( $V=1\text{ mL}$ ) a été étalé sur gélose Chapman (64134, Bio Rad), spécifique de bactéries à Gram positif, additionnée d'un antibiotique spécifique de bactéries à Gram positif. Un autre échantillon d'eau ( $V=1\text{ mL}$ ) a été étalé à chaque fois sur géloses MacConkey (69084, Bio Rad) spécifiques de bactéries à Gram négatif, mélangée chacune à un antibiotique différent utilisé en médecine humaine pour traiter les infections bactériennes causées par les agents bactériens résistants ciblés. Ainsi, des bactéries à Gram positif et à Gram négatif résistantes aux antibiotiques, ont poussé sur ces milieux additionnés d'antibiotique et ont été identifiées. Une coloration de Gram et des tests phénotypiques (catalase, DNase, coagulase) ont été faits pour identifier les bactéries à Gram positif et isoler spécifiquement les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM). Une coloration de Gram, le test de l'oxydase et les galeries API® ont été effectués pour identifier les bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas* et les Enterobacterales résistantes. Des antibiogrammes ont été réalisés pour 135 isolats de bactéries. Aux deux saisons, une recherche du résistome a été faite à partir de l'ADN extrait des échantillons totaux prélevés en contexte estuarien et au niveau des isolats d'Enterobacterales sécrétrices de BLSE isolées à partir de ces échantillons.



**Figure 11: Représentation schématique de l'étude au niveau des fleuves**

## 2. Échantillonnage

### 2.1. En contexte estuarien

Le Liban est localisé à l'Est de la mer Méditerranée et est représenté en rouge dans la figure 14. Les Longueurs, moyennes des volumes annuels, moyennes des débits annuels, débits maximums et débits minimums des fleuves figurent dans le tableau 2. Les moyennes de précipitations et de températures par mois entre 1950 et 2015 sont représentées dans la figure 12.

Des caractéristiques notables sont à mentionner (Hajjar 1997), notamment :

- La superficie du Liban est de 10542 Km<sup>2</sup> et la capitale est Beyrouth.
- La structure géographique du Liban est formée de 4 bandes parallèles :
  - ✓ La plaine côtière
  - ✓ Le Mont Liban est une chaîne de montagnes parallèle à la mer Méditerranée située à l'Est et parallèle à la côte. La Qurnat as Sawda' constitue le point le plus haut du Mont Liban à 3 088 mètres d'altitude.
  - ✓ L'Anti-Liban est une autre chaîne de montagnes, frontalière entre le Liban et la Syrie, à l'Est du Mont Liban et est aussi parallèle à la côte.
  - ✓ La vallée de la Bekaa s'élève en moyenne à 1000 m d'altitude
- La majorité des fleuves libanais prennent source du Mont Liban comme le montre la figure 14, et coule d'Est en Ouest vers la mer Méditerranée où ils se déversent, principalement au travers d'embouchures.
- Le fleuve Assi coule vers le Nord du pays et ensuite traverse la frontière Nord.
- Le fleuve Hasbani coule vers le Sud du pays et traverse la frontière Sud.

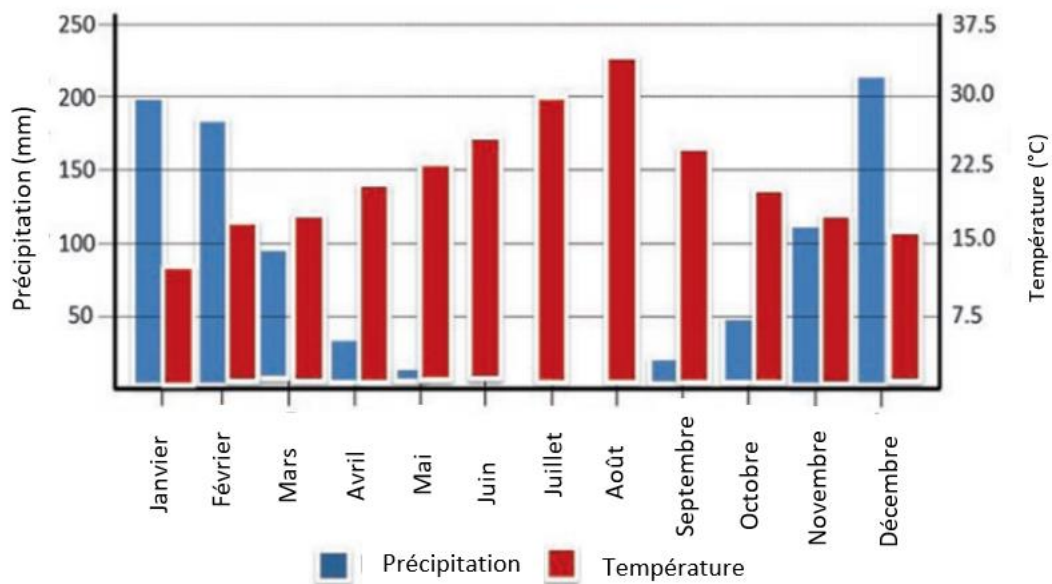
Le niveau des fleuves au Liban est le plus élevé au mois d'avril à cause de la fonte des neiges avec l'élévation de la température (Fayad 2017). Un débordement des nappes souterraines après la saison des fortes précipitations pendant les mois de décembre, janvier et février contribue également à l'élévation des niveaux d'eau de fleuves au printemps (Fayad 2017).

**Tableau 2 : Longueurs, moyenne des volumes annuels, moyenne des débits annuels, débits maximums et débits minimums des fleuves majeurs (Kassem and Gökçekuş 2019)**

Fleuve	Longueur	Moyenne des volumes annuels (1971 - 1975)	Moyenne des volumes annuels (2005 - 2009)	Débit moyen (1971 - 1975)	Débit moyen (2005 - 2009)	Débit maximum (1971 - 1975)	Débit maximum (2005 - 2009)	Débit d'étiage (1971 - 1975)	Débit d'étiage (2005 - 2009)
Unité	km	Mm <sup>3</sup>	Mm <sup>3</sup>	Mm <sup>3</sup> /s	Mm <sup>3</sup> /s	Mm <sup>3</sup> /s	Mm <sup>3</sup> /s	Mm <sup>3</sup> /s	Mm <sup>3</sup> /s
Janoubi / Kabir	58	259.2	283.9	9.1	91.3	48.5	190.8	1.5	1.4
Ostuène	44	–	47.0	–	1.6	–	6.9	–	0.0
Bared	24	132.8	120.1	4.2	3.8	24.0	18.9	0.2	0.5
Qadicha / Abou Ali	45	148.6	206.6	4.6	6.6	25.2	32.5	0.6	1.1
Jawz	38	32.3	44.6	1.0	1.4	11.4	17.9	0.0	0.0
Ibrahim	30	208.6	329.2	6.6	10.5	65.5	79.1	0.1	0.3
Kaleb	38	154.1	189.3	4.9	6.1	29.3	67.0	0.2	0.0
Beirut	42	47.9	81.8	1.5	2.6	25.1	49.9	0.0	0.0
Damour	38	–	166.9	–	5.4	–	51.0	–	0.1
Awali	48	393.7	252.9	12.5	8.1	51.7	32.2	1.9	1.6
Zahrani	25	19.2	17.5	0.6	0.6	10.6	4.5	0.0	0.0 0.0
Assi / Orontes	46	326.4	275.5	11.0	8.7	13.8	12.4	8.8	6.0
Litani	170 –	–	167.8	–	5.4	–	43.6	–	0.0
Hasbani	21	38.4	28.7	1.2	0.9	9.9	14.9	0.0	0.0

Les précipitations et les températures varient avec les saisons comme le montre la figure 12 représentant les moyennes des précipitations et des températures par mois entre 1950 et 2015. L'écart de température entre la montagne où prennent source les fleuves et l'embouchure au niveau de la mer est à peu près de 6 ° C en hiver et de 10°C au printemps.

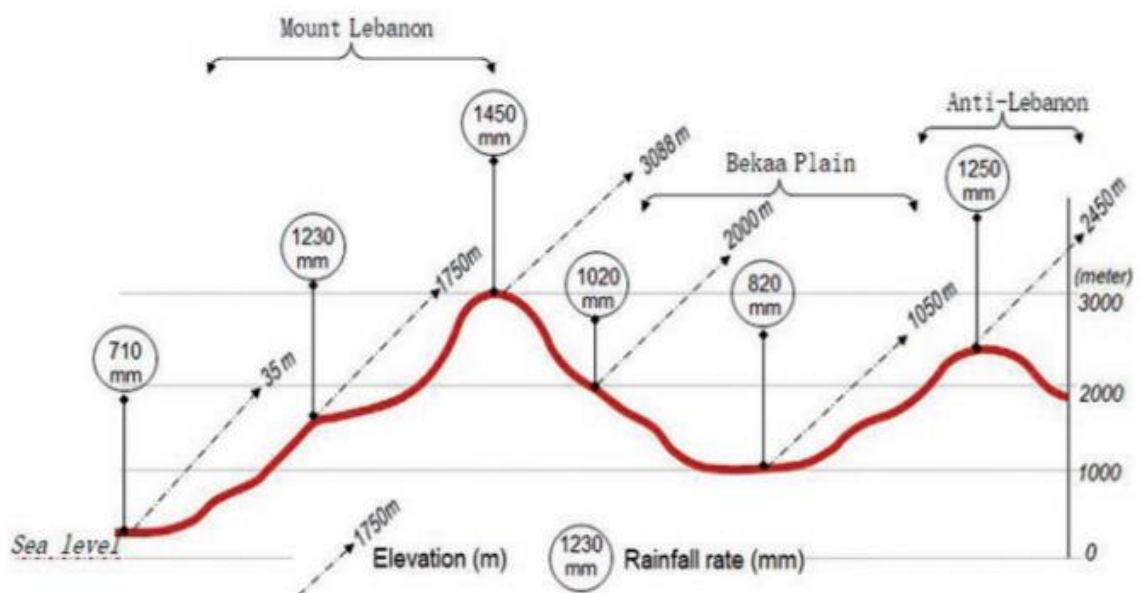




**Figure 12 : Moyennes des précipitations et des températures par mois entre les années 1950 et 2015 (Shaban 2020)**

Les précipitations en mm représentées par des barres en bleue étaient le plus élevées pendant les mois d’hiver (décembre, janvier et février) alors que les températures en °C représentées par des barres en rouge étaient le plus élevées pendant les mois d’été (juin, juillet et août).

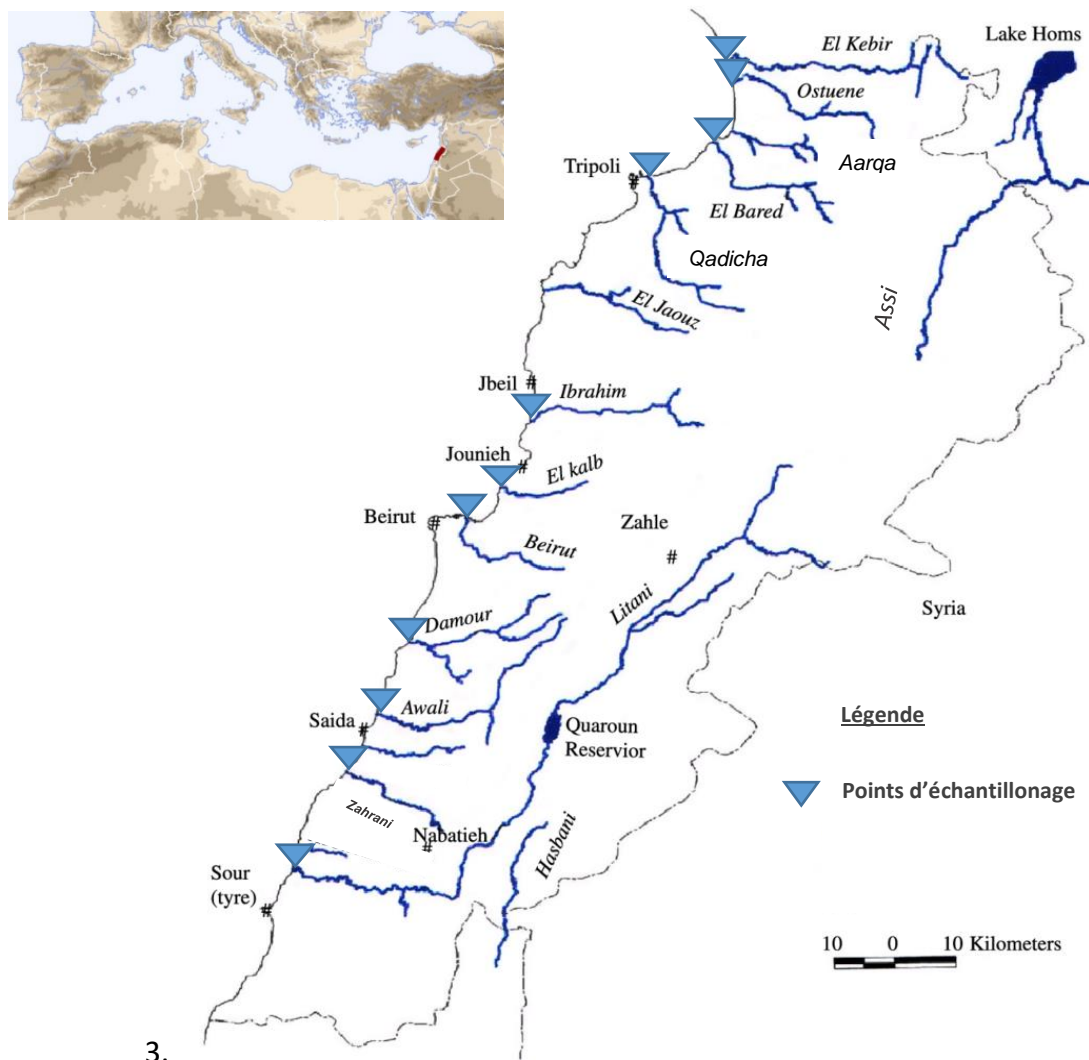
Les moyennes des précipitations ont varié en fonction de l’altitude entre les années 1950 et 2015 comme le montre la figure 13.



**Figure 13 : Coupe frontale montrant les variations des moyennes de précipitations à différents niveaux par rapport au niveau de la mer entre les années 1950 et 2015 (Shaban 2020)**

Les moyennes des précipitations ont varié entre 710 mm au niveau de la mer et 1450 mm au pic du Mont Liban.

Les prélèvements ont été effectués en contexte estuarien des fleuves comme le montre la figure 14 durant les mois d'avril 2017 et janvier 2018 résultant en n = 72 échantillons : 36 au mois d'avril et 36 au mois de janvier (3 échantillons par fleuve). Les températures en zone côtière et les coordonnées exactes sont notées à chaque point de prélèvement et sont regroupés dans le tableau 3. Les échantillons collectés dans des flacons stériles de 60 mL ont été transportés dans de la glace au laboratoire dans un délai de quelques heures puis mis à - 20°C au congélateur jusqu'au lendemain pour réaliser les analyses de l'eau.



**Figure 14:** Carte du Liban adaptée de Hourri & El Jeblawi, 2007, représentant les sites de prélèvements au niveau des embouchures et la localisation du Liban dans la zone

géographique méditerranéenne (Europe Atlas. (2021, February 3) <https://www.euratlas.net/geography/europe/>).

En haut, à gauche : le Liban est représenté en rouge et est situé à l'Est de la mer Méditerranée. Sur la carte géographique, des triangles en bleu représentent les points de prélèvements en zone côtière des fleuves.

Le fleuve Jawz/Jaouz est desséché au niveau estuarien et a été exclu de l'étude de comparaison entre deux saisons.

**Tableau 3: Coordonnées et températures au niveau des point de prélèvements en contexte estuarien du Nord au Sud**

Fleuve	Coordonnées des points d'échantillonnage	Température en avril 2017 en °C au niveau côtier	Température en janvier 2018 en °C au niveau côtier
Janoubi / Al Kabir	34° 38' 04'' N 35° 58' 42'' E	19	13
Ostuène	34° 36' 07'' N 35° 59' 24'' E	19	13
Aarqa	34° 32' 58'' N 35° 59' 30'' E	19	13
Bared	34° 30' 31'' N 35° 57' 42'' E	18	12
Qadicha	34° 26' 48'' N 35° 50' 47'' E	20	12
Ibrahim	34° 03' 54'' N 35° 38' 35'' E	20	13
Kaleb	33° 95' 61'' N 35° 58' 80'' E	19	13
Beyrouth	33° 54' 06'' N 35° 32' 18'' E	19	14
Damour	33° 42' 17'' N 35° 26' 36'' E	18	15
Awali	33° 35' 20'' N 35° 23' 12'' E	20	15
Zahrani	33° 29' 33'' N 35° 20' 34'' E	18	14
Litani	33° 95' 61'' N 35° 59' 80'' E	19	15

## 2.2. Prélèvements le long des fleuves

Les prélèvements le long des fleuves ont été faits pour la saison d'hiver seulement (en janvier 2018). Les coordonnées le long des fleuves figurent dans l'annexe 3. Les températures varient de 6 et 8 °C entre la montagne et la zone côtière. Pareillement aux prélèvements en zone côtière, des prélèvements ont été fait à l'aide de 3 flacons stériles de 60 mL chacun par point d'échantillonnage. Les échantillons ont été emmenés au laboratoire dans un délai de

quelques heures dans de la glace et mis à - 20°C au congélateur jusqu'au lendemain pour réaliser les analyses de l'eau.

### **3. Détection de bactéries résistantes pathogènes par des méthodes de culture**

Un volume  $V=1$  ml d'eau est prélevé des échantillons après agitation et est étalé à l'aide d'un râteau stérile sur de la gélose MacConkey (69084, Bio Rad) et de la gélose Chapman (64134, Bio Rad) sélective de bactéries à Gram négatif et de bactéries à Gram positif respectivement, avec antibiotiques. Des milieux sans antibiotiques ont servi de contrôle. Trois catégories de géloses MacConkey sont préparées après addition à 50°C approximativement dans chacune un des trois antibiotiques suivants : ceftriaxone (2 mg/L), céfépime (4 mg/L) ou ertapénème (0.5 mg/L) aux concentrations correspondantes aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) des Enterobacterales selon les recommandations du comité européen « European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing » (EUCAST) v.8. Les poudres antibiotiques ont été achetées à l'officine : Rocephin®(1g) (Roche) pour la ceftriaxone, Cefepime (1g) (Panpharma) pour le céfépime, Invanz® (1g) (MSD) pour l'ertapénème. La quatrième catégorie a servi de contrôle sans antibiotique. Deux catégories de gélose Chapman sont préparées, une contenant l'oxacilline (4 mg/L) (Mast) mélangée à la gélose aux alentours de 50°C et à concentration correspondant à la CMI du SARM selon les recommandations de l'EUCAST, et une catégorie préparée sans antibiotique pour servir de contrôle. Après étalement d'un volume de 1 mL sur chacune des boîtes, toutes les géloses ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures.

### **4. Identification spécifique des bactéries pathogènes résistantes par des méthodes de cultures standards**

Des méthodes standards de culture et des tests phénotypiques ont permis d'identifier les bactéries résistantes d'intérêt dans le cadre de la présente étude.

#### **4.1. Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été effectuée pour les colonies présentant un aspect morphologique différent et qui ont poussé sur les milieux additionnés d'antibiotiques, repiqués sur Muller-Hinton (64884, Bio-Rad).

#### **4.2. Identification des bactéries à Gram négatif**

Les Enterobacterales et *Pseudomonas spp.* résistants ont été spécifiquement identifiés en utilisant deux tests. Le premier test est le test de l'oxydase utilisant les bandelettes Oxydase-Streifen® (53832, Bio-Rad). Le cytochrome oxydase au sein de bactéries est mis en évidence par un virage des bandelettes au bleu foncé au contact de bactéries du genre *Pseudomonas*. Le deuxième test est celui des galeries API® déterminant spécifiquement les espèces bactériennes.

Pour les galeries API® 20 E (20120, Biomérieux), un liquide de suspension (20150, Biomérieux) est utilisé pour suspendre les bactéries suivant le protocole du fabricant. Quelques gouttes de suspension bactérienne sont ajoutées dans toutes les cupules de la galerie. De l'huile de paraffine (701100, Biomérieux) est utilisée pour couvrir certaines cupules indiquées dans le protocole. L'huile couvrant les cupules permettra une réaction en anaérobiose ou un virage de la couleur de l'indicateur, selon les cupules. Les galeries sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24h. Pour les galeries API® 20 NE (20050, Biomérieux), un liquide de suspension (70700, Biomérieux) est utilisé pour réaliser des suspensions bactériennes. On procède de même en déposant quelques gouttes dans toutes les cupules de la galerie selon le protocole du fabricant. Les galeries sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24h. APIweb® est un site sur internet utilisé pour identifier l'espèce bactérienne en fonction des résultats des tests API.

#### **4.3. Identification des bactéries à Gram positif**

Trois tests phénotypiques ont été utilisés selon les protocoles du fabricant (Bio-rad) pour identifier les SARM.

Le premier test est celui de la catalase qui a permis de mettre en évidence la décomposition du peroxyde d'hydrogène et de différencier les *Staphylococcus aureus* des bactéries catalase négatives du genre *Streptococcus*. Une effervescence après mise en

contact sur une lame en verre d'une colonie en présence d'eau oxygénée (à 10 volumes) est témoin de la présence de catalase. Le deuxième test est celui de la DNase. La présence de la désoxyribonucléase de *Staphylococcus aureus* est soulignée par la formation d'un halo clair autour d'une strie centrale de culture bactérienne ensemencée puis incubée pendant 24 h sur de la gélose à ADN (64404, Bio-rad). La formation du halo clair est induite après déposition de 2-3 gouttes d'acide chlorhydrique 1 N. Le kit Pastorex® Staph-plus (56356, Bio-rad) a été utilisé pour mettre en évidence la coagulase dans *Staphylococcus aureus*. Selon le protocole du kit, la présence de trois composants spécifiques de *Staphylococcus aureus* est évaluée : le facteur d'affinité pour le fibrinogène, également appelé coagulase liée ou « clumping factor », la protéine A qui possède une affinité pour le « fragment cristallisable » de l'immunoglobuline gamma (IgG) et les polysaccharides capsulaires du *S. aureus*. Le réactif est constitué de particules de latex sensibilisées d'une part avec du fibrinogène et des IgG, et d'autre part avec des anticorps monoclonaux spécifiques des polysaccharides capsulaires de *S. aureus*. Une réponse positive consiste en la formation d'agglutinats après avoir mélangé quelques colonies bactériennes avec le réactif du kit sur une carte fournie dans le kit.

## **5. Susceptibilité et profils de résistance des BRAs**

Le profil de résistance aux antibiotiques a été réalisé pour toutes les colonies sélectionnées sur de la gélose Muller-Hinton (64884, Bio-Rad) additionnée d'antibiotique, présentant un aspect morphologique différent sur boîte et identifiées en réalisant des suspensions bactériennes ayant une turbidité de 0,5 McFarland mesurée à l'aide d'un densitomètre selon les recommandations du comité « European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing » (EUCAST) v8. Les disques d'antibiotiques Bio-Rad utilisés pour les tests de résistance aux antimicrobiens étaient les suivants: amoxicilline-acide clavulanique (20 µg - 10µg) (66178) , céfépime (30 µg) (66098), ceftazidime (10 µg) (67298), aztréonam (30 µg) (66928), gentamicine (10 µg) (3566608), amikacine (30 µg) (66148), pipéracilline-tazobactam (30 µg - 6 µg) (67338) et imipénème (10 µg) (66568) pour les bactéries à Gram négatif tandis que des disques d'acide fusidique (10 µg) (66518), de céfoxitine (30 µg) (66228), de triméthoprim-sulfaméthoxazole (1.25 - 23,75 µg) (68898), de gentamicine (10 µg) (3566608) et de ciprofloxacine (5 µg) (68648) ont été utilisés pour les SARM.

La sensibilité des SARM détectés en contexte estuarien à la vancomycine (92057, Liofilchem) et à la teicoplanine (92012, Liofilchem) a été évaluée à l'aide de bandes Liofilchem déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI), selon le protocole du fabricant. Ces bandes contiennent une concentration croissante de l'antibiotique testé le long de la bande. La bande est placée au milieu de la surface de la gélose Mueller-Hinton (64884, Bio-Rad) sur laquelle une suspension bactérienne de 0.5 McFarland a été étalée. La boîte de culture est mise à l'étuve 24 h. La CMI de la suspension bactérienne correspond à l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bande. La susceptibilité des SARM détectés le long des fleuves à la vancomycine et à la teicoplanine n'a pas été effectuée.

Les isolats de BLSE ont été identifiés par le test de synergie entre l'amoxicilline-acide clavulanique et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et de 4<sup>ème</sup> génération et de l'aztréonam. Enfin, l'interprétation des résultats a été réalisée comparativement aux seuils cliniques EUCAST. La variation du nombre d'UFC des bactéries résistantes sélectionnées est comparée pour chaque embouchure de fleuve entre deux saisons à l'aide du test de Wilcoxon.

## **6. Filtration de l'eau pour extraction ultérieure de l'ADN**

La qPCR, méthode indépendante de culture, spécifique et sensible a été utilisée pour la détection et la quantification de gènes de résistance aux agents antimicrobiens (GRAs), des éléments génétiques mobiles (EGMs) et des gènes marqueurs viraux de contamination fécale. Une première étape a consisté en la filtration sous vide de l'eau à travers des filtres en nitrocellulose de 47 mm de diamètre et des membranes de taille de pores de 45 µm (11306-47-----N, Sartorius).

## **7. Extraction de l'ADN pour la qPCR à haut débit**

La qPCR à haut débit a été réalisée sur l'ADN extrait à partir des échantillons totaux d'eau et des isolats d'Enterobacterales BLSE dans ces mêmes échantillons. Le kit DNeasy PowerWater® (14900-100-NF, Qiagen) adapté aux échantillons d'eau a été utilisé pour l'extraction d'ADN directement sur les filtres issus de la filtration des eaux de fleuves. En suivant le protocole du kit, des processus de lyse, centrifugation, puis purification sur colonne ont permis d'obtenir l'ADN total de ces échantillons à concentration d'ADN entre 8 et 25 µg /

mL selon les échantillons. L'ADN total des Enterobacterales BLSE a été extrait à l'aide de l'extracteur Samag 12® (Sacace biotechnologies) en utilisant le kit SaMag® Bacterial DNA Extraction (SM006, Sacace biotechnologies) et en suivant le protocole du kit. Les concentrations d'ADN ont été mesurées à l'aide du Qubit®4 avec le kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Q32850, Life technologies) par la quantification fluorométrique (Invitrogen) selon le protocole du kit et ont été ensuite normalisées à 10 µg / mL. Les échantillons d'eau des fleuves Litani et Ibrahim ne contenaient pas de biomasse suffisante même après prélèvements supplémentaires de 2 L et ont été exclus de l'analyse.

## 8. Gènes ciblés

Seuls des GRAs et gènes de résistance (GRs) aux métaux traces qui peuvent être mobilisés par des EGMs ont été recherchés dans cette étude (Buelow *et al.* 2017 ; Buelow *et al.* 2018). Soixante-neuf gènes de résistance aux antibiotiques ont été ciblés conférant la résistance aux grandes classes d'antibiotiques. Les gènes ciblés sont regroupés en différents groupes de gènes : 14 groupes de gènes de résistance aux antibiotiques (aminosides, chloramphénicol, β-lactamines, polymyxines, tétracyclines, sulfaméthoxazole, triméthoprim, quinolones, streptogramines, méthicilline, vancomycine, bacitracine, pompe à efflux et macrolides), 1 groupe de gènes de résistance aux métaux traces, 1 groupe de gènes d'EGMs comprenant les gènes (*int1*, *int2* et *int3*) d'intégrases intégrons mobiles 1, 2 et 3 (IM1, IM2, IM3), 1 gène du plasmide IncP1 et des gènes spécifiques de transposons, 1 groupe de gènes de résistance au ammonium quaternaire et 1 groupe de gènes marqueurs viraux fécaux (TTV et crAssphage). Spécifiquement, *catB3*, *cat* et *cm1A1* conférant la résistance au chloramphénicol, *aac(3)-Ib*, *aac(3)-IIId*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-IIa*, *aph(3')-III*, *aph(2')-Ib*, *aph(2'')-IId*, *aadE*, *aadA*, *aadB*, *strB*, *spc*, *aph(3')-Ia*, et *strB* conférant la résistance aux aminosides, les gènes de résistance à la bacitracine *bacA\_1* et *bacA\_2*, les gènes de résistance aux macrolides *ermF*, *ermB*, *ermC*, *ermY*, *ermX*, *mefA\_10*, *mefsA* et *macB*, les gènes d'efflux *acrA*, *mdtO*, *TolC*, *mdtL* et *mdtF*, les gènes de résistance aux quinolones *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* et *qnrC*, les gènes de résistance à la vancomycine *vanA* et *vanB*, les gènes de résistance à la tétracycline *tetQ*, *tetW*, *tetM*, *tetO* et *tetB*, les gènes de résistance à la polymyxine/colistine *arnA* et *mcr-1*, les gènes de résistance aux sulfamides *sul1* et *sulA*, les gènes de résistance à la méthicilline *mecA*, streptogramine *vata*, *vatB*, et triméthoprim *dfrA27*, *dfrB1*, *dfrF*. Six gènes de résistance aux



métaux traces ont été ciblés: *cusF*, *copA*, *copD*, *cadA*, *merA* et *czcA*. Les gènes *qacA*, *caqC* et *qacE* de résistances au ammonium quaternaire ont été recherchés.

Les gènes de  $\beta$ -lactamases *cepA*, *cblA*, *cfxA*, *blaTEM*, *blaIMP*, *blaAMPC*, *blaDHA*, *blaCMY-2*, *blaAAC*, *blaSHV*, *blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMI*, *blaBIC-1* et *blaPer-1*, d'éléments transposables *ISSW1*, *ISS1n*, *IS6100*, *IS613*, *IS6 group*, *tn3-tnpA*, *ISCEc9*, *tp614*, du plasmide Inc-P1 et d'intégrases (*intl1*, *intl2* et *intl3*) ont également été ciblés.

Le gène de l'ARN 16 S a été ciblé pour évaluer la densité bactérienne et ainsi quantifier l'abondance relative des GRAs.

Deux gènes correspondant à deux marqueurs viraux spécifiques de contamination fécale humaine : le crAssphage et le TTV ont été aussi recherchés en même temps que les GRAs mais n'ont pas été quantifiés.

La liste complète des couples d'amorces est disponible en annexe 4.

## 9. Conception des amorces

Le programme Primer3<sup>®</sup> a été utilisé pour concevoir les séquences d'amorces des GRAs telle que décrit dans Buelow *et al.* 2020. Une région conservée CPQ\_056 du crAssphage a été ciblée à l'aide d'un couple d'amorces (Ahmed *et al.*, 2018) tandis que la détection du TTV a été réalisée par le couple d'amorces Pan-Human TTV (Ssemadaali *et al.* 2016) afin de détecter la contamination fécale humaine. Les séquences des amorces se trouvent en annexe 4.

## 10. qPCR à haut débit

Une PCR à temps réel et à haut débit a été réalisée à l'aide du système microfluidique Biomark™ de Fluidigm associant 96 couples échantillon-gène et permettant la quantification des gènes à l'aide d'un système de circuits fluidiques intégrés (IFC) 96,96 Dynamic Array™ (BMK-M-96.96, Fluidigm). La pré-amplification, le chargement des puces, les cycles thermiques et l'imagerie en temps réel ont été réalisés selon le protocole du fabricant à l'exception de la température d'hybridation qui a été ajustée à 56 ° C au laboratoire UMR Inserm 1282, Tours. Pour chaque couple d'amorces, trois réplicats techniques sont amplifiés

pour valider et confirmer le résultat. Une valeur de cycle de seuil (CT) de 20 a été définie comme limite de détection. La détection des GRAs a été confirmée lorsque deux réplicats ont été amplifiés.

Une quantité égale à 20 ng de chaque ADN a été initialement préamplifiée (10 min d'initialisation à 95 ° C et 14 cycles de PCR (15 s à 95 ° C et 4 min à 56 ° C)) avec le PreAmp Master Mix (100-5581, Fluidigm) et un pool contenant toutes les amorces ciblant tous les gènes (0.2X de 100 µM), à l'exclusion du couple d'amorces de l'ARNr 16S. L'échantillon préamplifié a ensuite été traité par une exonucléase (M02935, NEB) puis dilué à 1/5.

Un mélange composé de 440 µL 2X TaqMan Master Mix (Applied Biosystem, 4369016), 44 µL de 20X DNA réactif de chargement de l'agent se liant à l'ADN (100-7609, Fluidigm), 44 µL de 20X Evagreen (31000, Biotium) et 132 µL de TE a été préparé pour le chargement dans l'IFC. 6 µL de ce mélange a été distribué dans chaque puit d'une plaque à 96 puits. Puis 2 µL d'échantillon d'ADN préamplifié et dilué ont été ajoutés à chaque puit. Enfin, la plaque a été brièvement vortexée puis centrifugée.

Pour la plaque des détecteurs (couples d'amorces des gènes ciblés), 5 µL de chaque amorce (5 µM pour chaque amorce dans un mélange d'amorces (réactif de chargement de dosage 2X (100-7611, Fluidigm) et Tris EDTA) ont été distribués dans les puits d'une plaque à 96 (96.96 Dynamic Array IFC (SKU-M-96.96, Fluidigm)). Après mise de l'IFC dans le contrôleur IFC HX, 5 µL du mélange d'échantillon d'ADN et du mélange avec 5 µL d'amorces ont été distribués à chaque entrée du 96,96 IFC. Après avoir chargé les amorces et les échantillons dans l'IFC Controller HX, l'IFC a été transféré dans le BioMark. La PCR a été réalisée suivant le protocole suivant : chauffage à 50 ° C, 2 min; 70 ° C, 30 min; 25 ° C, 10 min, démarrage à chaud à 50 ° C, 2 min; 95 ° C, 10 min, suivis de 35 cycles de PCR (95 ° C, 15 s; 56 ° C, 60 s), et fusion (56 ° C, 30 s; 95 ° C, 1 ° C / 3 s). Les résultats de la PCR quantitative en temps réel ont été analysés à l'aide du logiciel d'analyse PCR en temps réel Fluidigm v.4.1.3.

## 11. Quantification des gènes

L'abondance normalisée de chacun des gènes mentionnés ci-dessus par rapport à l'abondance de l'ARNr 16 S ( $Ct_{\text{Gène}} - Ct_{\text{ARNr 16S}}$ ) est obtenue en calculant  $2^{-(Ct_{\text{gène de résistance}} - Ct_{\text{gène de l'ARNr 16 S}})}$  qui représente l'abondance relative de chaque gène ciblé (Buelow *et al.* 2017 ;

Buelow *et al.* 2018 ; Buelow *et al.* 2020). Une moyenne d'abondances normalisées pour chaque groupe de gènes a été calculée pour chaque embouchure aux deux saisons. Les moyennes ont été comparées entre deux saisons pour étudier l'impact de saisons. Le logiciel statistique IBM SPSS Statistics (version 25.0) a été utilisé pour analyser statistiquement les données. La valeur  $p$  estimée est fixée à 0,05. Le test de Wilcoxon a été réalisé pour comparer la variation saisonnière de la moyenne de l'abondance relative pour chaque groupe de gènes. La significativité de la corrélation entre l'abondance relative cumulée des GRAs des différents groupes de GRAs au cours des deux saisons a été évaluée en utilisant le coefficient de corrélation de Spearman.

## **12. qPCR ciblant le crAssphage en simplex**

Une quantification absolue du crAssphage à partir de l'ADN extrait des échantillons totaux d'embouchures a été réalisée par le thermocycleur MX3005P® (Agilent) et utilisant les amorces, la sonde et le fragment d'ADN décrits par Ahmed *et al.* 2018. 2.5 µl d'ADN ont été mélangés à 12.5 µl du Master mix Quantifast® Probe PCR kit (Qiagen, 204256), 0.4 µM de chaque amorce (Eurogentec) et 0.2 µM de sonde (Eurogentec) dans un volume de 25 µl par réaction. Une gamme standard a été préparée de  $10^6$  à 10 copies/µl.

Le mélange réactionnel a été préparé pour tous les échantillons en triplicat puis réparti sur une plaque de 96 puits. La PCR a été réalisée suivant un protocole de 40 cycles (95°C, 3 min ; 60 °C, 30 sec) après une phase initiale de chauffage (95°C, 3 min).

## **B. Résultats**

La pression anthropique au niveau des fleuves majeurs au Liban a été évaluée à travers la détection de bactéries résistantes aux antibiotiques (BRAs), la quantification de gènes de résistance aux agents antimicrobiens (GRAs) horizontalement transférables et l'évaluation de la présence d'indicateurs viraux de contamination fécale. Des échantillons d'eau ont été prélevés des points les plus proches et accessibles à la/ aux source(s) et le long des fleuves jusqu'aux embouchures (Google Maps®) en hiver 2018 et seulement au niveau des embouchures de ces fleuves au printemps 2017. Les résultats de l'étude sont divisés en deux parties. Dans une première partie, le nombre d'UFC dans l'échantillon testé et les espèces correspondantes identifiées d'Enterobacterales, de *Pseudomonas* et de SARM résistants avec les profils de résistance aux antibiotiques d'isolats sélectionnés sont présentés. Les isolats sélectionnés étaient des colonies isolées, morphologiquement distinctes, qui ont poussé sur la gélose sélective additionnée d'antibiotique, repiquées sur gélose Muller-Hinton, identifiées et testées vis-à-vis des antibiotiques. Dans une deuxième partie, le nombre d'UFC dans l'échantillon testé d'espèces résistantes identifiées d'Enterobacterales, de *Pseudomonas* et des SARM détectées par les méthodes de culture au niveau des embouchures des fleuves à deux saisons différentes (printemps 2017 et hiver 2018) sont présentées. Les profils de résistance à différents antibiotiques d'isolats sélectionnés (colonies morphologiquement distinctes ayant poussées sur la gélose sélective additionnée d'antibiotique), repiqués sur gélose Muller-Hinton et identifiés par les méthodes phénotypiques, ont également été effectués et sont présentés dans cette partie. Les résistomes des échantillons totaux d'embouchures et des isolats d'Enterobacterales producteurs de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (E-BLSE) aux deux saisons au niveau des embouchures sont présentés. La deuxième partie comprend aussi les résultats de la détection des marqueurs viraux de contamination fécale, Torque Teno virus (TTV) et crAssphage.

### **1. Étude phénotypique réalisée à partir d'échantillons pris aux points les plus proches et accessibles à (aux) source(s) et le long des fleuves en hiver (janvier 2018).**

En janvier 2018, des échantillons d'un volume de 180 mL (3 pots stériles de 60 mL) ont été prélevés le long des fleuves majeurs libanais dans le but d'évaluer la contamination de ces

fleuves par les Enterobacterales, *Pseudomonas spp.* et SARM résistants en utilisant des méthodes de culture.

### 1.1. Bactéries résistantes sélectionnées par les méthodes de culture sur milieux sélectifs en contexte estuarien des fleuves libanais

Le nombre d'UFC d'Enterobacterales, de *Pseudomonas spp.* et de SARM détectées dans 1 mL d'eau répandue sur des géloses distinctes MacConkey supplémentées par de la ceftriaxone (2mg/L), ertapénème (0.5 mg/L), et céfépime (4 mg/L), et sur gélose Chapman mélangée à de l'oxacilline (4mg/L) ainsi que les espèces correspondantes spécifiquement identifiées en hiver (janvier 2018) sont indiqués dans le tableau 4. Les fleuves et les différents villages correspondant à l'endroit où les prélèvements ont été effectués figurent dans le tableau 4. Les isolats d'E-BLSE et *Pseudomonas spp.* sécrétant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont distingués par un astérisque (\*).

**Tableau 4 : Dissémination des Enterobacterales résistantes, des bactéries résistantes du genre *Pseudomonas* et les SARM dans les fleuves majeurs au Liban au mois de janvier de l'année 2018**

Fleuve	Région	Espèce d'Enterobacterales	<i>Pseudomonas spp.</i>	SARM
Beyrouth	Majdel Tarchich (Point le plus proche de la source)			
	Majdel Tarchich – Dahr El Metn (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Bzebdine (1 <sup>er</sup> affluent)			UFC (4)
	Dlaybeh (1 <sup>er</sup> affluent)	UFC <i>Echerichia coli</i> (1)		
	Beit Meri (1 <sup>er</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Deir Khouna (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10 <sup>3</sup> )	UFC (2) UFC (10 <sup>3</sup> )
	Qanatir Zbeida	UFC <i>Escherichia coli</i> (1) UFC <i>Escherichia coli</i> * (1) UFC <i>Enterobacter cloacae</i> * (1)		UFC (5)
	Jisr El Bacha			
	Embouchure	UFC <i>Hafnia alvei</i> (10 <sup>4</sup> )	UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (1)	
Jawz	Tanourin (Point le plus proche de la source)			
	Beit Chlela		UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1)	

	Bsatin El Assy		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Kaftoun	UFC <i>Escherichia coli</i> (1)		
	Mseilha			
	Embouchure		UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (500) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (500) UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
Ibrahim	Majdal (Point le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)			
	Yanouh (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Afqa (Point le plus proche de la source du 2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Mzarib (2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Janneh			
	Chouein			
	Khdeira			
Al Bared	Jbeil (Embouchure)			
	Fneidek (Point le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)			
	Mechmech (1 <sup>er</sup> affluent)	UFC <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) UFC <i>Enterobacter aerogenes</i> * (1) UFC <i>Escherichia coli</i> (1)	UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (1)	
	Beit Ayoub (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Hrar (2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Al Qorneh (Confluence)	UFC <i>Serratia fonticola</i> (1)		
	Adweh	UFC <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) UFC <i>Escherichia coli</i> (1)		
	Mahmara			
Al Kaleb	Embouchure		UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1) UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Bteghrin (Point le plus proche d'une source)			
	Faraya (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Hrajel (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Kfardebian (Point le plus proche de la source du 2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Mazraat Kfardebian-Bkaatouta (2 <sup>ème</sup> affluent)			
Al Kaleb	Faytroun- Mazraat Kfardebian (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	

			UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Deir Chamra (3 <sup>ème</sup> affluent)			
	Daraya-Deir Chamra (Confluence)			
	Zouk El Kharab			
	Embouchure			
Qadicha	Al Arez (Point le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	UFC <i>Enterobacter aerogenes</i> (1) UFC <i>Pantoea spp</i> 3 (1)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Bcharreh (1 <sup>er</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1)	
	Ehden (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Zgharta (Confluence des 3 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> affluents)			
	Jisr Rachin (3 <sup>ème</sup> affluent)			
	Miryata Rachin (3 <sup>ème</sup> affluent)	UFC <i>Shigella spp</i> (10) UFC <i>Hafnia alvei</i> (99) UFC <i>Hafnia alvei</i> * (1) UFC <i>Hafnia alvei</i> (1)		
	Ardeh (3 <sup>ème</sup> affluent)			
	Deir Nbouh (4 <sup>ème</sup> affluent)	UFC <i>Hafnia alvei</i> * (1)		
	Rachiin (4 <sup>ème</sup> affluent)	UFC <i>Escheirchia coli</i> * (1)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1)	
	Tripoli-Zgharta (Confluence)	UFC <i>Escherichia coli</i> * (1)	UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Tripoli Souk	UFC <i>Pantoea spp</i> 1 (1) UFC <i>Pantoea spp</i> 3 (1) UFC <i>Pantoea spp</i> 4 (1)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	UFC (10)
	Tripoli embouchure			
Aarqa	Gebraïel (Point le plus proche de la source)			
	Qantara		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Aarqa			
	Entrée Qobbit Chamra			
	Sortie Qobbit Chamra	UFC <i>Klebsiella pneumoniae</i> * (1) UFC <i>Escherichia coli</i> (1)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	UFC (4)
	Minieh- Arida	UFC <i>Escherichia coli</i> * (1)		
Embouchure	UFC <i>Klebsiella pneumoniae</i> (49) UFC <i>Klebsiella pneumoniae</i> * (1)			
Al Jan	Hekr El Daher	UFC <i>Klebsiella pneumoniae</i> * (1)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	UFC (1)



		UFC <i>Escherichia coli</i> (1)		
	Embouchure	UFC <i>Escherichia coli</i> (1) UFC <i>Escherichia coli</i> (6)	UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (9) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (1) UFC <i>Pseudomonas putida</i> (10) UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (5)	
Ostuène	Hed (Point le plus proche de la source)			
	Mazraet Baldi (2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Souisseh (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1)	
	Souisseh-Khrebit El Joun (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Khouchah (2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Ain El Zeit (Point le plus proche de la 1 <sup>ère</sup> source)	UFC <i>Enterobacter amnigenus</i> (1)		
	Daouseh (1 <sup>er</sup> affluent)	UFC <i>Salmonella spp</i> (1)		
	Rihanyeh (1 <sup>er</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Tal El Zafer (1 <sup>er</sup> affluent)	UFC <i>Escherichia coli</i> * (1) UFC <i>Enterobacter amnigenus</i> (1) UFC <i>Serratia liquefaciens</i> (1)		
	Koueikhat (Confluence)		UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (1)	
	Tal Abas Al Gharbeh		UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Tal Abas Al Charkeh			
	Masoudieh	UFC <i>Pantoea spp</i> 1 (1)	UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Kneiseh	UFC <i>Escherichia coli</i> (1)		
	Cheikh Zennad			
Embouchure	UFC <i>Enterobacter cloacae</i> (2) UFC <i>Hafnia alvei</i> * (1) <i>Hafnia alvei</i> (3)	UFC <i>Pseudomonas luteola</i> (7) UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1)	UFC (1)	
Zahrani	Mlikh (Point le plus proche de la source)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Louizeh			
	Arab Salim			
	Habouch			
	Hmaileh			
	Hejeh			

	Embouchure			
Damour	Bkhechtay (Point le plus proche de la 1 <sup>ère</sup> source)	UFC <i>Moellerella wisconsensis</i> (1) UFC <i>Escherichia coli</i> * (1)		
	Rejmeh (Point le plus proche de la 2 <sup>ème</sup> source)			
	Bhouara (Confluence des affluents 1 et 2)	UFC <i>Salmnella spp.</i> (1)	UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1) UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1)	
	Chartoun			
	Ghaboun 1	UFC <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Ghaboun 2	UFC <i>Shigella spp</i> * (1)		
	Ramlyeh (Point le plus proche de la 3 <sup>ème</sup> source)			
	Mazraat El Naher (affluent 3)	UFC <i>Escherichia coli</i> (1)	UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Mecherfeh (3 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> * (1)	
	Nabeh El Safa (Point le plus proche de la 4 <sup>ème</sup> source)			
	Wadi El Sett (affluent 4)			
	Rechmaya (affluent 4)			
	Amik (Confluence des affluents 3 et 4)			
	Jisr El Kadi (Confluence des affluents 1,2,3 et 4)			
	Lehbyeh	UFC <i>Escherichia coli</i> (2)		
Embouchure				
Hasbani	Point le plus proche de la source			
	Bohsas			
	Kawkaba			
	Jisr el Chakaa	UFC <i>Enterobacter cloaceae</i> (1)		UFC (10)
	Fardis (Confluence)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Hebarieh (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Hebaryeh-Chebaa (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Al Mairie (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Ain Arab (2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Wazani (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
Assi	Bejjaje (Point le plus proche de la source)			
	Jabouli			
	Jabouli			
	Jabouli			
	Grotte Mar Maroun			
	Ras El Assi			
Hermel 2				

	Hermel 1			
	Choueghir 2			
	Choueghir 1			
Litani	Kaa El Rim (Point le plus proche de la 1 <sup>ère</sup> source)			
	Wadi El Arayech (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Saadnayel 3 (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Saadnayel 2 (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Saadnayel 1 (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Beit Chema (2 <sup>ème</sup> affluent)	UFC <i>Escherichia coli</i> * (1) UFC <i>Escherichia coli</i> * (1) UFC <i>Escherichia coli</i> * (1) UFC <i>Enterobacter aerogenes</i> * (1) UFC <i>Serratia liquefaciens</i> (1)		
	Tamnin (2 <sup>ème</sup> affluent)	UFC <i>Escherichia coli</i> * (1) UFC <i>Escherichia coli</i> * (1) UFC <i>Escherichia coli</i> (1)	UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	
	Dalhameyeh (2 <sup>ème</sup> affluent)		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	UFC (11)
	Faour (2 <sup>ème</sup> affluent)	UFC <i>Enterobacter sakazakii</i> (2) UFC <i>Serratia marcescens</i> * (1) UFC <i>Serratia liquefaciens</i> (1) UFC <i>Enterobacter cloacae</i> * (1) UFC <i>Enterobacter cloacae</i> * (1) UFC <i>Enterobacter cloacae</i> (1) UFC <i>Pantoea spp3</i> * (1) UFC <i>Serratia odorifera</i> * (1)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Jaleila (Confluence)			UFC (25)
	Chtoura		UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) UFC <i>Pseudomonas putida</i> (1)	
	Jdita			UFC (4)
	Mekseh			
	Kab Elias			
	Mansoura			
Ghazeh				
Rawda (Confluence)				
Jib Janin				
Khreizeit				
Qaraoun				
Khardali				

	Teir filsay			
	Arzay			
	Jdeideh			
	Embouchure			
Awali	Fraidis (Point le plus proche de la 1 <sup>ère</sup> source)			
	Mokhtara-Bakaata (1 <sup>er</sup> affluent)			
	Maaser El Chouf (Point le plus proche de la 2 <sup>ème</sup> source)	UFC <i>Pantoea spp 1</i> (1 )	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
	Mokhtara-Baadaran (2 <sup>ème</sup> affluent)			
	Bater (Confluence des affluents 1 et 2)			
	Wadi Jezzin (3 <sup>ème</sup> affluent)			
	Hajyjah-Dalghani (Confluence des affluents 1, 2 et 3)			
	Bisri			
	Alman El Chouf			
	Embouchure	UFC <i>Enterobacter amnigenus</i> (5) UFC <i>Escherichia coli</i> (2)	UFC <i>Pseudomonas fluorescens</i> (3) UFC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10)	
Total (UFC)		10 233	2 089	1 076

Le tableau 4 montre tous les points de prélèvements : ceux dans lesquels les bactéries résistantes ciblées sont retrouvées et ceux exempts de bactéries ciblées. Globalement, les sources ne sont pas contaminées mais les impacts anthropiques augmentent logiquement avec la distance parcourue ; ceci est réflété à travers la détection des bactéries résistantes ciblées.

Au total, 10 234 UFC d'Enterobacterales, 2 089 UFC de *Pseudomonas spp.* et 1076 UFC de SARM ont été détectées sur milieux sélectifs avec antibiotique.

Pour chacun des 155 prélèvements, 1 mL a été étalé sur gélose MacConkey + ceftriaxone (2mg/L), 1 mL a été étalé sur gélose MacConkey + céfépime (4mg/L), 1 mL a été étalé sur gélose MacConkey + ertapénème (0.5mg/L) et 1 mL a été étalé sur gélose Chapman + oxacilline (4mg/L). 95 prélèvements étaient exempts de bactéries résistantes ciblées (Enterobacterales, *Pseudomonas spp.* et SARM) dans l'échantillon testé.

Les résultats obtenus en hiver 2018 dans l'échantillon testé (1 mL) sur milieu sélectif additionné d'antibiotique sont exprimés en UFC dans la partie suivante :

- **Fleuves Assi et Ibrahim**

Aucune bactérie résistante ciblée n'a été détectée au niveau de tous les points d'échantillonnage.

- **Fleuve de Beyrouh**

Les prélèvements au niveau du point le plus proche à la source du fleuve de Beyrouh, à Majdel Tarchich, puis au premier point du premier affluent, à Majdel Tarchich – Deir El Metn, étaient exempts de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon de fleuve testé. Ces deux zones ne sont pas peuplées et sont situées dans la montagne. Bzebdine, Dlaybeh puis Beit Meri sont trois villages consécutifs au niveau du premier affluent du fleuve de Beyrouh et en amont du point de confluence. Les bactéries résistantes ciblées détectées dans les échantillons testés en provenance du fleuve à ces niveaux étaient les suivantes : 4 UFC de SARM, 1 UFC *Escherichia coli* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* respectivement. Deir Khouna est un village traversé par le deuxième affluent du fleuve de Beyrouh et à partir des échantillons pris à ce niveau,  $10^3$  UFC *Pseudomonas aeruginosa* et 1002 UFC de SARM dans l'échantillon testé ont été détectées. Qanatir Zbeida est située en aval du fleuve, après le point de confluence des deux affluents du fleuve de Beyrouh. Un hôpital est établi dans une région surplombant Qanatir Zbeida où les échantillons de fleuve prélevés étaient contaminés par : 2 UFC *Escherichia coli* dont 1 UFC est sécrétrice de BLSE, 1 UFC *Enterobacter cloacae* et 5 UFC de SARM dans l'échantillon testé. Jisr EL Bacha est située plus en aval par rapport à Qanatir Zbeida mais les échantillons à ce niveau étaient exempts de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé. Les prélèvements au niveau de l'embouchure étaient les plus contaminés :  $10^4$  UFC *Hafnia alvei* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon testé.

- **Fleuve Jawz**

Les échantillons en provenance du point le plus proche de la source du fleuve Jawz étaient exempts de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé. Beit Chlela, Bsatn El Assy et Kaftoun sont des villages consécutifs sur le fleuve Jawz. Les bactéries résistantes ciblées retrouvées dans le fleuve à ces niveaux étaient 1 UFC *Pseudomonas putida*, 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC *Escherichia coli* respectivement dans les échantillons testés. À Mseilha, l'habitation est très rare et un barrage est instauré à ce niveau. Les échantillons testés en provenance du fleuve Jawz à Mseilha étaient exempts de bactéries résistantes ciblées. Les échantillons d'embouchure testés étaient le plus contaminés par rapport à ceux de zones en amont du fleuve :  $10^3$  UFC *Pseudomonas aeruginosa* et 1 UFC

*Pseudomonas fluorescens* ont été détectées. Les SARM n'ont pas été détectées au niveau des échantillons du fleuve de Jawz

- **Fleuve Bared**

Aucune des bactéries résistantes ciblées n'a été détectée dans les échantillons du fleuve testés en provenance du point le plus proche de la source du premier effluent du fleuve Bared, Fneidek. Cependant, 1 UFC *Klebsiella pneumoniae*, 1 UFC *Enterobacter aerogenes*, 1 UFC *Escherichia coli* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* sécrétrice de BLSE ont été détectées dans les échantillons testés en provenance de Mechmech, un peu plus en aval. Les bactéries résistantes ciblées n'ont pas été détectées dans les échantillons testés. Mechmech et Beit Ayoub sont des villages ruraux, comprenant des zones agricoles. Hrar est traversée par le 2ème effluent du fleuve Bared et est aussi située dans une zone rurale. Les échantillons du fleuve à Hrar n'étaient pas contaminés par les bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé. Dans les échantillons pris au point de confluence à Qorneh et ensuite à Adweh, 1 UFC *Serratia fonticola* a été détectée dans la première et 1 UFC *Klebsiella pneumoniae* et 1 UFC *Escherichia coli* dans la seconde, dans l'échantillon testé. Les échantillons de Mahmara, plus en aval, étaient exempts de bactéries alors qu'au niveau de l'embouchure, 1 UFC *Pseudomonas putida* et 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* ont été détectées dans les échantillons testés. SARM n'a été détectée à aucun niveau du fleuve Bared.

- **Fleuve Kaleb**

Aucune des bactéries ciblées n'a été détectée dans l'échantillon testé en provenance de Kaleb : au niveau des points les plus proches des sources (à Bteghrin et Kfardebian), du 1<sup>er</sup> affluent (Faraya et Hrajel), du point de confluence des affluents 1 et 2 (Mazraat Kfardebian – Bkaatouta), du 3<sup>ème</sup> affluent (Deir Chamra), du point de confluence des 3 affluents (Daraya – Deir Chamra), de Zouk el Kharab et de l'embouchure. Seul à Faytroun – Mazraat Kfardebian, 3 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* ont été détectées dans l'échantillon testé. Cette région est traversée par le 2<sup>ème</sup> affluent du fleuve et est connue pour une destination de vacances en été comme en hiver. SARM n'a été détectée à aucun niveau du fleuve Bared.

- **Fleuve Qadicha**

Dans les échantillons en provenance du point d'échantillonnage le plus proche de la source du 1<sup>er</sup> affluent de Qadicha ont été retrouvées 1 UFC *Enterobacter aerogenes*, 1 UFC *Pantoea spp3*, 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* dans l'échantillon testé. Bcharreh et Ehden sont deux

villages traversés par le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> affluent respectivement et les échantillons à ce niveau ont été contaminés par 1 UFC *Pseudomonas putida* et 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* respectivement dans l'échantillon testé. Zgharta et Jisr Rachiin sont situées en amont du point de confluence des deux affluents. Les bactéries résistantes ciblées n'ont pas été retrouvées dans l'échantillon testé à ces niveaux. Un 3<sup>ème</sup> affluent traverse Miryata Rachiin et 10 UFC *Shigella spp.*, 100 UFC *Hafnia alvei* dont une UFC (testée) sécrétrice de BLSE et 1 UFC *Hafnia alvei* dans les échantillons testés ont été détectées à ce point. À Ardeh, plus en aval du 3<sup>ème</sup> affluent, les bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé n'ont pas été détectés. Un 4<sup>ème</sup> affluent traverse Deir Nbouh et Rachiin où 1 UFC *Hafnia alvei* sécrétrice de BLSE a été détectée au niveau du premier village et 1 UFC *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE, 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC *Pseudomonas putida* ont été détectées au niveau du 2<sup>ème</sup> village, dans les échantillons testés à chaque fois. Au point de confluence de tous les affluents, à Tripoli- Zgharta, 1 UFC *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon testé ont été retrouvées. Dans la zone du souk de Tripoli, densément peuplée et fréquentée, le fleuve était contaminé par 1 UFC *Pantoea spp1*, 1 UFC *Pantoea spp3*, 1 UFC *Pantoea spp4*, 2 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 10 UFC SARM dans l'échantillon testé. L'embouchure par contre était exempte de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé.

- **Fleuve Aarqa**

Aucune bactérie résistante ciblée n'a été détectée dans les échantillons testés en provenance du point le plus proche de la source d'Aarqa, à Gebrayel. Ceux de Qantara, plus en aval ont été contaminés par 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon testé. Au niveau du village Aarqa et à l'entrée du village Qobbit Chamra, les échantillons du fleuve étaient exempts de bactéries résistantes, cependant en sortant du village, 1 UFC *Klebsiella pneumoniae* sécrétrice de BLSE, 1 UFC *Escherichia coli*, 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 4 UFC SARM ont été détectées dans l'échantillon testé. 1 UFC *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE a été détecté dans l'échantillon testé au point Minieh-Arida. L'embouchure était fortement contaminée : 50 UFC *Klebsiella pneumoniae* dont 1 UFC (testée) sécrétrice de BLSE ont été détectées l'échantillon testé.

- **Fleuve Janoubi**

L'échantillonnage au niveau du fleuve Janoubi n'était possible qu'au niveau de deux points puisqu'il se situe au niveau d'une zone frontalière. À Hekr El Daher, les échantillons de fleuve

ont été contaminés par 1 UFC *Klebsiella pneumoniae* sécrétrice de BLSE, 1 UFC *Escherichia coli*, 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC SARM dans l'échantillon testé. L'embouchure était fortement contaminée : 7 UFC *Escherichia coli*, 10 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dont 1 UFC sécrétrice de BLSE, 10 UFC *Pseudomonas putida* et 5 *Pseudomonas fluorescens* ont été détectées dans l'échantillon testé. Ces deux points sont témoins d'une forte activité de transit de véhicules et constituent en même temps des stations d'armée.

#### - **Fleuve Ostuène**

Les deux premiers points d'échantillonnage au niveau des affluents 1 et 2 étaient exempts de bactéries résistantes ciblées dans les échantillons testés. Ain El Zeit, Daouseh et Rihanyeh sont 3 villages consécutifs traversés par le 2<sup>ème</sup> affluent. Les échantillons testés en provenance de Ain El Zeit étaient contaminés par 1 UFC *Enterobacter amnigenus*, de Daouseh par 1 UFC *Salmonella spp.* et de Rihanyeh par 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa*. Soueisseh, Soueisseh - khreibit El Joun et Kouchah sont aussi trois régions traversées par le 2<sup>ème</sup> affluent du fleuve Ostuène. Les échantillons de Soueisseh étaient contaminés par 1 UFC *Pseudomonas putida* et ceux de Soueisseh – Khreibit EL Joun par 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon testé. À Kouchah, les bactéries résistantes ciblées n'ont pas été détectées dans l'échantillon testé. Au niveau d'un point du 1<sup>er</sup> affluent (à Tal EL Zafer), 1 UFC *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE, 1 UFC *Enterobacter amnigenus*, et 1 UFC *Serratia liquefaciens* ont été détectées alors qu'à Koueikhat, point de confluence des affluents, 2 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dont 1 BLSE ont été détectées dans les échantillon testés. Tal Abbas Al Gharbeh est un village plus en aval. Les échantillons à ce point ont été contaminés par 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* et les échantillons de Tal Abbas Al Charkeh étaient exempts de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé. À Masoudieh, 1 UFC *Pantoea spp1* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* ont été détectées et à Kneiseh, 1 UFC *Escherichia coli* a été détectée dans les échantillons testés. Aucune bactérie résistante ciblée n'a été détectée à Cheikh Zenad alors que les échantillons testés en provenance de l'embouchure étaient fortement contaminés : 2 UFC *Enterobacter cloacae*, 1 UFC *Hafnia alvei* sécrétrice de BLSE, 3 UFC *Hafnia alvei*, 7 UFC *Pseudomonas luteola*, 1 UFC *Pseudomonas putida* et 1 UFC SARM. En général, le fleuve Ostuène traverse des zones rurales, agricoles et hébergeant des réfugiés à proximité du fleuve.

#### - **Fleuve Zahrani**



Curieusement, les échantillons en provenance du fleuve Zahrani étaient exempts de bactéries résistantes ciblées, à l'exception des échantillons en provenance du point d'échantillonnage le plus proche de la source du fleuve, à Mlikh. 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* a été détectée dans l'échantillon testé.

- **Fleuve Damour**

Le point le plus proche de la source du 1<sup>er</sup> affluent de Damour, Bkhechtay, était contaminé par 1 UFC *Moellerella wisconsensis* et 1 UFC *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE alors que les échantillons de Rejmeh, Ramlyeh et Nabeh El Safa, respectivement les points du fleuve les plus proches de la 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> source sont exempts de bactéries résistantes ciblées dans les échantillons testés. À Bhouara, point de confluence des affluents 1 et 2, 1 UFC *Salmonella spp.* et 2 UFC *Pseudomonas putida* ont été détectées dans l'échantillon testé. En aval du point de confluence, à Chartoun, aucune bactérie résistante ciblée n'a été détectée. Plus en aval, à Ghaboun 1, 1 UFC *Klebsiella pneumoniae* et à Ghaboun 2, 1 UFC *Shigella spp.* sécrétrice de BLSE ont été détectées dans les échantillons testés. Au niveau du 3<sup>ème</sup> affluent, à Mazraat El Naher, 1 UFC *Escherichia coli* et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* et à Mecherfeh, 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* sécrétrice de BLSE, sont isolées dans l'échantillon testé. Au niveau du 4<sup>ème</sup> affluent, à Wadi El Sett, Rechmaya et Amik, ainsi qu'au point de confluence des 4 affluents, à Jisr El Kadi, aucune bactérie résistante n'a été détectée dans l'échantillon testé. À Lehbyeh, 2 UFC *Escherichia coli* ont été détectées dans l'échantillon testé. Aucune bactérie résistante n'a été détectée au niveau de l'embouchure. Aucun SARM n'a pas été détectée au niveau des échantillons du fleuve Damour.

- **Fleuve Hasbani**

Les échantillons provenant du point le plus proche de la source du Hasbani n'ont pas contenu de bactéries résistantes ciblées, de même pour les échantillons en provenance de Bohsas et Kawkaba dans les échantillons testés. Au niveau de Jisr El Chakaa, 1 UFC *Enterobacter cloacae* et 10 UFC SARM ont été détectées et à Fardis, 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* a été détectée dans les échantillons testés. Hebaryeh et Hebaryeh - Chebaa sont traversées par un affluent du fleuve et l'échantillon testé à ces niveaux ne contenait pas les bactéries résistantes ciblées. Al Mairie, Ain Arab et Wazani sont traversées par le 2<sup>ème</sup> affluent. 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* a été détectée au niveau d'Al Mairie et 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* a été détectée à Wazani dans le volume d'eau testé.

- **Fleuve Litani**

Les échantillons du fleuve Litani situés au niveau de la partie centrale de fleuve, plus précisément au niveau du 2<sup>ème</sup> affluent du Litani sont les plus contaminés par les Enterobacterales résistantes. Les échantillons en provenance du point le plus proche de la source du 1<sup>er</sup> affluent du Litani, Kaa El Rim, et ensuite au niveau des points d'échantillonnage à Wadi El Arayech et Saadnayel 1, 2 et 3 sont exempts de bactéries dans les échantillons testés. Au niveau du 2<sup>ème</sup> affluent, dans les échantillons du fleuve à Beit Chema ont poussé: 3 UFC *Escherichia coli* sécrétrices de BLSE, 1 UFC *Enterobacter aerogenes*, 1 UFC *Serratia liquefaciens* dans l'échantillon testé. Aussi au niveau du 2<sup>ème</sup> affluent et plus en aval, à Tamnin, 2 UFC *Escherichia coli* sécrétrices de BLSE, 1 UFC *Escherichia coli*, 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* ont été détectées dans l'échantillon testé. À Dalhamyeh, 1 UFC *Pseudomonas fluorescens*, 11 UFC SARM ont été détectées dans l'échantillon testé. À Faour, également au niveau du 2<sup>ème</sup> affluent, ont été isolées 2 UFC *Enterobacter sakazakii*, 1 UFC *Serratia marcescens* sécrétrice de BLSE, 2 UFC *Enterobacter cloacae* sécrétrices de BLSE, 1 UFC *Enterobacter cloacae*, 1 UFC *Pantoea spp3*, 1 UFC *Serratia odifera* sécrétrice de BLSE et 2 UFC *Pseudomonas fluorescens* dans l'échantillon testé. Au niveau du point de confluence des deux affluents, à Jaleila, une contamination par 25 UFC SARM a été détectée dans l'échantillon testé. Les échantillons à Chtoura ont contenu 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 1 UFC *Pseudomonas putida* l'échantillon testé. Les zones aux alentours de la partie moyenne du fleuve Litani constituent des zones agricoles et de concentration de réfugiés. Les échantillons prélevés sur le cours du fleuve, à Jdita, Mekseh, Kab Elias, Mansoura, Ghazeh, Rawda, Jib Janin, Khreizet, Khardali, Teir filsy, Arzay, Jdeideh, et au niveau de l'embouchure sont exempts de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testée ; ces zones sont en majorité agricoles.

#### - **Fleuve Awali**

Les échantillons du point le plus proche de la source du 1<sup>er</sup> affluent à Fraidis n'ont pas contenu de bactéries résistantes ciblées alors que ceux du point le plus proche de la 2<sup>ème</sup> source, à Maaser El Chouf, ont contenu 1 UFC *Pantoea spp1* et 1 UFC *Pseudomonas fluorescens* dans l'échantillon testé. Mokhtara Baadaran est traversée par le 2<sup>ème</sup> affluent du fleuve et Bater est située à la confluence des affluents. Wadi Jezzin se trouve au niveau du 3<sup>ème</sup> affluent et Hajyjah – Dalghani se trouve à la confluence de 4 affluents. Les échantillons de Mokhtara Baadaran, Bater, Wadi Jezzin bisri, et Hajyjah – Dalghani n'ont pas contenu de bactéries résistantes ciblées ainsi qu'au niveau d'Alman el Chouf, plus en aval dans l'échantillon testé.

Un camp militaire se trouve en zone côtière à proximité de l'embouchure du fleuve Awali. L'échantillon en provenance de l'embouchure du fleuve Awali a été le plus contaminé : 5 UFC *Enterobacter amnigenus*, 2 UFC *Escherichia coli*, 3 UFC *Pseudomonas fluorescens* et 10 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon testé. SARM n'a été détecté dans aucun des échantillons du fleuve Awali.

Les Enterobacterales résistantes le plus fréquemment détectées dans l'échantillon testé étaient des *Escherichia coli* (dans 19 échantillons), suivies de *Klebsiella pneumoniae* (dans 6 échantillons), puis d'*Enterobacter cloacae* et *Hafnia alvei* (dans 4 échantillons chacune), ensuite d'*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Pantoea spp 1* et *Pantoea spp 3* (dans 3 échantillons chacune), de *Salmonella spp.* et *Shigella spp.* (dans 2 échantillons chacune) et enfin de *Pantoea spp. 2* (dans 1 échantillon). Les bactéries résistantes du genre *Pseudomonas* le plus fréquemment testées étaient *Pseudomonas fluorescens* (dans 24 échantillons), suivi de *Pseudomonas aeruginosa* (dans 18 échantillons), puis de *Pseudomonas putida* (dans 8 échantillons) et enfin de *Pseudomonas luteola* (dans 1 échantillon).

L'abondance en SARM était le plus élevé au niveau du fleuve de Beyrouth à Deir Khouna reflétant une forte contamination par du SARM et un impact anthropique à ce niveau.

### **Dissémination des isolats d'Enterobacterales et de *Pseudomonas* sécréteurs de BLSE au niveau des fleuves en hiver 2018**

Les isolats d'Enterobacterales (24 souches) et de *Pseudomonas* (6 souches) testés qui étaient sécréteurs de BLSE et dont quelques uns étaient en même temps résistants à l'imipénème, en hiver 2018, dans l'échantillon testé (1 mL) étaient répartis comme suit :

Au niveau du fleuve de Beyrouth, 1 UFC *Escherichia coli* et 1 UFC *Enterobacter cloacae* sécrétrices de BLSE ont été détectées à Qanatir Zbeida dans l'échantillon testé. Au niveau du fleuve Bared, 1 UFC *Enterobacter aerogenes* sécrétrice de BLSE et résistante à l'imipénème a été détectée à Mechmech dans l'échantillon testé. Au niveau du fleuve Qadicha, dans l'échantillon testé en provenance de Miryata-Rachin, Deir Nbouh, Rachin et Tripoli-Zgharta,

ont été détectées respectivement : 1 UFC *Hafnia alvei*, 1 UFC *Hafnia alvei*, 1 UFC *Escherichia coli* et 1 UFC *Escherichia coli* sécrétrices de BLSE. La souche de *Hafnia alvei* BLSE à Deir Nbouh était en même temps de résistance intermédiaire à l'imipénème. Au niveau du fleuve Aarqa, 1 UFC *Klebsiella pneumoniae* et 1 UFC *Escherichia coli* sécrétrices de BLSE ont été retrouvées dans l'échantillon testé à la sortie de Qobbit Chamra et Minieh-Arida respectivement. La souche de *Klebsiella pneumoniae* BLSE était aussi résistante à l'imipénème. Au niveau du fleuve Janoubi, 1 UFC *Klebsiella pneumoniae* sécrétrice de BLSE a été retrouvée dans l'échantillon testé à Hekr Daher. Au niveau du fleuve Ostuène, 1 UFC *Escherichia coli* à Tal El Zafer et 1 UFC *Hafnia alvei* au niveau de l'embouchure sécrétrices de BLSE ont été détectées dans l'échantillon testé. À Bkhechtay, 1 UFC *Escherichia coli* et 1 UFC *Shigella spp.* sécrétrices de BLSE ont été retrouvées dans l'échantillon testé du fleuve Damour. Au niveau du fleuve Litani, 3 UFC *Escherichia coli* et 1 UFC *Enterobacter aerogenes* à Beit Chema, 2 UFC *Escherichia coli* à Tamnin, 1 UFC *Serratia marcescens*, 1 UFC *Serratia odorifera*, 2 UFC *Enterobacter cloacae* et 1 UFC *Pantoea spp 3*, sécrétrices de BLSE ont été détectées dans l'échantillon testé. La souche de *Serratia marcescens* BLSE était résistante à l'imipénème.

Les 6 isolats sécréteurs de BLSE du genre *Pseudomonas* étaient disséminés à raison d'1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon testé de l'embouchure du fleuve Beyrouth, 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* à Mechmech dans l'échantillon testé du fleuve Bared, 1 UFC dans l'échantillon testé du fleuve Janoubi à Hekr El Daher, 2 UFC *Pseudomonas aeruginosa* dans l'échantillon testé à Koueikhat au niveau du fleuve Ostuène dont 1 UFC était en même temps résistante à l'imipénème et 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* à Mecherfeh dans l'échantillon testé provenant du fleuve Damour.

### **Détection de BRAs en hiver 2018 et impact anthropique**

Une détection variable d'UFC dans l'échantillon testé (1 mL) de BRAs ciblées en fonction des points d'échantillonnage des fleuves a permis de distinguer et d'identifier des niveaux variés d'impact anthropique comme par exemple la densité de population, l'activité agricole, la présence d'un hôpital à proximité ou une densité de réfugiés associée à une infrastructure insuffisante.

Les BRAs détectées dans l'échantillon testé des embouchures ont constitué une part importante du nombre global de CFU de BRAs détectées. Le nombre d'UFC d'Enterobacterales dans l'échantillon testé était le plus élevé au niveau de l'embouchure du fleuve de Beyrouth (10004 UFC dont  $10^4$  UFC étaient *Hafnia alvei*), suivi par celui retrouvé au niveau du fleuve Qadicha à Myriata- Rachin (119 UFC dont 100 UFC étaient *Hafnia alvei* et 10 UFC étaient *Shigella spp.*). L'embouchure d'Aarqa était en troisième position en termes de nombre d'UFC d'Enterobacterales détectées dans l'échantillon testé (53 UFC dont 50 UFC étaient *Klebsiella pneumoniae*). La section moyenne du fleuve Litani est venue en 4<sup>ème</sup> position (17 UFC). Les nombres d'UFC retrouvés dans l'échantillon testé au niveau de l'embouchure de l'Ostuène (13 UFC dont 7 UFC étaient *Escherichia coli* au niveau de l'embouchure) et de Janoubi (9 UFC dont 7 UFC étaient *Escherichia coli* au niveau de l'embouchure) étaient en 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> position respectivement. Au niveau des fleuves Damour et Awali (8 UFC chacun), les UFC dans l'échantillon testé étaient réparties du point le plus proche de la source et le long du fleuve pour le premier alors que 7 UFC (5 UFC *Enterobacter amnigenus* et 2 UFC *Escherichia coli*) ont été retrouvées au niveau de l'embouchure pour le second. Les 6 UFC d'Enterobacterales détectées dans l'échantillon testé en provenance du fleuve Bared étaient réparties au niveau de 3 points de prélèvements. Alors qu'une UFC d'Enterobacterales a été détectée dans l'échantillon testé à partir d'un point de prélèvement pour chacun des fleuves Jawz et Hasbani.

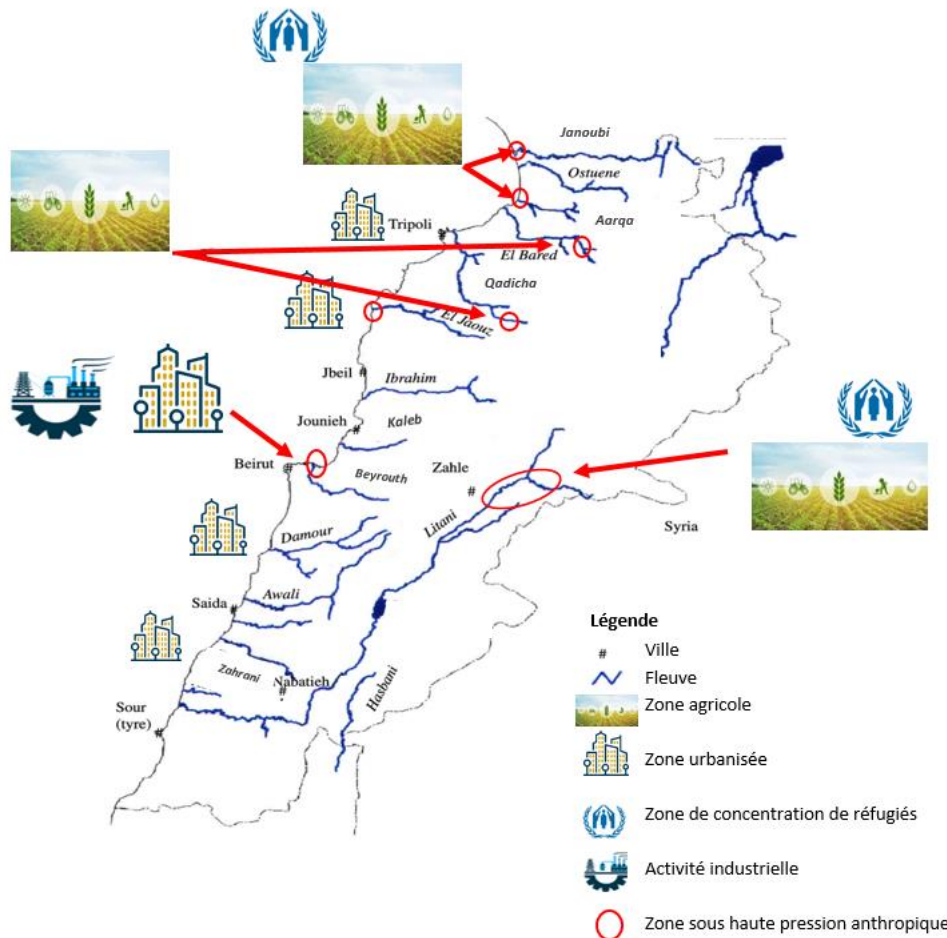
Le nombre d'UFC de *Pseudomonas spp.* détecté dans l'échantillon testé était le plus élevé au niveau de l'embouchure du fleuve Jawz (1003 UFC dont  $10^3$  étaient *Pseudomonas aeruginosa*), suivi de celui au niveau de l'embouchure de Beyrouth (1003 UFC dont  $10^3$  étaient *Pseudomonas aeruginosa*), de l'embouchure de Janoubi (25 UFC au niveau de l'embouchure de 26 UFC au total : 10 UFC *Pseudomonas aeruginosa*, 10 UFC *Pseudomonas putida* et 5 *Pseudomonas fluorescens*), de l'embouchure de l'Ostuène (8 UFC au niveau de l'embouchure de 17 UFC au total : *Pseudomonas putida*), et de l'embouchure d'Awali (14 UFC: 10 UFC *Pseudomonas aeruginosa* et 3 UFC *Pseudomonas fluorescens*). Les bactéries résistantes du genre *Pseudomonas* (8 UFC) ont été détectées à plusieurs niveaux dans l'échantillon testé en provenance du fleuve Qadicha. Au niveau de la section moyenne du Litani, 6 UFC *Pseudomonas spp.* ont été détectées. Les nombre d'UFC détectées au niveau de l'échantillon testé en provenance de Damour (5 UFC), Kaleb (4 UFC au niveau de Faytroun- Mazraat

kfardebian), Hasbani (3 UFC), Aarqa (3 UFC), Bared (3 UFC dont 2 UFC au niveau de l'embouchure) et Zahrani (1 UFC au niveau du point le plus proche de la source) sont venus ensuite.

Des SARM ont pu être détectés dans l'échantillon testé au niveau du fleuve Beyrouth à Deir Khouna ( $10^3$  UFC), au niveau de la section moyenne du fleuve Litani dans la Bekaa (40 UFC), au niveau du fleuve Qadicha dans le souk (10 UFC) et du Hasbani au niveau de Jisr El Chakaa.

Les embouchures de Beyrouth, Aarqa, Ostuène, Janoubi et Awali sont les embouchures les plus anthropisées et ceci se reflète à travers la détection d'un plus grand nombre d'UFC d'Enterobacterales et de *Pseudomonas spp.* résistantes dans l'échantillon testé correspondant. Trois isolats d'Enterobacterales BLSE et un isolat de *Pseudomonas* BLSE, en même temps résistants à l'imipénème, ont été détectés au niveau des embouchures de Bared, Qadicha, Aarqa et d'Ostuène. En effet, les embouchures constituent les réceptacles des affluents sous pression anthropique croissante au fur et à mesure de leur passage à travers les villes et les villages. La section moyenne du fleuve Litani et le fleuve Qadicha à Rachiin-Myriata semblent être pareillement anthropisés suite à une détection d'un grand nombre d'Enterobacterales, de SARM et/ou de *Pseudomonas spp.* résistants dans l'échantillon testé. La zone moyenne du fleuve Litani est sous haute pression anthropique en raison d'une infrastructure insuffisante au niveau des villages avoisinants où vivent en plus des habitants, des réfugiés installés sans organisation adaptée. Des contaminations ponctuelles relativement élevées par des SARM ont pu être mises en évidence suite à la détection dans l'échantillon testé au niveau du fleuve Beyrouth à Deir Khouna, au niveau de la section moyenne du fleuve Litani dans la Bekaa, au niveau du fleuve Qadicha dans le souk et du Hasbani au niveau de Jisr El Chakaa reflétant un impact anthropique à ces niveaux.

La détection des bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé a permis d'identifier des zones sous haute pression anthropique, schématisées dans la figure 15.



**Figure 15 : Schéma représentatif des zones sous haute pression anthropique révélées par la détection de BRAs**

Les points sous haute pression anthropique sont indiqués par des cercles rouges et sont liés à des activités variées : activité industrielle, urbanisation, activité agricole et surpopulation associée à une infrastructure insuffisante.

Des zones sous haute pression anthropique ont été révélées par la détection de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé au niveau de zones rurales agricoles (au niveau de Miryata-Rachiin traversée par le fleuve Qadicha et de Mechmech traversée par le fleuve Bared), en zone côtière Nord agricole et de concentration de réfugiés (embouchures du fleuve Aarqa et du fleuve Janoubi), en zone côtière urbaine (embouchures du fleuve Beyrouth et du fleuve Jawz) et dans la région agricole et de concentration de réfugiés dans la Bekaa (traversée par le fleuve Litani).

## 1.2. Profils de résistance d'isolats bactériens résistants ciblés

Des isolats résistants d'Enterobacterales (62 souches) et de *Pseudomonas* (56) ont été sélectionnés et leur profil de résistance vis-à-vis de huit antibiotiques a été effectué. Les résultats sont exposés en annexe 5.

Sur les 155 prélèvements, 60 (38.71%) contenaient des bactéries résistantes et celles-ci étaient résistantes à aux moins deux des antibiotiques testés.

La résistance des Enterobacterales était la plus élevée vis-à-vis de l'amoxicilline - acide clavulanique : 96.77%, suivie de 95.16% à l'aztréonam, 79.03% au céfépime, 77.41% à la ceftazidime. La résistance était de 22.58% à l'imipénème, 33.87% à la pipéracilline-tazobactam, 38.70% à la gentamicine, et 17.74% à l'amikacine. La résistance de *Pseudomonas spp.* était de 100% à l'aztréonam, 41.07% au céfépime, 7.14% à l'imipénème, 57.17% à la ceftazidime, 42.85 % à la pipéracilline-tazobactam, 25% à la gentamicine, et 14.28% à l'amikacine.

Parmi les 62 isolats d'Enterobacterales et les 56 isolats de *Pseudomonas spp.* sélectionnés pour établir leur profil de résistance, 21 Enterobacterales (33.87%) et 6 *Pseudomonas spp.* (10.71 %) étaient sécrétrices de BLSE.

Des isolats de SARM ont été sélectionnés et leurs profils de résistance vis-à-vis de l'acide fusidique, l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime, la ciprofloxacine et la gentamicine sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5: Résistance (R+I) des isolats de SARM sélectionnés dans les fleuves en hiver**

Fleuve (1 CFU)	Point de prélèvement	Acide fusidique	Sulfaméthoxazole -Triméthoprime	Ciprofloxacine	Gentamicine
<b>Aarqa</b>					
MRSA	Sortie Qobbit Chamra	R	R	R	R
<b>Litani</b>					
MRSA	Dalhamyeh	R	R	S	I
MRSA	Jaleila	R	R	R	I



MRSA		R	I	S	S
MRSA	Jdita	R	R	S	S
MRSA		S	S	R	S
MRSA		S	S	S	I
<b>Ostuène</b>					
MRSA	Hekr El Daher	R	R	S	S
<b>Beyrouth</b>					
MRSA	Bzebdine	R	R	R	R
MRSA	Deir Khouna	R	R	R	R
MRSA		R	R	R	R
MRSA	Qanatir Zbeyda	R	S	I	R
<b>Qadicha</b>					
MRSA	Tripoli Souk	R	R	R	R
<b>Hasbani</b>					
MRSA	Jisr el Chakaa	R	R	R	R

Parmi les 14 isolats de SARM dont les profils de résistance aux antibiotiques testés ont été réalisés, 12 (85.71%) sont résistants à l'acide fucidique, 11 (78.57%) au sulfaméthoxazole-trimétoprime, 9 (64.28%) à la ciprofloxacine et 10 (71.42%) à la gentamicine.

Les conditions d'incubation à 37°C pendant 24h n'étaient pas convenables pour l'évaluation de la résistance des isolats de SARM à la céfoxitine et donc l'étude de la susceptibilité à la céfoxitine nécessite des études supplémentaires pour confirmer les résultats.

## **2. Étude en contexte estuarien et comparaison des résultats entre deux saisons (Printemps 2017 et Hiver 2018)**

### **2.1. Bactéries résistantes sélectionnées par les méthodes de culture sur milieux sélectifs en contexte estuarien des fleuves libanais**

Le nombre d'UFC d'Enterobacterales, de *Pseudomonas* et de SARM détectées dans 1 mL d'eau répandue sur de la gélose MacConkey mélangée à de la ceftriaxone (2mg/L), ou ertapénème (0.5 mg/L), ou céfépime (4 mg/L) et sur de la gélose Chapman mélangée avec de l'oxacilline (4 mg/L) et les espèces correspondantes spécifiquement identifiées par les galeries API® sont indiqués dans le tableau 6 au printemps (avril 2017) et en hiver (janvier 2018). Les isolats d'E-BLSE et *Pseudomonas spp.* BLSE sont présentés dans le tableau 6 et une lettre « a »

en exposant leur a été attribuée. Les isolats résistants à l'imipénème sont marqués par la lettre « b » en exposant. Une analyse du résistome des isolats d'E-BLSE a été réalisée ; une lettre en majuscule en exposant indique les isolats pour lesquels l'analyse du résistome a été effectuée.

**Tableau 6: Espèces d'Enterobacterales, de *Pseudomonas* et de SARM résistantes, détectées au printemps (Avril 2017) et en hiver (Janvier 2018) dans les échantillons d'embouchures des fleuves**

<sup>a</sup> : BLSE

<sup>b</sup> : résistance à l'imipénème

Embouchure de fleuve	Enterobacterales		<i>Pseudomonas spp.</i>		MRSA
	Espèce au printemps (UFC/mL)	Espèce en hiver (UFC/mL)	Espèce au printemps (UFC/mL)	Espèce en hiver (UFC/mL)	Espèce au printemps (UFC/mL)
Janoubi		<i>Escherichia coli</i> (7)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (9) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup> (1) <i>Pseudomonas putida</i> (10) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (5)	
Aarqa	<i>Enterobacter cloacae</i> <sup>Aa</sup> (1) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>Ba</sup> (1) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>Ca</sup> (1) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>Da</sup> (1) <i>Hafnia alvei</i> (1) <i>Hafnia alvei</i> <sup>Ea</sup> (1) <i>Serratia marcescens</i> (1) <i>Serratia liquefaciens</i> <sup>Fa</sup> (1) <i>Serratia liquefaciens</i> <sup>Ga</sup> (1) <i>Salmonella choleraesuis</i> <sup>Ha</sup> (1) <i>Providencia rettgeri</i> (1) <i>Serratia rubidaea</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (49) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>Pa</sup> (1)	<i>Pseudomonas luteola</i> (12) <i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a</sup> (1) <i>Pseudomonas luteola</i> <sup>b</sup> (1) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) <i>Pseudomonas putida</i> (1)		MRSA (11)

	<i>Klebsiella oxytoca</i> <sup>l a b</sup> (1) <i>Pantoea spp.</i> (16)				
<b>Damour</b>	<i>Escherichia coli</i> (1) <i>Escherichia coli</i> <sup>l a</sup> (1)		<i>Pseudomonas luteola</i> (1)		
<b>Ostuene</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> (2) <i>Hafnia alvei</i> <sup>k a</sup> (1) <i>Hafnia alvei</i> (3)		<i>Pseudomonas luteola</i> (7) <i>Pseudomonas putida</i> (1)		MRSA (1)
<b>Zahrani</b>	<i>Serratia liquefaciens</i> <sup>l a</sup> (1) <i>Serratia liquefaciens</i> (2)				
<b>Kaleb</b>			<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a</sup> (1) <i>Pseudomonas luteola</i> (1) <i>Pseudomonas horizihabitans</i> (1)		
<b>Bared</b>				<i>Pseudomonas putida</i> (3) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
<b>Beyrouth</b>	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1) <i>Serratia marcescens</i> (1) <i>Enterobacter cancerogenus</i> (1) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	<i>Hafnia alvei</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Pseudomonas luteola</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a b</sup> (3)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup> (1)	
<b>Qadicha</b>	<i>Serratia marcescens</i> <sup>M a b</sup> (1) <i>Serratia marcescens</i> (1) <i>Hafnia alvei</i> <sup>N a</sup> (1) <i>Cedecea lapagei</i> <sup>O a</sup> (1)		<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a</sup> (1)		
<b>Awali</b>		<i>Enterobacter amnigenus</i> (5) <i>Escherichia coli</i> (2)		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (3) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10)	MRSA (12)

Pour chaque échantillon, 1 mL d'eau a été répandu à chaque fois à la surface de 4 géloses distinctes : gélose MacgConkey mélangée à de la ceftriaxone (2mg/L), ertapénème

(0.5 mg/L), et céfépime (4 mg/L) ainsi que gélose Chapman mélangée à de l'oxacilline (4 mg/L), au printemps et en hiver respectivement. Au total, 50 et 10 064 UFC ont été sélectionnées. Dans l'ensemble, un panel plus diversifié d'espèces d'Enterobacterales résistantes était présent dans les échantillons du printemps. Parmi les 10 064 UFC détectées en hiver,  $10^4$  UFC correspondent à la même espèce bactérienne (*Hafnia alvei*) en contexte estuarien du fleuve de Beyrouth. Les échantillons d'embouchures des fleuves Bared et Kaleb étaient exempts de d'Enterobacterales résistantes au printemps et en hiver.

Par ailleurs, le nombre d'UFC de *Pseudomonas spp.* était de 41 au printemps et de 43 en hiver. L'échantillon testé des fleuves Bared et Zahrani étaient exemptes de bactéries du genre *Pseudomonas* dans les embouchures au printemps et en hiver. *Pseudomonas aeruginosa* a été sélectionnée et identifiée dans les échantillons d'embouchures des fleuves Janoubi (10 UFC) et Beyrouth (1 UFC) en hiver.

SARM a été détecté à raison de 24 UFC au printemps et n'a pas été détecté en hiver dans l'échantillon testé (1 mL) d'embouchures.

La variation du nombre d'UFC des BRAs ciblées dans l'échantillon testé (1 mL) n'a pas démontré de différence significative statistique ( $p$  0,262, 0,123 et 0,109 respectivement dans les trois groupes) entre le printemps et l'hiver.

La pression anthropique en contexte estuarien des fleuves majeurs au Liban est reflétée à travers le nombre d'UFC de BRAs détecté dans l'échantillon testé. Au printemps, l'embouchure la plus contaminée par les Enterobacterales et donc la plus anthropisée était celle d'Arqa (31 UFC dont 16 UFC étaient *Pantoea spp.*), suivi de celle de l'Ostuène (6 UFC), de Beyrouth et Qadcha (4 UFC chacun), Zahrani (3 UFC) et Damour (2 UFC). L'embouchure la plus contaminée par les *Pseudomonas spp.* résistants au printemps était celle de Beyrouth (10003 UFC dont  $10^4$  UFC étaient *Pseudomonas luteola* et 3 UFC *Pseudomonas luteola* sécrétrices de BLSE et résistantes à l'imipénème), suivie de celle d'Arqa (16 UFC), d'Ostuène (8 UFC toutes *Pseudomonas luteola*), de Kaleb (3 UFC), de Damour et Qadicha (1 UFC chacun). SARM a été détecté uniquement au printemps et le nombre d'UFC dans l'échantillon testé a été le plus élevé en zone côtière d'Awali (12 UFC), suivi de celle d'Arqa (11 UFC), et de celle de l'Ostuène (1 UFC). En hiver, l'embouchure la plus contaminée par les Enterobacterales était celle de Beyrouth ( $10^4$  UFC *Hafnia alvei*), suivie de l'embouchure d'Arqa (50 UFC

*Klebsiella pneumoniae* dont 1 UFC testée était sécrétrice de BLSE), de Janoubi (7 UFC *Escherichia coli*) et d'Awali (7 UFC dont 5 UFC étaient *Enterobacter amnigenus*). L'embouchure la plus contaminée par les *Pseudomonas spp.* en hiver était celle de Janoubi (25 UFC dont 20 *Pseudomonas aeruginosa* et 5 *Pseudomonas fluorescens*), suivie d'Awali (13 UFC dont 10 *Pseudomonas aeruginosa*), de Bared (4 UFC dont 3 UFC *Pseudomonas putida*) et de Beyrouth (1 UFC). Ainsi la pression anthropique a été manifeste dans le Nord du pays (Aarqa, Janoubi, Ostuène, Bared et Qadicha), mais aussi au niveau de Beyrouth.

### Profils de résistance aux antibiotiques d'isolats d'Enterobacterales et du genre *Pseudomonas*

Les profils de résistance d'isolats résistants d'Enterobacterales et de *Pseudomonas* sélectionnés vis-à-vis des antibiotiques testés figurent dans le tableau 7.

**Tableau 7: Profils de résistance (I+R) aux antibiotiques d'isolats d'Enterobacterales et de *Pseudomonas spp.* résistants sélectionnés au printemps et en hiver.**

<sup>a</sup> : BLSE

<sup>b</sup> : résistance à l'imipénème

Entérobacterales (1 UFC)	Amoxicilline- acide clavulanique	Céfépime	Imipénème	Ceftazidime	Pipéracilline- tazobactam	Gentamicine	Amikacine	Aztréonam
<b>Janoubi</b>								
<b>Hiver</b>								
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	S	R	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
<b>Aarqa</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Enterobacter cloacae</i> <sup>A a</sup>	R	S	S	R	I	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniaea</i>	S	S	S	I	S	S	S	I
<i>Klebsiella pneumoniaea</i> <sup>B a</sup>	R	R	S	R	I	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniaea</i> <sup>C a</sup>	R	R	S	R	I	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniaea</i> <sup>D a</sup>	R	R	S	R	S	R	S	R
<i>Hafnia alvei</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Hafnia alve</i> <sup>E a</sup>	R	R	S	R	I	S	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Serratia liquefaciens</i> <sup>F a</sup>	R	I	S	R	R	S	S	R
<i>Serratia liquefaciens</i> <sup>G a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R

<i>Salmonella choleraesuis</i> <sup>H a</sup>	R	R	S	I	S	S	S	R
<i>Providencia rettgeri</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Serratia rubidaea</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i> <sup>I a b</sup>	R	R	I	S	S	S	S	R
<i>Pantoea spp.</i>	S	R	S	R	S	S	S	R
<b>Hiver</b>								
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>P a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
<b>Damour</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Escherichia coli</i> <sup>J a</sup>	R	R	S	S	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	S	S	R
<b>Ostune</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Hafnia alvei</i> <sup>K a</sup>	R	R	S	R	R	S	S	R
<b>Zahrani</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Serratia liquefaciens</i> <sup>L a</sup>	R	I	S	I	S	S	S	I
<b>Kaleb</b>								
<b>Bared</b>								
<b>Beyrouth</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Serratia marcescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	I	S	S	S	S	R	S	S
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<b>Hiver</b>								
<i>Hafnia alvei</i>	R	R	S	R	R	S	I	R
<b>Qadicha</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Serratia marcescens</i> <sup>M a b</sup>	R	I	R	R	S	S	S	R
<i>Hafnia alvei</i> <sup>N a</sup>	R	R	S	I	S	S	S	R
<i>Cedecea lapagei</i> <sup>O a</sup>	R	S	S	R	S	S	S	R
<b>Awali</b>								
<b>Hiver</b>								
<i>Enterobacter amnigenus</i>	R	I	S	R	R	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>Pseudomonas spp.</i> (1 UFC)	Amoxicilline-acide clavulanique	Céfépime	Impipénème	Ceftazidime	Pipéracilline- tazobactam	Gentamicine	Amikacine	Aztréonam
<b>Janoubi</b>								
<b>Hiver</b>								

<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
<b>Aarqa</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>b</sup>	R	S	R	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	R	S	S	S
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	I	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a b</sup>	R	I	R	R	R	S	S	R
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<b>Damour</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<b>Ostuene</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	I	S
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	S	S	I
<b>Kaleb</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>Pseudomonas horyzihabitans</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<b>Beyrouth</b>								
<b>Printemps</b>								
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a b</sup>	R	R	R	R	S	S	S	R
<b>Beyrouth</b>								
<b>Hiver</b>								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	S	S	S	R

Qadicha								
Printemps								
<i>Pseudomonas luteola</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	I	S	S	R
Bared								
Hiver								
<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	R	S	S	R
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	S	R	R	S	S	R
Awali								
Hiver								
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	R	R	S	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	R	R	R

Les résistances aux antibiotiques des isolats d'Enterobacterales et de *Pseudomonas* sélectionnées à partir de 1mL répandu sur des géloses distinctes MacConkey mélangées à de la ceftriaxone (2mg/L), ertapénème (0.5 mg/L), et céfépime (4 mg/L) au printemps et en hiver ont varié entre le printemps et l'hiver et sont présentés ci-après.

#### **Profils de résistance aux antibiotiques des espèces d'Enterobacterales**

L'antibiogramme de 27 et 6 isolats d'Enterobacterales au printemps et en hiver respectivement ont été réalisés et la résistance aux différents antibiotiques testés a varié comme suit : 88.88 % (24/27) et 100% (6/6) à l'amoxicilline - acide clavulanique, 59,25% (16/27) et 100% (6/6) au céfépime, 7.40% (2/27) et 0% (0/6) à l'imipénème, 62.96% (17/27) et 83.33% (5/6) à la ceftazidime, 22.22% (6/27) et 66.66% (4/6) à la pipéracilline-tazobactam, 18.52% (5/27) et 16.66% (1/6) à la gentamicine, 7.40% (2/27) et 16.66% (1/6) à l'amikacine, et 77.77% (21/27) et 100% (6/6) à l'aztréonam.

#### **Profils de résistance aux antibiotiques testés des isolats résistants du genre *Pseudomonas***

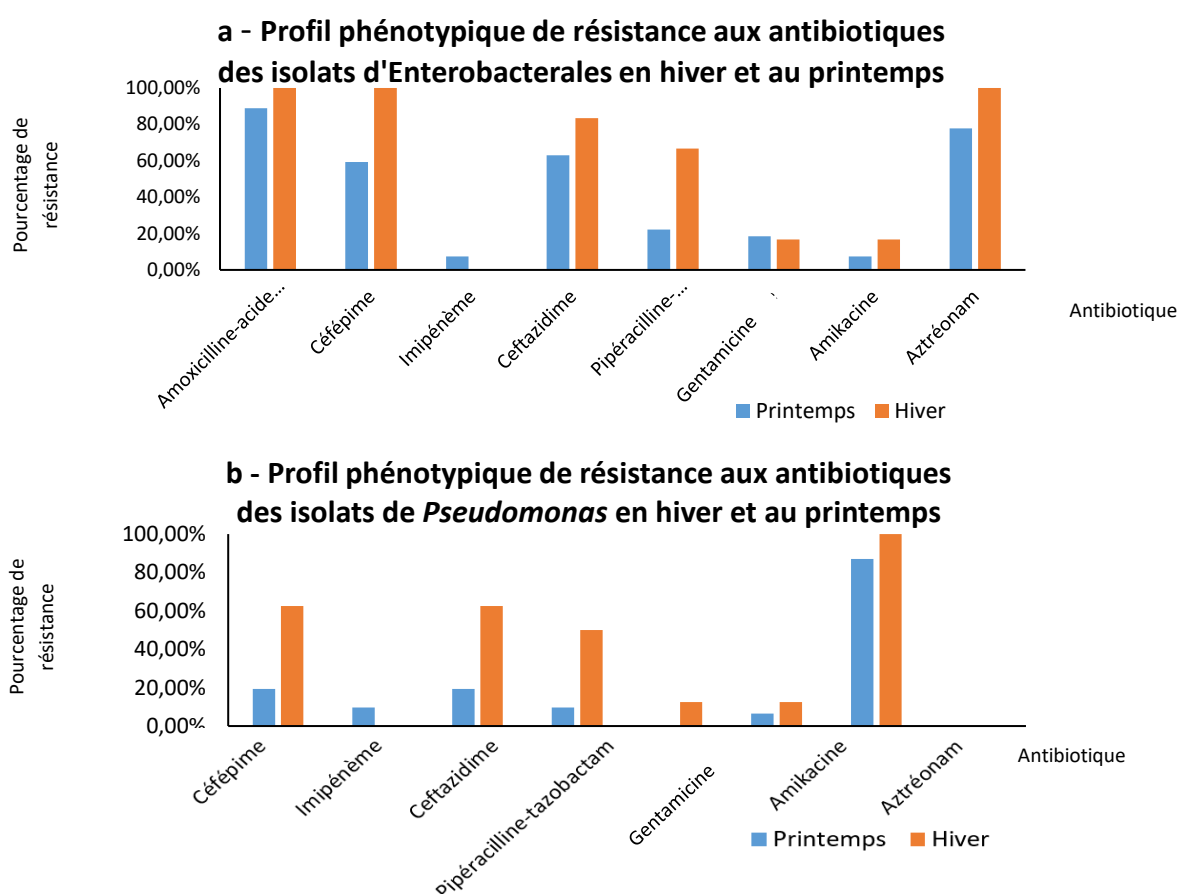
Les profils de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés parmi les isolats de *Pseudomonas spp.* qui ont été étudiés au printemps (31 isolats) et en hiver (8 isolats) respectivement ont montré une résistance de 19.35% (6/31 UFC) et 62.5% (5/8 UFC) au céfépime, 9.67% (3/31 UFC) et 0% (0/8 UFC) à l'imipénème, 19.35% (6/31 UFC) et 62.5% (5/8 UFC) à la ceftazidime, 9.67% (3/31 UFC) et 50% (4/8 UFC) à l'association pipéracilline - tazobactam, 0% (0/31 UFC) et 12.5% (1/8 UFC) à la gentamicine, 6.45% (2/31 UFC) et 12.5% (1/8 UFC) à l'amikacine, et 87.09% (27/31 UFC) et 100% (8/8 UFC) à l'aztréonam.



Tous les isolats de *Pseudomonas spp.* testés au printemps étaient sensibles à la gentamicine (100%).

En hiver, les bactéries résistantes du genre *Pseudomonas* dont le profil de résistance aux antibiotiques a été étudié qui étaient productrices de BLSE étaient les suivantes : 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* à Janoubi, 1 UFC *Pseudomonas aeruginosa* à Beyrouth. Aucune résistance à l'imipénème n'a été détectée parmi les *Pseudomonas* pour les échantillons d'hiver.

Une représentation graphique des résultats des antibiogrammes au printemps et en hiver permet de visualiser les résultats (figure 16).



**Figure 16 : Résistance des isolats testés d'Enterobacterales (a) et de *Pseudomonas spp.* (b) aux antibiotiques au printemps et en hiver**

Le pourcentage de résistance des isolats résistants d'Enterobacterales et de *Pseudomonas* aux antibiotiques testés semble être plus élevé en hiver sauf pour la résistance des Enterobacterales à la gentamicine qui a semblé baisser légèrement du printemps à l'hiver. Aucune souche d'Enterobacterales et de *Pseudomonas* n'était résistante à l'imipénème en hiver.

## Profils de résistance aux antibiotiques des SARM

Les profils de résistance des isolats de SARM sélectionnés vis-à-vis de 5 antibiotiques figurent dans le tableau 8 à partir des échantillons de printemps. Aucun SARM n'a été détecté dans les échantillons d'hiver.

**Tableau 8: Profils de résistance (I+R) aux antibiotiques des SARM au printemps**

Fleuve (1 CFU)	Acide fusidique	Sulfaméthoxazole- Triméthoprim	Vancomycine	Ciprofloxacine	Gentamicine
<b>Ostuene</b>					
SARM	R	S	S	S	S
<b>Aarqa</b>					
SARM	R	S	S	R	S
SARM	R	R	S	S	R
SARM	R	I	S	S	S
SARM	R	R	S	R	R
SARM	R	I	S	S	R
SARM	R	S	S	S	S
SARM	R	S	S	S	S
SARM	R	S	R	S	S
<b>Awali</b>					
SARM	R	S	S	S	S

La résistance à l'acide fusidique a été démontrée pour toutes les bactéries étudiées (100%) alors que pour 4 à l'association sulfaméthoxazole -triméthoprim, 1 à la vancomycine, 2 à la ciprofloxacine et 3 à la gentamicine.

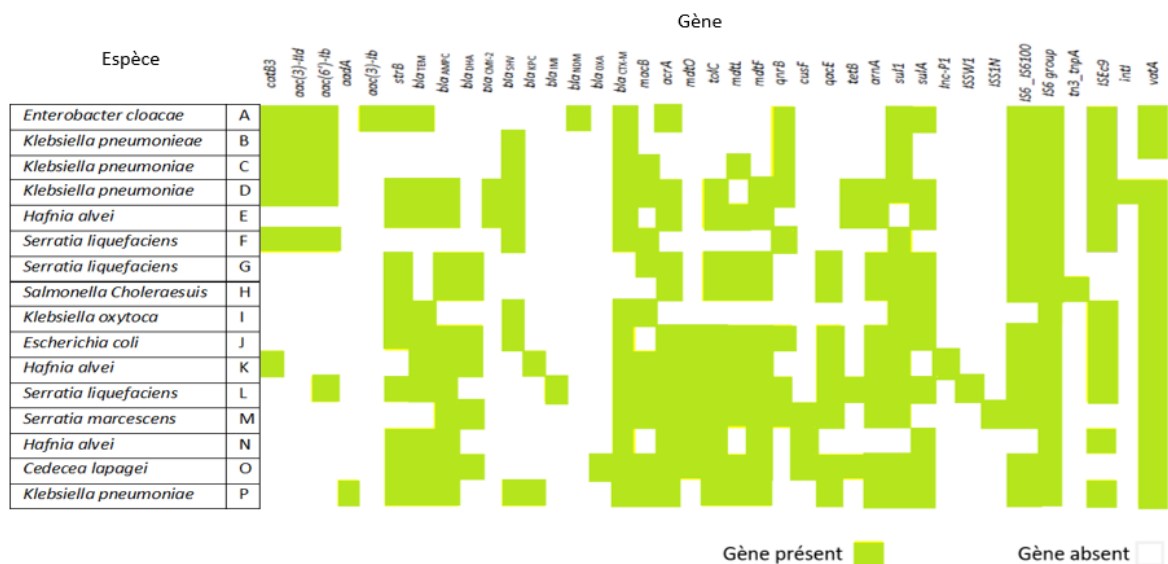
Les conditions d'incubation à 37°C pendant 24h n'étaient pas convenables pour l'évaluation de la résistance des isolats de SARM à la céfoxitine et donc l'étude de la susceptibilité à la céfoxitine nécessite des études supplémentaires pour confirmer les résultats.

### 2.2. Analyse du résistome des Enterobacterales productrices de BLSE détectées en contexte estuarien des fleuves libanais

La réalisation des antibiogrammes pour des isolats d'Enterobacterales résistants sélectionnés à partir de 1mL répandu sur des géloses distinctes MacConkey mélangées à de

la ceftriaxone (2mg/L), ertapénème (0.5 mg/L), et céfépime (4 mg/L), a permis d'identifier ceux présentant une sensibilité diminuée aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> (ceftazidime) et 4<sup>ème</sup> génération (céfépime) et à l'ertapénème. Le test de double disque a permis de visualiser une inhibition de croissance bactérienne en forme de bouchon de champagne entre les disques de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> et l'aztréonam avec le disque contenant l'acide clavulanique et a permis d'identifier parmi les isolats testés ceux qui étaient sécréteurs de BLSE (14 et 1 isolats d'Enterobacterales résistantes au printemps et en hiver respectivement étaient sécréteurs de BLSE). Le résistome des E-BLSE détectées a ensuite été investigué.

Parmi les 92 GRAs, gènes de résistance aux métaux traces et gènes d'éléments génétiques mobiles (EGMs) ciblés au sein des isolats d'E-BLSE testés, 38 gènes ont été détectés comme le montre la figure 17.



**Figure 17:** Les résistomes des E-BLSE détectées au printemps et en hiver à partir de 1 mL d'eau étalé sur MacConkey mélangé à de la ceftriaxone, ertapénème, et céfépime.

La recherche du résistome des isolats d'E-BLSE a permis d'identifier les gènes présents responsables des profils de résistances. Les 38 gènes détectés sont situés en horizontal et les isolats d'E-BLSE en vertical. Une coloration verte témoigne de la présence du gène dans la souche.

Les résultats de la recherche des résistomes des isolats d'E-BLSE (figure 17) se présentent comme suit :

Au printemps, parmi les gènes de β-lactamase, le gène *bla<sub>CTX-M</sub>* était le plus identifié ; 12/14 des isolats étudiés et disséminés dans les embouchures d'Aarqa, Zahrani, Damour,

Ostuène et Qadicha renfermaient le gène *bla*<sub>CTX-M</sub>. Le gène *bla*<sub>SHV</sub> a été retrouvé au sein de 8/14 des bactéries disséminées dans les embouchures d'Aarqa, Damour et Ostuène. En troisième lieu, le gène de céphalosporinase *bla*<sub>DHA</sub> a été identifié chez 6/14 isolats répartis entre les embouchures d'Aarqa, Damour, Ostuène et Qadicha. Le gène de céphalosporinase *bla*<sub>CMY-2</sub> est retrouvé au sein de 2/14 (*Klebsiella pneumoniae* et *Hafnia alvei*) des isolats testés et provenant des échantillons d'embouchure du fleuve Aarqa. Le gène de carbapénémase de la sous famille des OXA-48, *bla*<sub>OXA-48 famille</sub>, était présent au niveau d'un seul isolat (*Cedecia lapagei*) en provenance de l'embouchure de Qadicha alors que le gène de carbapénémase *bla*<sub>NDM</sub> provenait d'une souche (*Enterobacter cloacae*) de l'embouchure d'Aarqa. Le troisième gène de carbapénémase *bla*<sub>KPC</sub> détecté provenait de la souche *Hafnia alvei* de l'embouchure de l'Ostuène. Le gène de BLSE *bla*<sub>IMI</sub> a été détecté chez la souche de *Serratia liquefaciens* résistante à l'imipénème dans l'embouchure de Zahrani. Le gène d'une céphalosporinase plasmidique *bla*<sub>ampC</sub> était présent au sein de 10 isolats testés d'E-BLSE disséminés dans les échantillons des 5 embouchures où les E-BLSE ont été détectées.

Le gène d'EGM *IS6* group était présent dans les 5 embouchures où sont détectées des E-BLSE. Le second gène d'EGM le plus répandu était le gène *IS6* \_*IS6100* MGE. Le gène *ISEc9* d'EGM est aussi largement disséminé dans les 5 embouchures. Les gènes *int11*, *tn3\_tnpA*, *ISSW1*, *ISS1N*, *Inc-P1* identifiés chacun au niveau d'une seule souche, respectivement *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella choleraesuis* toutes deux à Aarqa aussi, *Serratia marcescens* à Qadicha et *Hafnia alvei* à Ostuène. Le gène *sul1* a été détecté au sein de 13/14 des isolats étudiés.

En hiver, une souche (1 UFC) parmi les 50 UFC de *Klebsiella pneumoniae* détectées au niveau de l'embouchure d'Aarqa a contenu les mêmes gènes disséminés au sein des isolats étudiés au printemps : *IS6* \_*IS6100*, *IS6* group, *ISEc9*, *sul1*, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> et *bla*<sub>ampC</sub>.

Les gènes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub> et *bla*<sub>Per-1</sub> n'ont pas été retrouvés au niveau des isolats étudiés au printemps comme en hiver.

### 2.3. Détection et quantification du crAssphage à partir de l'ADN extrait des échantillons d'embouchures au printemps et en hiver

La courbe standard obtenue et son équation figurent dans l'annexe 6. Les nombres de copies du crAssphage dans les échantillons des 10 embouchures au printemps et en hiver sont listés dans le tableau 9.

**Tableau 9 : Résultats de qPCR pour le crAssphage dans les échantillons d'eau des 10 embouchures au printemps et en hiver**

	Ct (dRn)	Copies
<b>St1</b>	<b>13.58</b>	<b>1.00E+06</b>
<b>St2</b>	<b>17.35</b>	<b>1.00E+05</b>
<b>St3</b>	<b>20.91</b>	<b>1.00E+04</b>
<b>St4</b>	<b>24.48</b>	<b>1.00E+03</b>
<b>St5</b>	<b>27.88</b>	<b>1.00E+02</b>
<b>St6</b>	<b>29.94</b>	<b>1.00E+01</b>
Bared1	30.47	1.18E+01
Bared2	30.25	1.38E+01
Ostuene1	30.26	1.37E+01
<b>Ostuene2</b>	<b>29.9</b>	<b>1.75E+01</b>
Aarqa1	30.3	1.33E+01
Aarqa2	30.31	1.32E+01
Janoubi1	30.38	1.26E+01
Janoubi2	30.44	1.21E+01
Zahrani1	30.13	1.50E+01
Zahrani2	30.35	1.28E+01
<b>Damour1</b>	<b>29.52</b>	<b>2.29E+01</b>
Damour2	—	—
<b>Beyrouth1</b>	<b>25.15</b>	<b>4.61E+02</b>
Beyrouth2	30.18	1.45E+01
Kaleb1	30.32	1.32E+01
<b>Kaleb2</b>	<b>29.65</b>	<b>2.08E+01</b>
Awali1	30.42	1.22E+01
Awali2	30.32	1.31E+01
<b>Qadicha1</b>	<b>26.32</b>	<b>2.06E+02</b>
Qadicha2	30.28	1.35E+01
NTC	30.05	1.58E+01

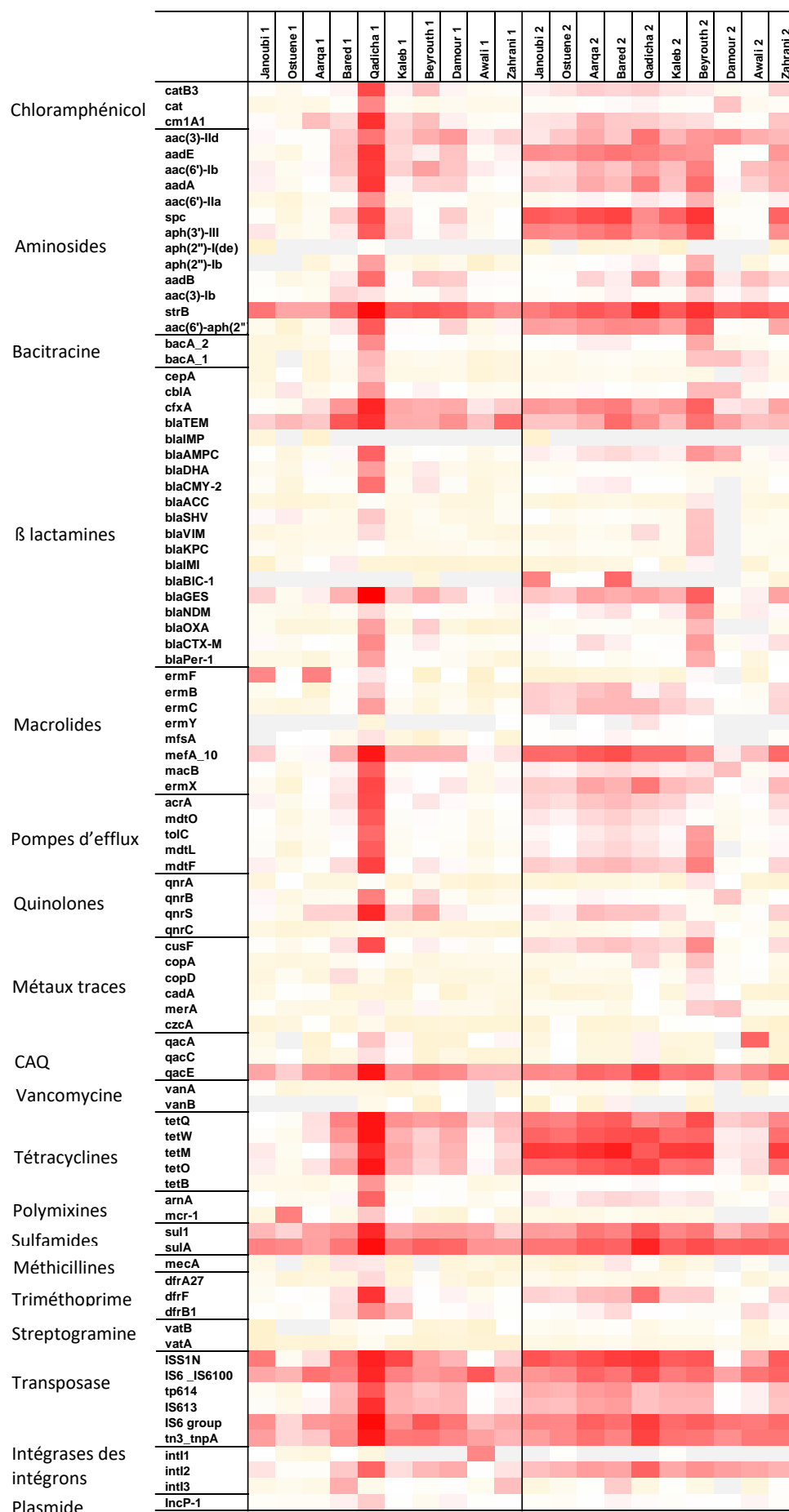
Les noms des embouchures des fleuves sont indiqués dans le tableau 9 par les noms des fleuves correspondants et les numéros 1 et 2 correspondent au printemps (1) et à l'hiver (2). Le « Ct », ou « Cycle Threshold » correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires afin d'atteindre une valeur seuil de fluorescence.

Le Ct des échantillons devrait être supérieur au Ct du témoin négatif (NTC) et supérieur au Ct du standard le plus faible (St6) pour juger de la positivité du résultat. Les valeurs en vert dans le tableau 9 correspondent à des Ct supérieurs à celui du témoin négatif (NTC ; Ct 30.05) et du Ct correspondant au nombre de copies le plus faible de la gamme (St6 ; Ct 29.94).

Le crAssphage est détecté et quantifié dans les embouchures de Damour, Beyrouth et Qadicha au printemps et dans les embouchures d'Ostoune et de Kaleb en hiver. Au niveau de ces points, la contamination fécale humaine est mise en évidence et peut être considérée comme source majeure de contamination par des bactéries fécales.

#### **2.4. Analyse et comparaison du résistome de l'ADN total extrait des échantillons d'embouchures au printemps et en hiver**

Au niveau de chaque embouchure des 10 fleuves faisant l'objet de l'étude du résistome, un prélèvement de 180 ml (dans trois pots stériles de 60 mL chacun) a été effectué et l'ADN total a été extrait. La qPCR à haut débit par le système Fluidigm Biomark® a été réalisée et la concentration normalisée de chaque gène ciblé par rapport au gène de l'ARNr 16S a été calculée. La figure 18 représente à travers les différentes couleurs les abondances normalisées de chaque gène ciblé au printemps et en hiver. L'abondance normalisée est le nombre de copies du gène ciblé rapporté au nombre de copies du gène de l'ARN 16 S.



**Figure 18 : Carte représentant les abondances normalisées de chaque gène ciblé par rapport au gène de l'ARN 16 S 1. au printemps et 2. en hiver au niveau de chaque embouchure.**

Les abondances normalisées des différents gènes de résistance ont varié. La couleur jaune correspond aux abondances faibles, la couleur rouge correspond aux abondances élevées et la couleur blanche correspond aux abondances moyennes. La couleur grise correspond à une absence de détection du gène. Gènes *caq* : gènes conférant la résistance aux composés d'ammonium quaternaire.

La variation entre le printemps et l'hiver de l'abondance normalisée des gènes *sul1* et *int11*, indicateurs de l'antibiorésistance, dans les échantillons d'eau des 10 embouchures, n'était pas statistiquement significative ( $p$  0.109) au niveau de tous les points ; ceci est probablement dû au faible nombre d'échantillons.

**Les GRAs les plus abondants par embouchure au printemps et en hiver**

Les valeurs d'abondances relatives les plus élevées après normalisation avec le nombre de copies du gène codant l'ARN 16 S, au niveau des embouchures sont présentées comme suit :

**- Au printemps**

Dans l'embouchure de Zahrani, l'abondance relative la plus élevée était celle du gène *bla<sub>TEM</sub>* (1.779). Des abondances élevées ont été retrouvées pour les gènes *strB* (0.47), *qacE* (0.137), *tetQ* (0.121), *sulA* (0.44), *IS6-IS6100* (0.203), *IS6* groupe (0.230), *tn3-tnpA* (0.157), et *int13* (0.115)

Les abondances relatives les plus élevées retrouvées au niveau de l'embouchure de Qadicha correspondaient aux gènes suivants : *catB3* (5.091), *cm1A1* (11.291), *aadE* (9.223), *aadA* (9.398), *strB* (38.722), *cfxA* (15.960), *bla<sub>TEM</sub>* (11.390), *bla<sub>GES</sub>* (52.398), *mefA-10* (26.210), *ermX* (5.403), *mdtF* (6.615), *qnrS* (15.026), *qacE* (28.867), *tetQ* (28.878), *tetW* (28.284), *tetO* (26.695), *tetM* (13.714), *sul1* (15.227), *sulA* (36.696), *IS6* groupe (39.335) et *tn3-tnpA* (24.738).

Les abondances relatives les plus élevées retrouvées au niveau de l'embouchure de l'Ostuène correspondaient aux gènes suivants : *strB* (0.258), *bla<sub>TEM</sub>* (0.144), *mrc-1* (0.917), *sulA* (0.642) et *IS6-IS6100* (0.159).



Au niveau de l'embouchure de Kaleb, les abondances relatives les plus élevées correspondaient aux gènes suivants : *strB* (2.438), *cfxA* (0.237), *bla<sub>TEM</sub>* (0.208), *mefA\_10* (0.159), *qacE* (0.390), *tetQ* (0.490), *tetW* (0.177), *tetM* (0.253), *tetO* (0.187), *sul1* (0.212), *sulA* (1.191), *dfrB1* (0.138), *ISS1N* (5.426), *IS6-IS6100* (0.840), *tp614* (0.173), *IS613* (0.163), *IS6* groupe (0.502) et *tn3-tnpA* (1.145).

Les abondances relatives les plus élevées au niveau de l'embouchure de Janoubi correspondaient aux gènes *strB* (1.216), *ermF* (0.675), *qacE* (0.261), *sul1* (0.146), *sulA* (0.830), *ISS1N* (1.087), *IS6-IS6100* (0.244), *IS6* groupe (0.547) et *tn3-tnpA* (0.328).

Au niveau de l'embouchure de Damour, les abondances relatives les plus élevées correspondaient aux gènes *strB* (2.506), *bla<sub>TEM</sub>* (0.512), *qacE* (0.572), *IS6* groupe (1.190), *IS6-IS6100* (0.522), *tn3-tnpA* (0.693) et *sulA* (1.952).

Les abondances relatives les plus élevées retrouvées au niveau de l'embouchure de Beyrouth étaient celles des gènes *aac(6')-Ib* (0.305), *strB* (3.475), *qacE* (0.766), *tetQ* (0.323), *sul1* (0.330), *sulA* (2.475), *ISS1N* (0.341), *IS6-IS6100* (0.367), *IS6* groupe (3.360) et *tn3-tnpA* (1.279).

Au niveau de l'embouchure de Bared, les abondances relatives les plus élevées correspondaient aux gènes *strB* (1.540), *cfxA* (0.420), *bla<sub>TEM</sub>* (3.205), *qacE* (0.530), *tetQ* (0.824), *tetW* (0.435), *sul1* (0.415), *sulA* (1.140), *IS6-IS6100* (0.847), *IS6* groupe (0.505), *tn3-tnpA* (0.623) et *ISS1N* (1.247).

Les abondances relatives les plus élevées au niveau de l'embouchure d'Aarqa étaient celles des gènes suivants : *cm1A1* (1.540), *strB* (0.259), *ermF* (0.863), *qacE* (0.357), *sul1* (0.282), *sulA* (0.293), *IS6-IS6100* (1.358) et *IS6* groupe (0.398).

Les abondances relatives les plus élevées au niveau de l'embouchure d'Awali correspondaient aux gènes : *strB* (0.950), *bla<sub>TEM</sub>* (0.105), *qacE* (0.146), *sul1* (0.266), *sulA* (0.475), *IS6-6100* (3.166), *IS6* groupe (0.114), *tn3-tnpA* (0.292) et *intl1* (0.708).

#### - **En hiver**

Les abondances relatives les plus élevées au niveau de l'embouchure de Zahrani ont été retrouvées pour les gènes *spc* (2.152), *strB* (2.665), *mefA\_10* (1.785), *qacE* (1.582), *tetW*

(1.496), *tetM* (7.564), *tetO* (1.101), *sulA* (2.135), *ISS1N* (2.810), *IS6-IS6100* (2,213), *IS6* groupe (1.685) et *tn3-tnpA* (1,194).

Au niveau de l'embouchure de Qadicha, les abondances relatives les plus élevées correspondaient aux gènes *aac(3)-IId* (1.317), *strB* (13.787), *ISS1N* (9.340), *qacE* (5.436), *tetW* (5.237), *tetM* (2.880), *tetO* (6.405), *sul1* (3.230), *sulA* (17.317), *dfrF* (1.476), *IS6* groupe (7.696), *tn3-tnpA* (6.304), *IS6-IS6100* (4.714), *intI2* (2.280), *mefA-1* (1.674), et *ermX* (1.138).

Les abondances relatives les plus élevées au niveau de l'embouchure de l'Ostuène étaient celles des gènes *tetM* (7.458), *spc* (2.186), *ISS1N* (2.171), *tetW* (1.416), *tetO* (1.380), *sulA* (1.236), *strB* (1.681), et *mefA\_10* (1.606).

Les abondances relatives les plus élevées de gènes au niveau de l'embouchure du fleuve Kaleb étaient les suivants : *tetM* (7.621), *strB* (3.012), *sulA* (2.588), *ISS1N* (2.629), *spc* (2.158), *mefA-10* (1.737), *qacE* (1.233), *tetW* (1.767), *tetO* (1.433), *IS6* groupe (1.702) et *tn3-tnpA* (1.343).

Les abondances relatives les plus élevées retrouvées dans les échantillons de l'embouchure de Janoubi correspondaient aux gènes *mefA-10* (1.842), *tetM* (8.784), *ISS1N* (3.656), *tetW* (2.100), *tetO* (1.448), *sulA* (1.228), et *tetQ* (1.048).

Au niveau de l'embouchure de Damour, les abondances relatives les plus élevées étaient celles des gènes *strB* (2.726), *sulA* (2.305) et *IS6* groupe (1.218).

Les abondances relatives les plus élevées au niveau du fleuve Beyrouth correspondaient aux gènes *tetM* (8.545), *sulA* (4.476), *strB* (10.864), *spc* (9.562), *ISS1N* (3.173), *tetW* (2.019), *tetO* (1.709), *IS6-IS6100* (1.585), *IS6* groupe (2.574), *sul1* (1.068), *tn3-tnpA* (1.163), *tetQ* (4.448), *qacE* (1.542), *bla<sub>GES</sub>* (2.576), *bla<sub>TEM</sub>* (1.352), *cfxA* (2.402), *aac(6')-aph(2'')* (2.478), *aph(3'')-III* (3.822) et *aadA* (1.613).

Les abondances relatives les plus élevées retrouvées au niveau de l'embouchure de Bared étaient celles des gènes *tetM* (20.467), *aadE* (1.255), *ISS1N* (7.507), *spc* (6.219), *mefA-10* (4.310), *tetW* (4.286), *aph(3')-III* (1.562), *strB* (2,175), *bla<sub>TEM</sub>* (1.667), *bla<sub>BIC-1</sub>* (1.8444), *qacE* (1.491), *tetQ* (2.767), *tetO* (3.846), *sulA* (2.266), *IS6- IS6100* (1.258) et *IS6* groupe (1.463).

Au niveau de l'embouchure d'Aarqa, les abondances relatives les plus élevées correspondaient aux gènes *tetM* (11.905), *spc* (4.233), *strB* (3.248), *tetW* (3.109), *mefA\_10* (2.995), *qacE* (1.952), *tetQ* (2.061), *tetO* (2.756), *sul1* (1.112), *sulA* (2.708), *IS6-IS6100* (2.030), *IS* groupe (2.405), *ISS1N* (4.127) et *tn3-tnpA* (1.408).

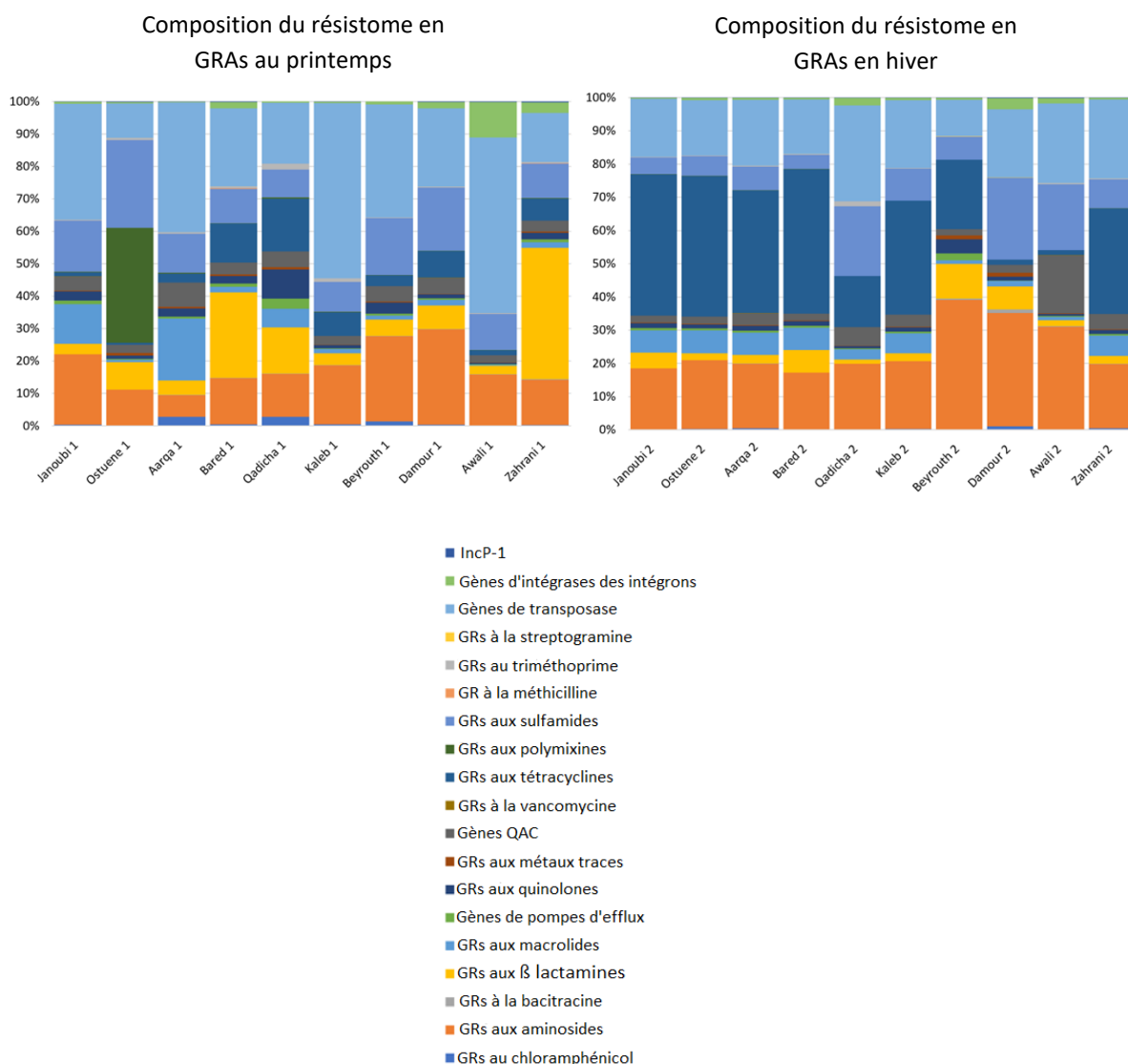
Les abondances relatives les plus élevées retrouvées au niveau de l'embouchure d'Awali étaient celles des gènes *strB* (4.209), *qacA* (2.116), *sulA* (2.673), *IS6-IS6100* (1.257), *IS6* groupe (1.019) et *tn3-tnpA* (1.173).

Au printemps, des abondances relatives élevées étaient retrouvées au niveau de l'embouchure de Qadicha pour 21 gènes, notamment pour le gène *bla<sub>GES</sub>* (52.398).

En hiver, le nombre de gènes retrouvés en grande abondance relative au niveau des embouchures était supérieur à celui du printemps. La valeur la plus élevée d'abondance relative au printemps correspondait au gènes *tetM* (20.467) au niveau de l'embouchure de Bared.

### **Variation de l'abondance normalisée cumulée des groupes de GRAs par embouchure**

La connaissance du résistome des échantillons permet d'évaluer la variation des abondances normalisées des GRAs entre le printemps et l'hiver en groupant les GRAs. La variation de l'abondance normalisée cumulée des groupes de GRAs par embouchure est représentée dans la figure 19.



**Figure 19 : Distribution des abondances normalisées cumulées des GRAs des échantillons d'embouchures**

Représentation graphique des abondances normalisées cumulées de gènes de résistance (GRs) aux agents antimicrobiens dans les embouchures étudiées. Le groupe des EGMs a été divisé en 3 groupes : gènes des intégrases d'intégrons, gènes d'éléments transposables et gène du plasmide Inc-P1. L'ordre des couleurs dans la légende est le même que celui dans les barres.

Au printemps, la signature du résistome des embouchures semble diversifiée alors qu'en hiver, la signature du résistome semble être plus conservée en zone Nord.

D'après la figure 19, l'abondance normalisée cumulée des éléments transposables semble constituer une grande partie des résistomes au niveau des embouchures. La figure 19 montre que les gènes de résistance aux tétracyclines en hiver et les gènes de résistance aux

aminosides aux deux saisons semblent constituer une part importante des résistomes des embouchures. Les abondances normalisées cumulées des gènes de résistance aux sulfamides constituent également une part importante des résistomes des embouchures d'après la figure 19.

### **Variation de la moyenne des abondances normalisées au sein des groupes de GRAs par embouchure**

Une moyenne d'abondance relative a été calculée pour les GRAs pour chaque famille de GRAs au printemps et en hiver. Une étude statistique a permis d'étudier la significativité de la variation des moyennes des abondances relatives pour chaque groupe de gènes entre le printemps et l'hiver. Une variation de la moyenne des abondances normalisées dans les groupes a été significative pour les groupes suivants :

#### **- Les gènes de pompes d'efflux**

La moyenne des abondances normalisées des gènes de résistance dans le groupe des pompes d'efflux a augmenté significativement du printemps à l'hiver dans les embouchures d'Aarqa, Awali, Bared, Kaleb, Ostuène et Zahrani ( $p$  0.043). Une baisse significative a été observée dans l'embouchure de Qadicha ( $p$  0.043) du printemps à l'hiver pour ce groupe de gènes.

#### **- Les gènes de résistance aux tétracyclines**

L'augmentation était significative de la moyenne des abondances normalisées des gènes de résistance aux tétracyclines du printemps à l'hiver dans les embouchures d'Aarqa, Awali, Bared, Beyrouth, Janoubi, Kaleb, Ostuène et zahrani ( $p$  0.043). Une baisse significative a été enregistrée dans les embouchures de Damour et de Qadicha ( $p$  0.043).

#### **- Les gènes de résistance aux aminosides**

La moyenne des abondances normalisées des gènes de résistance aux aminosides était significativement supérieure en hiver dans les embouchures d'Aarqa, Kaleb, et Zahrani ( $p$  0.001), Awali, Beyrouth et Ostuène ( $p$  0.002), Bared ( $p$  0.016) et Janoubi ( $p$  0.023). Une baisse significative a été observées dans l'embouchure de Qadicha ( $p$  0.003).

#### **- Les gènes de $\beta$ -lactamases**

La moyenne des abondances normalisées dans le groupe des gènes de  $\beta$ -lactamases a diminué significativement du printemps à l'hiver dans les embouchures de Damour ( $p$  0.025), Zahrani ( $p$  0.012) et Qadicha ( $p$  0). La moyenne des abondances normalisées dans le groupe des gènes de  $\beta$ -lactamases a augmenté significativement du printemps à l'hiver dans les

embouchures d'Aarqa et Beyrouth ( $p$  0.002), Awali ( $p$  0.003), Bared ( $p$  0.018), Janoubi ( $p$  0.004) et Kaleb ( $p$  0.011).

- **Les gènes des EGMs**

La moyenne des abondances normalisées dans le groupe des EGMs a augmenté significativement dans l'embouchure d'Aarqa ( $p$  0.007), Bared ( $p$  0.021), Janoubi ( $p$  0.021), Ostuène ( $p$  0.005) et Zahrani ( $p$  0.038). La moyenne des abondances normalisées dans le groupe des EGMs a diminué significativement dans l'embouchure de Qadicha ( $p$  0.017).

- **Les gènes de résistance aux macrolides**

La moyenne des abondances normalisées dans le groupe des gènes de résistance aux macrolides a augmenté significativement du printemps à l'hiver dans les embouchures d'Awali ( $p$  0.028), Bared, Zahrani et Beyrouth ( $p$  0.018), Kaleb ( $p$  0.0112), Ostuène ( $p$  0.043). La moyenne a baissé significativement dans l'embouchure de Qadicha ( $p$  0.036).

- **Gènes de résistance aux métaux traces**

La moyenne des abondances normalisées dans le groupe des gènes de résistance aux métaux traces a augmenté significativement du printemps à l'hiver dans l'embouchure de Kaleb ( $p$  0.046) et Beyrouth ( $p$  0.028)

Les variations des moyennes d'abondances normalisées des autres groupes de gènes n'étaient pas statistiquement significatives entre le printemps et l'hiver.

Une augmentation significative de la moyenne des abondances relatives d'un plus grand nombre de groupes de GRAs et EGMs du printemps à l'hiver a été significative au niveau des embouchures. Ceci suggère un possible impact des saisons sur l'augmentation de l'abondance de certains GRAs dans les embouchures étudiées. Cependant, une baisse significative de moyennes d'abondances relatives de groupes de GRAs a été observée au niveau de l'embouchure de Qadicha et de Damour du printemps à l'hiver.

**Détection du marqueur viral de contamination fécale : TTV**

Le gène marqueur du TTV a été détecté dans tous les échantillons contrairement à celui du crAssphage. Cette détection du TTV souligne la contamination fécale dans tous les échantillons testés. L'absence de détection du crAssphage pourrait être due au volume insuffisant d'eau filtrée.

## Étude de la relation entre les abondances normalisées cumulées dans les GRAs et les abondances normalisées cumulées du groupe des EGMs

La relation entre les abondances normalisées cumulées des gènes de résistance dans les différents groupes de gènes et les abondances normalisées cumulées dans le groupe des EGMs dans N=10 embouchures a été étudiée en utilisant le coefficient de Spearman ( $r$ ) au printemps et en hiver. Les résultats figurent dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Coefficient de corrélation  $r$  entre les abondances normalisées cumulées des groupes de GRAs et les abondances normalisées cumulées du groupe des EGMs (a) au printemps et (b) en hiver**

Des corrélations fortes, positives et significatives sont mises en évidence au printemps et en hiver dans le tableau 10 entre les abondances normalisées cumulées de groupes de GRAs et les abondances normalisées cumulées du groupe des EGMs.

		Printemps	Hiver
Gènes de résistance aux aminosides	$r$	0.87	0.89
	P-value	0.00	0.00
Gènes de résistance à la bacitracine	$r$	0.88	0.70
	P-value	0.00	0.03
Gènes de $\beta$ -lactamases	$r$	-0.04	0.81
	P-value	0.91	0.00
Gènes de résistance au chloramphénicol	$r$	0.68	0.73
	P-value	0.03	0.02
Gènes de résistance aux désinfectants	$r$	0.81	0.79
	P-value	0.00	0.01
Gènes de pompes d'efflux	$r$	0.61	0.65
	P-value	0.06	0.04
Gènes de résistance aux métaux traces	$r$	0.58	0.43
	P-value	0.08	0.21
Gènes de résistance aux macrolides	$r$	0.75	0.64
	P-value	0.01	0.05
Gène de résistance à la méthicilline	$r$	0.28	0.09
	P-value	0.43	0.82
Gènes de résistance aux polymixines	$r$	0.56	0.83
	P-value	0.09	0.00
Gènes de résistance aux quinolones	$r$	0.77	0.56
	P-value	0.01	0.09
Gènes de résistance aux streptogramines	$r$	0.82	0.01
	P-value	0.00	0.99
Gènes de résistance au sulfaméthoxazole	$r$	0.82	0.61
	P-value	0.00	0.06
Gènes de résistance aux tétracyclines	$r$	0.78	0.72
	P-value	0.01	0.02
Gènes de résistance au triméthoprime	$r$	0.89	0.66
	P-value	0.00	0.04
Gènes de résistance à la vancomycine	$r$	0.08	0.28
	P-value	0.83	0.43

De fortes corrélations positives et significatives ( $p < 0.05$ ) entre les abondances normalisées cumulées dans le groupe des EGMs avec les abondances normalisées cumulées dans les groupes de gènes de résistance aux aminosides, bacitracine, chloramphénicol, désinfectants, macrolides, tétracyclines et triméthoprimine ont été retrouvées aux deux saisons. Au printemps, la corrélation entre l'abondance normalisée cumulée dans le groupe des EGMs et les abondances cumulées dans les groupes de gènes de résistance était positive, forte et significative ( $p < 0.05$ ) pour les groupes de gènes de résistance aux quinolones, streptogramines et sulfaméthoxazole. En hiver, la corrélation entre les gènes d'EGMs et les abondances cumulées des gènes de  $\beta$ -lactamases, pompes d'efflux et polymixines étaient aussi fortes, positives et significatives ( $p < 0.05$ ).

Les fortes corrélations positives entre les abondances normalisées cumulées des gènes dans les groupes de GRAs avec les abondances normalisées cumulées des gènes dans le groupe des EGMs soulignent le risque de dissémination de la résistance.



## **C.Discussion**

## Impact des saisons

Les montagnes s'étendent du nord au sud du pays, accumulant la neige pendant l'hiver. La neige qui s'accumule sur les montagnes pendant l'hiver fond au printemps, élevant le niveau d'eau des fleuves. Une dilution des contaminants dans les fleuves et une augmentation du niveau d'eau des fleuves au printemps expliqueraient une augmentation significative de l'abondance des GRAs et des EGMs après la saison sèche. Cela coïncide avec les résultats de la présente étude en contexte estuarien. Une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la moyenne des abondances normalisées de plusieurs groupes de GRAs et EGMs dans les échantillons de la majorité des embouchures a été retrouvée du printemps à l'hiver : groupes des gènes de résistance aux aminosides (Aarqa, Awali, Ostuène, Janoubi, Bared, Beyrouth, Zahrani et Kaleb), pompes d'efflux (Aarqa, Awali, Bared, Kaleb, Ostuène et Zahrani), métaux traces (Kaleb et Beyrouth), macrolides (Awali, Bared, Beyrouth, Kaleb, Ostuène et Zahrani), tétracyclines (Aarqa, Awali, Bared, Beyrouth, Kaleb, Janoubi, Zahrani et Ostuène) ainsi que les groupes de  $\beta$  lactamines (Aarqa, Awali, Bared, Beyrouth, Janoubi et Kaleb) et EGMs (Aarqa, Bared, Janoubi, ostuène, et Zahrani). Une baisse significative ( $p < 0.05$ ) des moyennes des abondances normalisées des groupes de GRAs et EGMs (aminosides, macrolides, tétracyclines, EGMs,  $\beta$  lactamines et pompes d'efflux) dans l'embouchure de Qadicha et de 2 groupes de GRAs ( $\beta$  lactamines et tétracyclines) au niveau de l'embouchure de Damour serait attribuée à la baisse de la pression anthropique possiblement associée au déplacement des habitants vers les montagnes en saison chaude.

Le pourcentage de résistance aux antibiotiques des isolats résistants d'Enterobacterales et de *Pseudomonas* testés a semblé augmenter en hiver sauf pour la résistance des Entérobacterales à la gentamicine qui a diminué du printemps à l'hiver.

Invariablement des saisons, les résistances d'*Escherichia coli* à 16 antibiotiques détectées dans l'estuaire de la Seine étaient élevées (30.2% à 56.6%) et similaires à celles des souches d'*Escherichia coli* (48.3%) isolées dans les effluents de la STEU à Rouen déversant les effluents dans l'estuaire (Laroche *et al.* 2009).

## Pression anthropique

### 1- Urbanisation, agriculture, activités récréatives et pression de l'afflux de réfugiés sur les infrastructures

Les eaux de surface subissent une pression accrue due à l'urbanisation et aux activités industrielles et récréatives. D'un autre côté, l'agriculture au niveau des zones côtières et de la Bekaa nécessitent une irrigation avec les eaux de surface et souterraines provoquant l'épuisement des ressources en eau et augmentant la pollution (Maher Salman, Motasem Abukhalaf 2016). La crise syrienne de l'année 2011 a accentué la pollution de l'eau des fleuves en particulier sur la côte nord suite à l'afflux migratoire de personnes déplacées à la recherche de points d'eau et s'y installant pour chercher refuge (Maher Salman, Motasem Abukhalaf 2016). Les déchets solides déversés dans les canaux entraînent l'obstruction des systèmes de drainage augmentent les inondations le long des fleuves pendant l'hiver. De telles inondations surviennent en hiver lors des précipitations (Jaya Divakaran *et al.* 2019) et expliqueraient également l'augmentation significative de GRAs et EGMs dans les échantillons d'embouchures mais surtout au niveau des embouchures dans le Nord du pays (Aarqa et Bared) où l'augmentation significative a été observée pour un nombre plus grand de groupes de GRAs et EGMs.

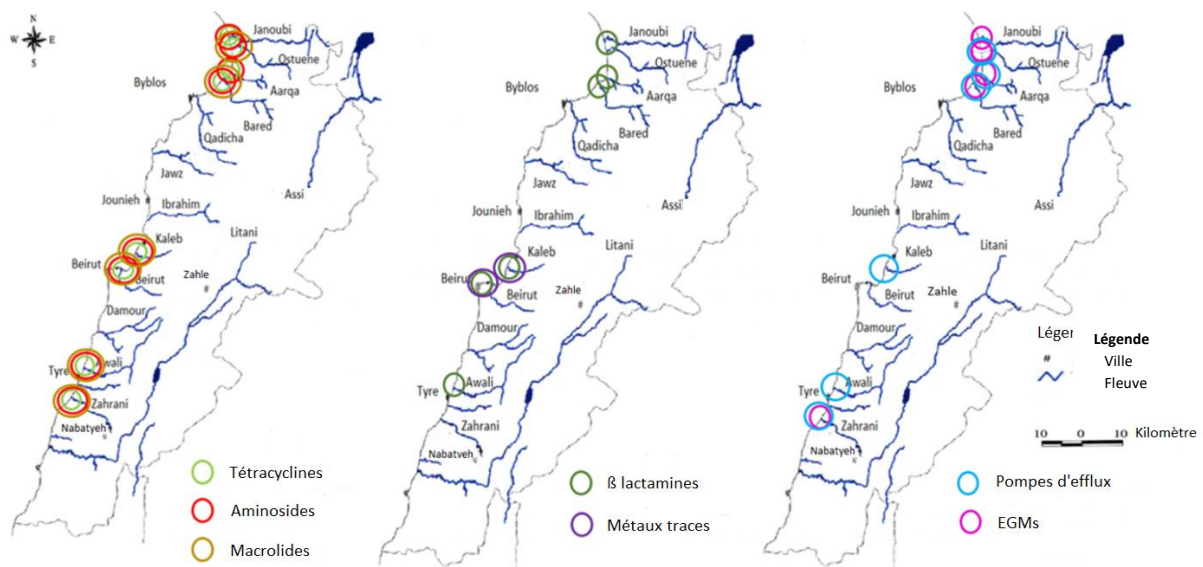
### 2- Contamination fécale

Les eaux usées traitées au Liban sont utilisées pour le fourrage, la production alimentaire et les cultures ligneuses dans les systèmes agricoles et agroforestiers (Maher Salman, Motasem Abukhalaf 2016).

L'abondance normalisée la plus élevée au printemps correspondait au gène *bla<sub>GES</sub>* (52.398) au niveau de l'embouchure de Qadicha, ce qui est à considérer avec une grande attention. L'échantillon d'embouchure pollué avec les plus grandes abondances normalisées des GRAs et EGMs au printemps était celui de l'embouchure de Qadicha (notamment pour les gènes *bla<sub>GES</sub>*, *strB*, *IS6* groupe, *sulA*, *tetQ*, *tetO*, *tetW*, *qacE* et *tn3-tnpA*). L'embouchure de Qadicha est située dans la ville de Tripoli considérée deuxième grande ville du pays (Sidaoui 2017), ce qui, accompagné d'une infrastructure insuffisante et d'un niveau élevé de pollution

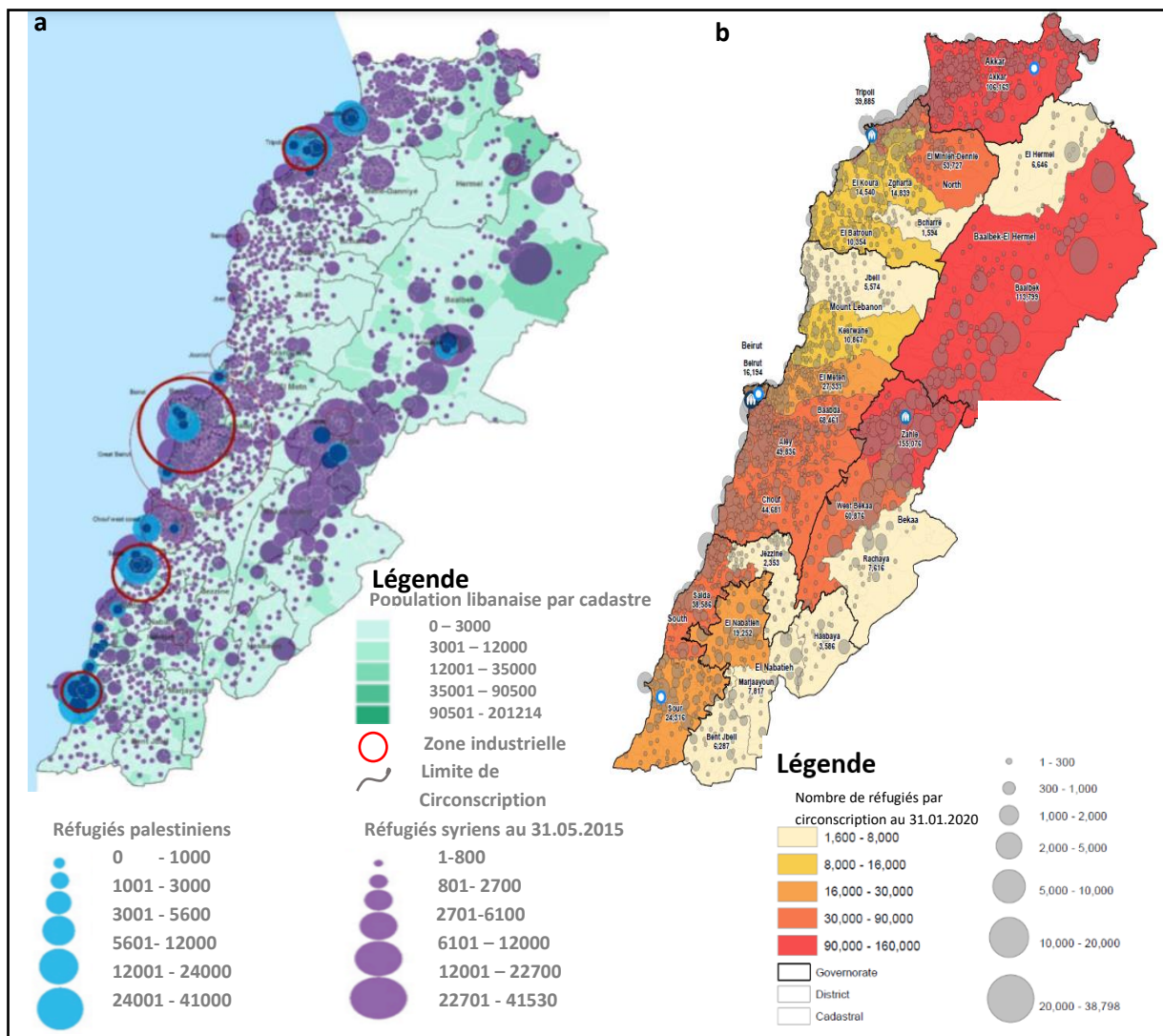
du fleuve Qadicha (Merhabi et al. 2021), expliquerait une pression anthropique et une abondance normalisée cumulée la plus élevée en GRAs à ce niveau au printemps.

L'augmentation significative observée pour un plus grand nombre de groupes de GRAs et EGMs a été retrouvée dans les embouchures d'Aarqa et de Bared dans la zone côtière du Nord du pays (figure 20) qui est majoritairement agricole avec une forte concentration de réfugiés.



**Figure 20:** Représentation graphique montrant les augmentations significatives des moyennes d'abondances normalisées de groupes de GRAs et EGMs du printemps à l'hiver ( $p < 0.05$ ).

La figure 21 montre sur des cartes géostratégiques l'emplacement des zones urbaines, industrielles et de réfugiés au Liban.

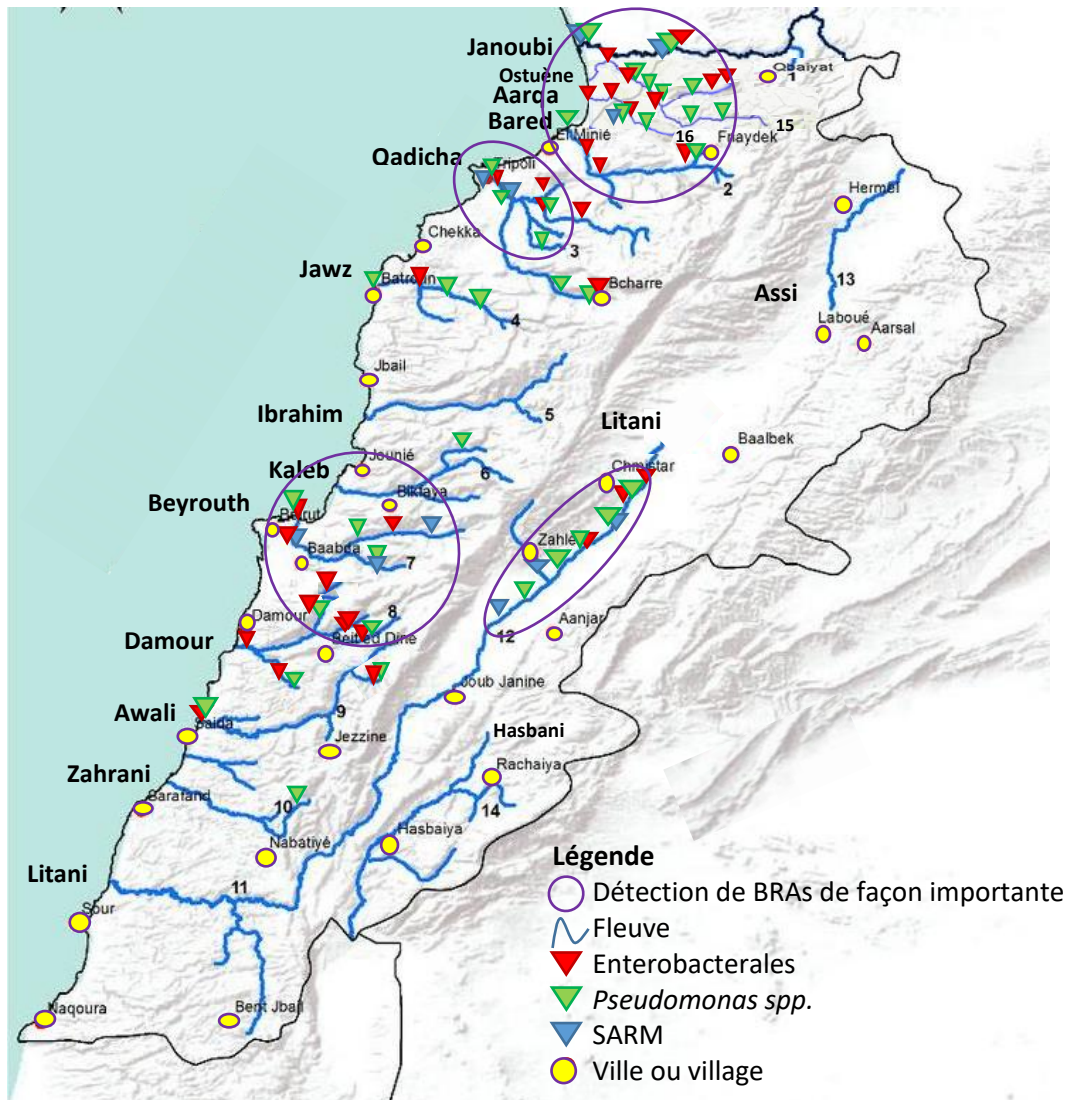


**Figure 21 : a - Cartes géostratégiques du Liban**

a - Carte géostratégique du Liban montrant la répartition de la population libanaise et l'emplacement des camps de réfugiés syriens et palestiniens sur le territoire (UNHCR, UN-habitat 2014). b - Carte géographique du Liban représentant le nombre de réfugiés syriens par circonscription (UNHCR 2020).

Le Liban possède des taux de réfugiés les plus élevés au monde : 476 033 réfugiés palestiniens enregistrés au Liban (au 31 décembre 2019). Environ 45% d'entre eux vivent dans les 12 camps de réfugiés du pays. Plus d'un million de réfugiés syriens se trouvent au Liban, ce qui en fait la proportion de réfugiés par habitant la plus élevée au monde et exerce une pression énorme sur le pays et sa population (UNRWA 2021).

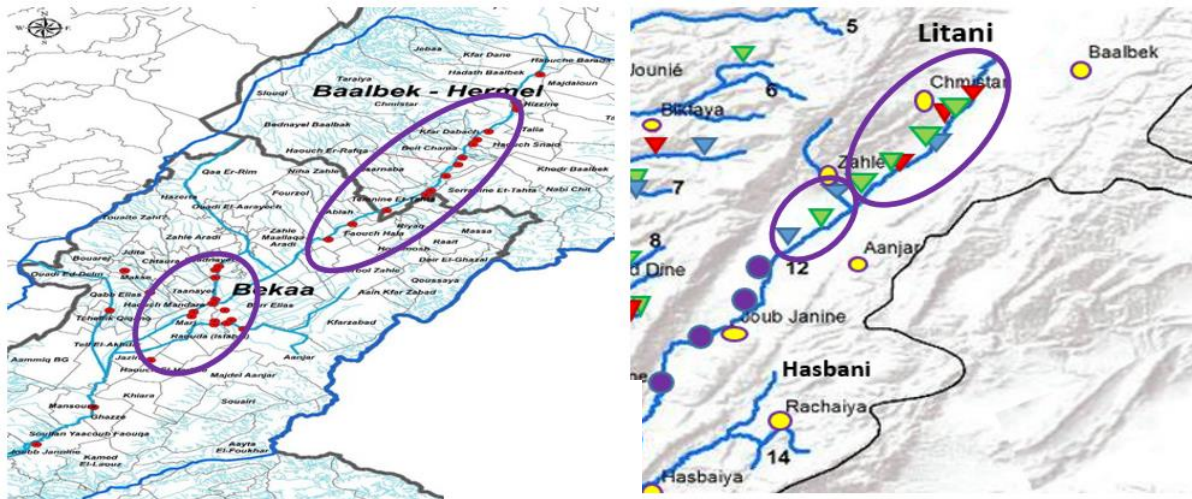
La figure 22 montre sur une carte géographique du Liban la géolocalisation des échantillons où des bactéries résistantes ont été détectées.



**Figure 22 : Géolocalisation des échantillons d'eau où des bactéries résistantes ont été détectées, identifiées et caractérisées phénotypiquement le long des fleuves libanais (Shaban and Hamzé 2017)**

Les grands fleuves étudiés sont numérotés de 1 à 14 dans la figure. La carte originale a été modifiée en ajoutant les fleuves 15 et 16. Sur cette figure prise de Shaban and Hamzé 2017, ont été rajoutés des rectangles rouges, verts et bleus pour représenter les lieux de prélèvements où des Enterobacteriales, *Pseudomonas spp.* et SARM ont été détecté dans le cadre de ce projet.

La figure 23 montre des points de déversements d'eaux usées brutes au niveau du fleuve Litani et les résultats de l'étude de détection de BRAs dans l'échantillon testé.

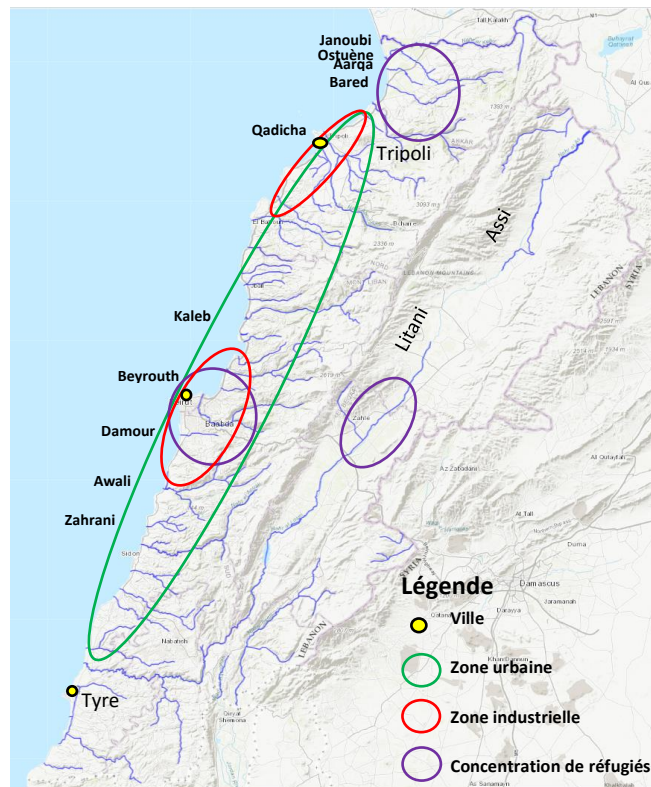


**Figure 23** : Figures représentant la section moyenne du fleuve Litani.

A gauche une représentation graphique montre des points de déversement d'eaux usées brutes au niveau du Litani (Darwish *et al.* 2021). A droite, figurent les résultats de la détection de BRAs ciblées dans l'échantillon testé.

Une similitude entre les deux représentations de la figure 23 permet de suggérer que la détection de BRAs ciblées serait causée par des déversements d'eaux usées brutes.

La figure 24 indique les hautes zones d'impact anthropique et reflète les résultats représentés dans les figures 21, 22 et 23.



**Figure 24 : Les zones d'urbanisation, industrielles et de réfugiés**

Carte géographique de l'« International Steering Committee for Global Mapping » pour la cartographie mondiale et du comité « Majlis al-Waṭanī lil-Buḥūth al-ʿIlmīyah » libanais : Rivers, Lebanon, 2012. <https://maps.princeton.edu/catalog/stanford-wn533df2039> , représentant les fleuves libanais et montrant les grandes zones industrielles (Beyrouth et Tripoli), d'urbanisation et de camps de concentrations de réfugiés.

Globalement pour l'étude menée en hiver 2018 au niveau des fleuves sur le territoire libanais, les prélèvements en provenance des points les plus proches des sources des fleuves (à l'exception de ceux de Damour (Bkhechtay), de Zahrani (Mlikh) et de Qadicha (Al Arez) et de tous les prélèvements des fleuves Ibrahim et Assi ne contenaient pas les bactéries résistantes ciblées (*Enterobacterales*, *Pseudomonas spp.* et SARM) dans le volume testé (1 mL sur MacConkey + ertapénème ; 1 mL sur MacConkey + céfépime ; 1 mL sur MacConkey + ceftriaxone et 1 mL sur Chapman + oxacilline).

En effet, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea spp 3* et *Pseudomonas fluorescens* à Al Arez, *Pseudomonas fluorescens* à Mlikh et *Moellerella wisconsensis* et *Escherichia coli* sécrétrice de BLSE à Bkhechtay ont été détectées dans l'échantillon testé. Une contamination des nappes souterraines pourrait expliquer la contamination en ces zones faiblement peuplées. Le reste des échantillons à la source des fleuves et tous les échantillons des fleuves



Assi et Ibrahim, exempts de bactéries résistantes ciblées dans l'échantillon testé, témoigneraient d'une faible pression anthropique à ces niveaux (figures 21 et 24). Ces résultats sont comparables aux résultats de Dagher *et al.* 2021 dans leur recherche de coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* au niveau des fleuves ; les auteurs ont trouvé des densités d'indicateurs fécaux plus élevées dans les prélèvements en aval par rapport aux échantillons de sources et ces derniers étaient acceptables pour les activités d'irrigation. Dans l'étude de Dagher *et al.* 2021, la majorité des échantillons qui ont présenté une densité de l'indicateur fécal *Escherichia coli* dépassant le seuil acceptable dans les recommandations françaises SEQ-EAU-2003 pour les eaux d'irrigation, se concentrent au Nord (70.4%) et à la Bekaa (60%). De plus, la majorité des échantillons de fleuves prélevés dans la zone Nord (71.4%) n'étaient pas acceptables pour les activités récréatives selon les standards américains EPA (Dagher *et al.* 2021). En France, Touron *et al.* 2007 ont trouvé *Escherichia coli* supérieure aux limites pour les activités récréatives surtout en zone urbanisée impactée par les effluents de STEU. Les auteurs ont trouvé un effet saisonnier dû au débit. Lorsque le débit du fleuve était élevé, l'abondance de *Salmonella* était plus élevée au niveau de la zone la plus en amont de l'estuaire de la Seine (Touron *et al.* 2007).

### **Pertinence du portage de bactéries résistantes aux antibiotiques de la population**

La caractérisation du résistome des E-BLSE en contexte estuarien a révélé la large diffusion du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> dans presque tous les isolats testés en provenance des cinq embouchures où les isolats d'Enterobacterales testés ont été isolés. Les résultats obtenus sont cohérents avec ce qui a été précédemment rapporté à partir d'échantillons d'eau collectés au niveau de 15 sites le long de la côte à Tripoli (Diab *et al.* 2018) ; les Enterobacterales productrices de BLSE détectées dans l'étude de Diab *et al.* 2018 portaient principalement le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Les isolats de *Serratia liquefaciens*<sup>G</sup> et *Salmonella choleraesuis*<sup>H</sup> dans l'embouchure d'Aarqa au printemps ne portaient aucun des gènes de BLSE ciblés et, par conséquent, un plus grand panel de gènes *bla* BLSE pourrait être inclus dans la liste des gènes ciblés pour identifier le gène responsable du profil BLSE. Le gène *mcr-1* n'a pas été détecté dans les isolats d'E-BLSE, contrairement à sa dissémination généralisée dans les fermes d'élevage de volailles (98 % portaient le gène *mcr-1* dans trois fermes d'élevages de

volailles) (Osman *et al.* 2019). Les EGMs les plus répandus parmi les isolats d'E-BLSE étudiés au niveau des embouchures sont l'*IS-IS6100*, le groupe *IS6*, *ISS1N*, et *tn3-tnpA*.

Les taux de résistance des Enterobacterales, contaminants fécaux, reflètent le portage par la population et les animaux de bactéries résistantes vis-à-vis des antibiotiques étudiés. Les Enterobacterales porteuses de gènes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>*, et *bla<sub>VIM</sub>* ont été détectées à l'échelle mondiale au niveau de fleuves impactés par les effluents de STEUs (Bleichenbacher *et al.* 2020 ; Teixeira *et al.* 2020 ; Marathe *et al.* 2017 ; Zhang *et al.* 2019).

L'étude du résistome des isolats d'E-BLSE menée au niveau côtier a permis la détection de 3 Enterobacterales BLSE portant des gènes de carbapénémase (*bla<sub>PKC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* et *bla<sub>OXA-48</sub>* famille) dans les embouchures d'Ostuène, Aarqa et Qadicha respectivement au printemps et une souche d'Enterobacterales portant *bla<sub>KPC</sub>* en hiver dans l'embouchure d'Aarqa, pourtant toutes sensibles à l'imipénème. La présence de ces pathogènes reflète un risque élevé de transmission et d'émergence de ces agents pathogènes aux humains par contact à ces endroits. En effet, les carbapénèmes (ex : ertapénème, imipénème, et méropénème) sont considérés par l'organisation mondiale de la santé des antibiotiques de dernier recours pour traiter les infections sévères causées par les bactéries à Gram négatif multi-résistantes (Teixeira *et al.* 2020 ; Bleichenbacher *et al.* 2020). La résistance aux carbapénèmes constitue de ce fait un risque majeur de santé publique.

Les résistances à l'imipénème des isolats d'Enterobacterales et des *Pseudomonas spp.* isolés à partir des échantillons prélevés en hiver le long des fleuves étaient de 22.58% et de 7.14% à l'imipénème respectivement. Ces pourcentages ne reflètent pas les réelles proportions du portage de gènes de carbapénémases ; ceux-ci peuvent être présents et non exprimés (Karlowsky *et al.* 2017 ; Gill, Asempa, and Nicolau 2020). Les bactéries BLSE ont compté pour 33.87% des Enterobacterales et pour 10.71% des *Pseudomonas spp.* résistantes testées. La susceptibilité à l'ertapénème (carbapénème ayant la plus faible activité contre les Enterobacterales résistantes aux carbapénèmes)(Montiel-Riquelme *et al.* 2020) où l'analyse du résistome des bactéries sécrétrices de BLSE permettrait d'évaluer avec précision le portage de gènes de carbapénémases.

La présence de SARM dans les fleuves manifestant des résistances de 85.71% à l'acide fucidique, 78.57% au sulfaméthoxazole-triméthoprime, 64.28 à la ciprofloxacine et 71.14 %

constitue une menace pour la santé humaine et doit être étroitement surveillée et sérieusement adressée bien qu'elle ne soit pas surprenante vu que des études ont clairement démontré que *Staphylococcus aureus* et SARM persistent dans les échantillons de fleuves anthropisés (Silva *et al.* 2020 ; Tsai *et al.* 2020 ; Ramessar and Olaniran 2019). Les SARM sont résistants à toutes les  $\beta$ -lactamines or la résistance à la céfoxitine n'était pas bien démontrée en raison du phénomène d'hétérorésistance des SARM (R. Singh *et al.* 2019). En effet, les conditions de culture à 37°C pendant 24 heures n'étaient pas adaptées et l'institut « Clinical and Laboratory Standards Institute » recommande de réaliser des cultures à 33-35°C pendant 16-18 heures pour tester la susceptibilité des SARM à la céfoxitine par les disques d'antibiotiques.

Les espèces de bactéries résistantes du genre *Salmonella* isolées au niveau des fleuves Ostuène à Douseh, Damour à Bhouara et de l'embouchure d'Aarqa, ainsi que les bactéries résistantes du genre *Shigella* isolées au niveau du fleuve Qadicha à Miryata-Rachin et au niveau du fleuve Damour à Ghaboun n'ont pas été spécifiquement déterminées à travers les galeries API®. Des tests antigéniques sérologiques (Zhang, Payne, and Lan 2019 ; Wu *et al.* 2019) peuvent être réalisés.

En milieu clinique au Liban, une augmentation des agents pathogènes multirésistants, y compris SARM, *Escherichia coli* BLSE et *Pseudomonas spp.* résistants est enregistrée selon Osman *et al.*, 2019 qui a souligné en parallèle une colonisation des bovins par *Escherichia coli* producteurs de BLSE (portant majoritairement *bla*<sub>CTX-M</sub>) avec une prévalence de 23 % chez les bovins adultes sains. La détection de ces pathogènes en milieu environnemental et dans les fleuves spécifiquement, est préoccupante et souligne un besoin réel d'améliorer les systèmes de gestion des eaux usées et des infrastructures mises en place.

Actuellement, les STEUs au Liban rapportent utiliser principalement des systèmes secondaires, bien que leur niveau de fonctionnement soit indéterminé (Maher Salman, Motasem Abukhalaf 2016).

Des interventions appropriées telles que l'amélioration des systèmes de gestion des eaux usées et des stratégies de surveillance antimicrobienne sont cruciales à mettre en œuvre afin d'atténuer la propagation de la résistance aux antimicrobiens.

## Corrélation entre les EGMs et les GRAs au niveau des embouchures

En Chine, les sédiments de 18 estuaires anthropisés ont été étudiés et 259 gènes de résistance aux agents antimicrobiens (GRAs) ont été ciblés par qPCR à haut débit ; les auteurs ont souligné une forte corrélation entre les GRAs et les EGMs témoignant l'impact humain sur la dissémination de la résistance (Zhu *et al.* 2017). Dans notre étude, la même conclusion peut être tirée vu qu'une forte corrélation positive et significative entre les abondances normalisées cumulées du groupe des gènes d'EGMs et les abondances normalisées cumulées de 10 groupes de GRAs est démontrée au printemps (pour les groupes de gènes de résistance aux aminosides, bacitracine, désinfectants, macrolides, quinolones, streptogramines, chloramphénicol, sulfaméthoxazole, tétracyclines, triméthoprim) comme en hiver (pour les groupes de gènes de résistance aux aminosides, bacitracine,  $\beta$ -lactamines, chloramphénicol, désinfectants, pompes d'efflux, macrolides, polymyxines, tétracyclines et triméthoprim).

### Comparaison entre indicateurs de la résistance

Les différents indicateurs d'antibiorésistance utilisés dans le cadre de ce projet étaient les BRAs (Enterobacterales, *Pseudomonas spp*, SARM), GRAs horizontalement transférables, EGMs et les marqueurs viraux de contamination fécale (crAssphage et TTV). Les indicateurs ont été complémentaires pour indiquer et comparer ponctuellement le niveau de résistance par les agents antimicrobiens. Des stratégies de surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement en général et dans les eaux de surface en particulier par le recours à l'un ou l'autre des indicateurs pourraient être proposées en fonction de l'objectif voulu.

#### - Les BRAs

La détection des BRAs par des méthodes de culture a constitué un excellent indicateur de la pression anthropique et pour identifier les espèces de bactéries pathogènes sur la liste de l'OMS des bactéries à haut risque en clinique mais aussi dans l'environnement. La détection de BRAs était variable en fonction de l'impact anthropique. La densité de population et le niveau élevé de pollution au niveau du fleuve Qadicha par exemple aurait induit une contamination du fleuve par les bactéries résistantes suivantes : *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea spp3*, *Hafnia alvei*, *Shigella spp.*, et *Escherichia coli* parmi les Enterobacterales dont certaines étaient sécrétrice de BLSE, mais aussi *Pseudomonas spp.* et

SARM. La présence d'un hôpital à proximité du fleuve, à Qanatir Zbeida, pourrait expliquer un impact anthropique ; ceci est reflété par la détection à ce niveau d'*Escherichia coli* dont 1 UFC est sécrétrice de BLSE, d'*Enterobacter cloacae* et de SARM au niveau du fleuve de Beyrouth. L'absence/l'inefficacité des traitements des eaux en zone côtière Nord et dans la région agricole de la Bekaa induirait une contamination des fleuves dans ces régions. Plus précisément, au niveau de la région environnante de la section moyenne du fleuve Litani (Beit Chema, Tamnin, Dalhamyeh et Faour), les échantillons étaient le plus contaminés par les Enterobacterales résistants aux antibiotiques ciblés parmi tous les échantillons de fleuves: *Escherichia coli* dont certaines étaient sécrétrices de BLSE, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter sakazakii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* dont 1 UFC sécrétrice de BLSE, *Pantoea spp3*, et *Serratia odifera*. *Pseudomonas spp.* résistantes aux antibiotiques ciblés ainsi que SARM ont été détectées. En zone Nord, un rassemblement de réfugiés, associé à une infrastructure insuffisante, induirait la forte contamination des échantillons des fleuves d'Aarqa, Ostuène et Bared par les Enterobacterales (par ex : *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, et *Serratia fonticola*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*) et *Pseudomonas spp.* dont certaines étaient sécrétrices de BLSE ainsi que par des SARM. Une contamination par les bactéries résistantes recherchées en zones agricoles a été aussi mise en évidence comme par exemple à Mechmech au niveau du fleuve Bared (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sécrétrice de BLSE). Enfin, en zone industrielle, une forte contamination a été retrouvée, comme par exemple au niveau de l'embouchure de Beyrouth contaminée par  $10^4$  UFC *Hafnia alvei* dans l'échantillon testé.

#### - La détection et la quantification de GRAs

La détection et la quantification d'un grand nombre de GRAs identifiés sur EGMs au sein de bactéries pathogènes par qPCR à haut débit dans l'environnement reflèteraient un risque potentiel pour la santé humaine en cas de transfert orizontale aux bactéries pouvant infecter l'homme (Ishii 2020). La connaissance du résistome d'échantillons de fleuves et la comparaison printemps / hiver a permis d'étudier la dynamique du résistome et de proposer l'instauration de mesures limitant la contamination de l'environnement par les gènes investigués, comme par exemple la mise en place de systèmes plus avancés d'épuration des

eaux usées. L'investigation du résistome dans ce projet devrait être la première dans une planification d'études, spécifiquement au niveau des points d'impact anthropique élevé, comme par exemple au niveau de la zone côtière Nord de concentration de réfugiés. La détection d'un grand nombre de GRAs (ex : *bla*<sub>GES</sub>, *strB*, *sulA*, *spc*), et de gènes de transposons (*IS6* groupe, *IS6-IS6100*, *ISS1N* et *tn3-tnpA*) témoigne de l'utilisation abondante d'antibiotiques en clinique, en élevage, aquaculture et agriculture (Zhuang *et al.* 2021). Des gènes de transposons dans les rivières favoriseraient la diffusion des GRAs (B. Zhang *et al.* 2021). Le transfert entre les plasmides de résistance et les chromosomes bactériens serait médié par des séquences d'insertion, principalement celles appartenant à la famille des *IS6*, *IS26* et *IS6100* (Che *et al.* 2021). L'abondance relative élevée des gènes de résistance à la tétracycline (*tetQ*, *tetW*, *tetM* et *tetO*) pourrait être le résultat d'une pression de sélection étant donné que les tétracyclines persistent longtemps dans l'environnement et sont fréquemment utilisées en médecine humaine et vétérinaire, aquacultures et dans les pratiques agricoles (Sciencedirect 2021). La détection d'une grande abondance relative de certains GRAs a permis d'identifier des points sous forte pression anthropique. Ainsi, la détection du gène *bla*<sub>GES</sub> en grande abondance au niveau de l'embouchure de Qadicha ainsi que la détection d'un grand nombre de gènes en grande abondance relative pourrait être due à une forte contamination de l'embouchure par les effluents anthropiques. Une sensibilisation civique, un développement de stratégies d'assainissement des eaux usées et l'interdiction de l'usage des antibiotiques dans l'élevage pourraient être proposés.

Une deuxième approche consiste à cibler des gènes indicateurs de la présence de GRAs (*intl1* et *sul1*)(ANSES 2020). La quantification des gènes *intl1* et *sul1* était révélatrice de la pression anthropique, cependant un nombre d'échantillons supérieur est requis pour une comparaison statistique approfondie des résultats entre différentes saisons ou lieux de prélèvements.

#### - **Les indicateurs viraux de contamination fécale**

Le crAssphage, spécifiquement la région CPQ-056 du crAssphage, a été détectée au niveau de 3 embouchures (Qadicha (206 copies/ $\mu$ l), Beyrouth (461 copies/ $\mu$ l) et Damour (22.9 copies/ $\mu$ l)) au printemps et 2 embouchures (Ostuène (17.5 copies/ $\mu$ l) et Kaleb (20.8

copies/ $\mu$ l)) en hiver. Le nombre de copies/ $\mu$ l du crAssphage (CPQ-056) est le plus élevé à Beyrouth suivi de Qadicha au printemps et le plus faible à Ostuène en hiver.

L'absence de détection du crAssphage au niveau des embouchures de Janoubi, Aarqa, Bared, Awali et Zahrani aux deux saisons, de l'Ostuène et Kaleb au printemps et de Qadicha, Beyrouth et Damour suggèrent une absence de contamination fécale humaine au niveau des points de prélèvements dans ces embouchures. Dans cette hypothèse, la détection d'Enterobacterales résistantes aux antibiotiques dans les échantillons où le crAssphage est indétectable mène à suggérer que l'origine de contamination fécale serait, en toute hypothèse, animale.

Par ailleurs, le TTV a été détecté dans toutes les embouchures aux deux saisons à l'exception des embouchures de Kaleb au printemps et de Janoubi en hiver.

La température est un autre facteur affectant le crAssphage et réduisant sa persistance par rapport à celle des bactériophages cultivables même si des méthodes moléculaires de qPCR ont été utilisées (Ballesté *et al.* 2019). D'autres facteurs pourraient intervenir au niveau des estuaires, écosystèmes tampons entre l'eau douce et l'eau marine, notamment la salinité (Zhang *et al.* 2019 ; Guo *et al.* 2018) variant au même titre que les GRAs (Zhang *et al.* 2019) le crAssphage. Selon Ballesté *et al.* 2019, la détection de plusieurs bactériophages marqueurs de contamination fécale notamment infectieux (coliphages somatiques et bactériophage de *Bacterioides fragilis*) est conseillée au niveau des effluents de STEUs (Ballesté *et al.* 2019). Cependant ces marqueurs se sont révélés non spécifiques et associés de manière inconsistante à l'homme (Bivins *et al.* 2020 ; Z. Wu *et al.* 2020) d'autant plus qu'au niveau des eaux usées non traitées, la concentration du crAssphage s'est avérée 2 à 3 fois supérieure à celles d'autres bactériophages et indicateurs viraux (Ahmed *et al.* 2020). En outre, une région CPQ\_064 du crAssphage manifesterait une aussi bonne corrélation avec d'autres indicateurs de contamination fécale que la région CPQ\_056 (Stachler *et al.* 2017) et même supérieure (Stachler *et al.* 2018). Ces résultats restent indicatifs et ne seraient concluants ou comparables que par un recours à la quantification absolue du TTV et d'un troisième indicateur de contamination fécale spécifique de l'homme (ex : la région CPQ\_046 du crAssphage) en surface et au niveau des sédiments des embouchures à différentes saisons.

# Conclusion



Des méthodes combinées de culture et moléculaire ont été complémentaires pour étudier la dissémination de la résistance aux agents antimicrobiens au niveau des fleuves majeurs au Liban afin d'évaluer l'impact anthropique et de saisonnalité. Le dénombrement d'UFC d'Enterobacterales, de *Pseudomonas spp.* et de SARM détectées dans 1 mL d'eau répandue sur des géloses distinctes MacConkey mélangées à de la ceftriaxone, ertapénème, et céfépime et sur gélose Chapman mélangée à de l'oxacilline a été recherché au niveau de points de prélèvements à la (aux) sources jusqu'aux embouchures des fleuves majeurs au Liban en hiver 2018 et seulement au niveau des embouchures au printemps 2017. La coloration de Gram et des tests phénotypiques de catalase, DNase et coagulase ont permis d'identifier des SARM. La coloration de Gram suivie du test d'oxydase a permis la différenciation entre Enterobacterales et *Pseudomonas spp.* La susceptibilité à l'amoxicilline-acide clavulanique, céfépime, ceftazidime, imipénème, pipéracilline-tazobactam, gentamicine et amikacine a été évaluée pour les bactéries à Gram négatif. La sensibilité à l'acide fusidique, ciprofloxacine, triméthoprim-sulfaméthoxazole, vancomycine et teicoplanine a été recherchée pour les bactéries à Gram positif. Les espèces d'Enterobacterales et de *Pseudomonas* ont ensuite été spécifiquement déterminées par les galeries API 20 E et API 20 NE respectivement.

L'étude de la dissémination des bactéries résistantes ciblées au niveau des fleuves libanais en hiver 2018 a permis d'identifier au niveau des fleuves majeurs des points sous haute pression anthropique (ex : au niveau de la section moyenne du fleuve Litani dans une région agricole de la Bekaa, au niveau de la zone côtière Nord du pays, au niveau du souk de Tripoli). La présence d'un hôpital à proximité, une forte concentration de réfugiés dans les zones avoisinantes des fleuves, une forte densité de population associée à une infrastructure insuffisante ou une activité agricole ont été suggérées comme sources plausibles de la pression anthropique.

Dans les échantillons des fleuves majeurs, la résistance des Enterobacterales était élevée vis-à-vis l'aztréonam (95.16%), du céfépime (79.03%) et de la ceftazidime (77.41%). La résistance était de 22.58% à l'imipénème. La résistance de *Pseudomonas spp.* en hiver 2018 était élevée vis-à-vis de l'aztréonam (100%). La résistance au céfépime était de 41.07%, de 57.14% à la ceftazidime La résistance à l'imipénème était de 7.14% à l'imipénème. Parmi les 62 isolats d'Enterobacterales et les 56 isolats de *Pseudomonas spp.* sélectionnés pour établir

leur profil de résistance, 21 Enterobacterales (33.87%) et 6 *Pseudomonas spp.* (10.71%) étaient sécrétrices de BLSE. Les SARM dans les fleuves ont manifesté des résistances de 85.71% à l'acide fucidique, 78.57% au sulfaméthoxazole-trimétoprime, 64.28 à la ciprofloxacine et 71.14 %.

Des gènes de carbapénémase (*bla<sub>PKC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* et *bla<sub>OXA-48</sub>*) ont été détectés chez des isolats d'Enterobacterales BLSE dans les embouchures d'Ostuène, Aarqa et Qadicha respectivement au printemps et une souche d'Enterobacterales portant *bla<sub>KPC</sub>* en hiver dans l'embouchure d'Aarqa, pourtant toutes sensibles à l'imipénème. La présence de ces pathogènes reflète un risque élevé de transmission et d'émergence de ces agents pathogènes aux humains par contact à ces endroits.

L'étude a été complétée par une étude du résistome des échantillons d'embouchures à deux saisons (printemps 2017 et hiver 2018). L'impact des saisons a été démontré à travers l'augmentation significative de l'abondance normalisée de groupes de GRAs et EGMs dans les échantillons d'embouchures sauf pour celle de Qadicha, plus contaminée au printemps. Des abondances normalisées élevées de certains gènes de résistance, comme *bla<sub>GES</sub>* (52.39) au niveau de l'embouchure de Qadicha au printemps, ont permis d'associer la contamination à de possibles sources de pression anthropique (surpopulation et systèmes insuffisants d'assainissements des eaux usées). Les méthodes de détection de bactéries résistantes pathogènes et la recherche du résistome ont été donc complémentaires pour identifier des zones sous haute pression anthropique (embouchures de Bared, Aarqa et Qadicha) et des niveaux élevés de contamination par des gènes de transposons et des gènes de résistance aux tétracyclines.

Des corrélations positives et significatives ont été mises en évidence entre abondances normalisées cumulées dans des groupes de gènes de résistance aux agents antimicrobiens avec les abondances normalisées cumulées du groupe des EGMs au printemps et en hiver.

En parallèle à une reprise de la méthodologie de façon périodique au niveau des points étudiés, l'investigation d'un plus grand nombre de pathogènes et une approche métagénomique pourrait être proposées dans le cadre d'une continuation de ce projet pilote au Liban. En effet, le recours aux nouvelles technologies de séquençage permettrait

d'approfondir la caractérisation des microbiomes dans les échantillons de fleuves en général, et au niveau de zones fortement anthropisées en particulier et pour étudier la signature du microbiome aux différentes saisons. Le séquençage de métagénomés ou de génomes bactériens (séquençage de séquences codant l'ARNr 16S) aboutirait à la connaissance entière de GRAs, connus ou jusque là inconnus, présents dans les échantillons environnementaux, bien que la sensibilité de la méthode soit inférieure à celle de la qPCR à haut débit.

Par ailleurs, une mobilisation de gouvernements, chercheurs et du public dans un cadre « One Health » national et international permettrait de lutter contre la dissémination de la résistance dans l'environnement. Sur le plan national, l'investissement dans l'instauration de procédés avancés de traitement des eaux usées et le développement de l'infrastructure actuelle est primordial. Ensuite, une limitation de l'usage des antibiotiques par l'application stricte des lois et des règles en vigueur concernant la vente des antibiotiques en officine, l'interdiction de l'usage des antibiotiques comme facteur de croissance et dans l'élevage des animaux, doit être exigée. Enfin, la surveillance de l'antibiorésistance dans les fleuves au Liban devrait se poursuivre périodiquement et en étroite coordination avec des programmes de surveillance de l'antibiorésistance dans d'autres compartiments environnementaux (par ex : sols, eaux souterraines, STEUs), chez l'animal (par ex : animaux d'élevage, aquaculture) et en clinique. Sur le plan international, un ensemble de perspectives devrait être proposé par des chercheurs dans différents domaines d'expertise pour limiter l'usage des antibiotiques et par conséquent réduire la pollution environnementale par les GRAs et BRAs.

En l'absence de stratégie pour empêcher la contamination de l'environnement par les BRAs, GRAs et antibiotiques, la persistance et l'évolution de la résistance est inévitable, la prise en charge des infections bactériennes en médecine humaine deviendrait de plus en plus difficile voire impossible.

## Annexes

### Annexe 1: Les différentes familles d'ISs, modes de transposition, caractéristiques et GRAs associés

Éléments	Transposition	Caractéristiques	Références
<b>Famille des IS6</b>			
<p><b>IS26</b> (appelés aussi <b>IS6</b>, <b>IS15Δ</b>, <b>IS46</b>, <b>IS140</b>, <b>IS160</b>, <b>IS176</b>, et <b>IS1936</b>) chez les bactéries Gram négatif.</p> <p>« <b>Unité translocable</b> » (constituée par l'<b>IS26</b> et une région adjacente) circulaire et mobile.</p> <p><b>IS257</b> (appelée aussi <b>IS431</b>) et <b>IS1216</b> chez les bactéries Gram-positif</p>	<p>Transposition conservative intermoléculaire de l'unité translocable lorsque la cible porte déjà une copie d'<b>IS26</b> et l'unité translocable devient « co-intégré » au sein de la cible.</p> <p>Possibilité d'obtention du co-intégré par transposition répliquative intermoléculaire insérant une unité translocable au sein d'une séquence cible ne possédant pas d'<b>IS26</b> et générant une <b>IS26</b> par recombinaison.</p> <p>Regénération de l'unité translocable circulaire suite à l'action d'une recombinaison homologue entre des copies d'<b>IS26</b>.</p> <p>Alternativement, libération de la structure translocable-like par transposition intramoléculaire répliquative en orientation directe et délétion de la séquence entre <b>IS26</b> et la position ciblée.</p>	<p>Plasticité des plasmides et îlots de pathogénicité induite par la fréquence élevée de recombinaison des <b>IS26</b></p> <p>Données limitées sur la mobilisation des gènes de résistance associés aux <b>IS257</b> (isolée chez <i>Staphylococcus aureus</i>) et <b>IS1216</b> (isolée chez <i>Enterococcus</i>, <i>Clostridium perfringens</i>, et <i>Staphylococcus aureus</i>).</p>	<p>(A. M. Brown, Coupland, and Willetts 1984 ; Trieu-Cuot and Courvalin 1984 ; Nies, Meyer, and Wiedemann 1985 ; Wrighton and Strike 1987 ; Bräu and Piepersberg 1983 ; Colonna <i>et al.</i> 1988 ; Partridge <i>et al.</i> 2009 ; Roy and Partridge 2017 ; Harmer and Hall 2019 ; Siguier, Gourbeyre, and Chandler 2017 ; Partridge <i>et al.</i> 2018 ; Rouch and Skurray 1989 ; Charlebois <i>et al.</i> 2012 ; Rice and Carias 1998)</p>
Éléments	Transposition	Caractéristiques	Références
<b>Famille des IS380</b>			
<p><b>ISEcp1</b>, <b>ISKpn23</b>, <b>IS1247</b> et <b>ISEnca1</b></p>	<p><b>ISEcp1</b></p> <p>Déplacement d'une région adjacente grâce à une recombinaison impliquant uniquement le bord gauche.</p> <p><b>ISKpn23</b>, <b>IS1247</b> et <b>ISEnca1</b></p>	<p>Associations aux gènes de résistance aux aminosides et en plus aux gènes de β-lactamases pour <b>ISEcp1</b>.</p> <p>Insertion d'<b>ISEcp1</b> en amont de <i>bla</i><sub>CTX-M-2</sub> chromosomique de</p>	<p>(Poirel <i>et al.</i> 2005 ; Ling Ma, Siu, and Lu 2011 ; Nicoletti <i>et al.</i> 2015 ; Humeniuk <i>et al.</i> 2002 ; Partridge <i>et al.</i> 2018 ; Kieffer <i>et al.</i> 2020 ; Vandecraen <i>et</i></p>

	Transposition similaire à celle d' <b>ISEcp1</b> .	<i>Kluyvera</i> pour le mobiliser sur un plasmide.  <b>ISEcp1</b> constitue un promoteur de gènes capturés du côté droit de l'élément, et la séparation de ce promoteur résulte en une expression réduite des gènes <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .  Association d' <b>ISKpn23</b> à <i>bla</i> <sub>BKC-1</sub> .	<i>al.</i> 2017 ; Kieffer <i>et al.</i> 2020 ; Nicoletti <i>et al.</i> 2016)
Éléments	Transposition	Caractéristiques	Références
<b>Famille des IS30</b>			
<b>ISAp11</b> seuls ou entrant dans la structure de transposons composites au sein de plasmides	Mobilisation par transposition conservative générant un intermédiaire circulaire.	Capture et mobilisation du gène <i>mcr-1</i> (résistance à la colistine) originaire de <i>Moraxella spp.</i>  Perte d' <b>ISAp11</b> par recombinaisons empêchant la mobilisation ultérieure de <i>mcr-1</i> .  Transposition conservative d' <b>IS10</b> ou insertion d' <b>IS1294b inactivant</b> <i>mcr-1</i> de façon réversible pour diminuer le coût métabolique en l'absence de colistine	(Yassine <i>et al.</i> 2015 ; Stoesser <i>et al.</i> 2016 Terveer <i>et al.</i> 2017 ; Poirel, Kieffer, and Nordmann 2017 ; Stoesser <i>et al.</i> 2016 ; Poirel, Kieffer, and Nordmann 2017 ; Snesrud, McGann, and Chandler 2018 ; Snesrud <i>et al.</i> 2016 ; Partridge <i>et al.</i> 2018)
Éléments	Transposition	Caractéristiques	Références
<b>Famille des IS91</b>			
<b>IS1294</b>	Mobilisation par réplication circulaire de <i>oriIS</i> (origine de réplication) à <i>terIS</i> (région de terminaison de réplication), régions flanquées par des tétranucléotides indispensables à la mobilisation.  Possibilité de réplication au-delà de <i>ter</i> jusqu'à la séquence adjacente transférable avec l'IS.	Transfert des gènes <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (de résistance à la ceftazidime).	(Yassine <i>et al.</i> 2015)
Éléments	Transposition	Caractéristiques	Références
<b>Famille des ISCR</b>			

<p>Apparentés aux <b>IS91</b></p>	<p>Transposition d'une seule bordure en cercle roulant du site <i>oriS</i> d'une extrémité vers le site <i>terIS</i> de l'autre extrémité (transposition d'une seule bordure) emportant des séquences adjacentes.</p>	<p>Transmission de résistance médiée par les plasmides, capturant et mobilisant des GRAs adjacents à <i>oriS</i>.</p> <p>Association des <b>ISCR1</b> sont aux IM1.</p> <p>Présence des <b>ISCR2</b> sur des plasmides ou au niveau d'îlots de pathogénécité (AbaR chez <i>Acinetobacter</i>) en association avec des GRAs variés.</p> <p>Association des <b>ISCR3</b> à divers gènes de résistance.</p> <p>Hypothèse de mobilisation d'un précurseur de <i>bla<sub>NDM</sub></i> chez <i>Acinetobacter baumannii</i> par <b>ISCR27</b>.</p> <p>Hypothèses de mobilisation du gène de résistance aux aminosides <i>rmtD</i> par <b>ISCR14</b> et d'association à <i>bla<sub>SPM-1</sub></i></p>	<p>(Toleman, Bennett, and Walsh 2006 ; Siguier, Gourbeyre, and Chandler 2017 ; Adams <i>et al.</i> 2008 ; Vilacoba <i>et al.</i> 2013 ; Toleman, Bennett, and Walsh 2006 ; Lallement <i>et al.</i> 2018 ; Partridge <i>et al.</i> 2018 ; Roy and Partridge 2017)</p>
Éléments	Transposition	Caractéristiques	Références
Famille des Tn3			
<p><b>Tn4401</b> et variants</p> <p><b>Tn1546</b> et variants</p> <p><b>Tn1331</b></p> <p>Les <b>Tn21</b> et apparentés</p> <p><b>Tn6452</b></p> <p><b>Tn1721, Tn1722</b> et <b>Tn5393</b></p>	<p>Transposition répllicative pouvant s'accompagner d'une recombinaison homologue médiée par le site <i>res</i>, créant des éléments hybrides.</p> <p>Immunité de transposition consistant en l'inhibition de transposition d'un second élément.</p>	<p>Association à beaucoup de GRAs</p> <p>Association de <b>Tn4401</b> à <i>bla<sub>KPC</sub></i> avec les séquences flanquantes <b>ISKpn7</b> et <b>ISKpn6</b>.</p> <p>Niveaux de résistance supérieurs pour <b>Tn4401</b> suite aux éventuelles délétions au niveau du promoteur en amont de <i>bla<sub>KPC</sub></i>.</p> <p>En amont de <i>bla<sub>KPC</sub></i>, présence de séquence similaires à <b>Tn4401</b> dites</p>	<p>(Naas <i>et al.</i> 2008 ; Arthur <i>et al.</i> 1993 ; Sarno <i>et al.</i> 2002 ; De La Cruz and Grinsted 1982 ; Mayers <i>et al.</i> 2017 ; Borowiak <i>et al.</i> 2019 ; Grinsted and De La Cruz 1990 ; Allmeier <i>et al.</i> 1992 ; Chiou and Jones 1993 ; Lee, Bhagwat, and Heffron 1983 ; Weigel <i>et al.</i></p>

		<p>« éléments <b>non-Tn4401</b> » annotées NTEKPC.</p> <p>Association d'un dérivé de <b>Tn1331</b> avec des GRAs additionnels dans une région dérivée d'IM1 (sans gène d'intégrase).</p> <p>Caractérisation de <b>Tn1546</b> et variants au sein de plasmides chez les bactéries Gram positif résistantes (<i>Enterococcus</i> et SARM) portant <i>vanA</i>.</p> <p>Association de <i>vanA</i> et <i>fosB3</i> à <b>Tn1546-like</b>, chez <i>Enterococcus faecum</i>.</p> <p>Associations de <b>Tn21</b> et apparentés à l'opéron de résistance au mercure (<i>mer</i>) et mobilisation de GRAs au sein d'IM1 (les intégrons eux-mêmes situés dans le site <i>res</i> de <b>Tn21</b> affectant la résorption et expliquant leur fréquence élevée).</p> <p>Association de divers GRAs à <b>Tn6452</b> et Identification de <i>mcr-5</i> sur <b>Tn6452</b> de <i>Salmonella</i>, <i>Escherichia coli</i>, et <i>Cupriavidus gilardii</i>.</p> <p>Association de <b>Tn1721</b> (portant <b>Tn1722</b>) à <i>tet(A)</i>. Deux gènes de résistance en tandem (à la streptomycine) <i>strAB</i> portés par un fragment de <b>Tn1721/Tn1722</b>, <b>Tn5393</b></p>	<p>2003 ; Liebert, Hall, and Summers 1999 ; Fleres <i>et al.</i> 2019 ; H. Chen <i>et al.</i> 2021 ; Siguier, Gourbeyre, and Chandler 2017 ; Lima-Mendez <i>et al.</i> 2020 ; Partridge <i>et al.</i> 2018 ; Cheruvanky <i>et al.</i> 2017 ; Roy and Partridge 2017 ; Sun <i>et al.</i> 2017 ; Pal <i>et al.</i> 2017)</p>
Éléments	Transposition	Caractéristiques	Références
<b>Tn7-like</b>			

<p><b>Tn7 et Tn402-like</b></p> <p><b>Tn402-like</b></p> <p><b>Tn5053</b>, dont <b>Tn402</b> (aussi <b>Tn5090</b>)</p> <p>Les îlots de résistance génomiques <b>AbaR</b> et <b>AbGRI1</b> et variants (<b>Tn6022</b>, <b>Tn6022Δ</b>, <b>Tn6021</b>, <b>Tn6172</b>, <b>Tn6173</b>, <b>Tn6174</b>, et <b>Tn5393</b>)</p> <p><b>Tn6018</b> et <b>Tn6019</b></p>	<p>Transposition conservative de <b>Tn7</b> permettant un transfert horizontal ciblant l'extrémité de plasmides conjugatifs, et un transfert vertical ciblant le chromosome de bactéries à Gram négatif.</p> <p>Une immunité de transposition manifestée par <b>Tn7</b></p>	<p><b>Tn7</b> et <b>Tn402-like</b> sont associés à la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif alors que <b>Tn552</b> à <i>Staphylococcus</i>.</p> <p>Identification de <b>Tn402-like</b> et hybrides en association aux IM1.</p> <p>Association possible des éléments de la famille <b>Tn5053</b>, dont <b>Tn402</b> (aussi <b>Tn5090</b>) avec un IM1.</p> <p>Isolation des îlots de résistance génomiques (<b>AbaR</b> et <b>AbGRI1</b>) et association de <b>AbaR3</b> et <b>AbaR3-like</b> à l'IM1 chez <i>Acinetobacter baumannii</i>.</p> <p>Identification de <b>Tn6018</b> et <b>Tn6019</b> au sein de transposons composites.</p>	<p>(Rowland and Dyke 1990 ; Gillings <i>et al.</i> 2009 ; Klompe <i>et al.</i> 2019 ; Minakhina <i>et al.</i> 1999 ; Post, White, and Hall 2010 ; Siguier, Goubeyre, and Chandler 2017 ; Krizova, Dijkshoorn, and Nemeč 2011 ; Roy and Partridge 2017 ; Hamidian and Hall 2017 ; Partridge <i>et al.</i> 2018)</p>
---	---	---	--

## **Annexe 2: Les normes selon les standards US EPA et SEQ-EAUX-2003**

	Normes standards US EPA pour les eaux récréatives	Normes standards SEQ-EAUX-2003 pour les activités d'irrigation
Coliformes fécaux	Limite acceptable : 800 UFC/100 mL	
Coliformes thermotolérants		Limite acceptable: 100 UFC/100 mL

## **Annexe 3: Coordonnées au niveau des points de prélèvements à la / aux sources, le long des fleuves et jusqu'aux embouchures des fleuves débouchant au niveau de la mer ou jusqu'aux derniers points avant les frontières pour les fleuves internes**

Fleuve	Région	Coordonnées
Beyrouth	Majdel Tarchich (Point accessible le plus proche de la source)	33° 53' 23" N 35° 49' 36" E



	Majdel Tarchich – Dahr El Metn (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 53' 38" N 35° 48' 56" E
	Bzebdine (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 52' 33" N 35° 44' 37" E
	Dlaybeh (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 52' 57" N 35° 41' 41" E
	Beit Meri (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 51' 59" N 35° 37' 20" E
	Deir Khouna (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 49' 49" N 35° 39' 33" E
	Qanatir Zbeida	33° 50' 45" N 35° 33' 31" E
	Jisr El Bacha	33° 52' 42" N 35° 31' 49" E
	Port	33° 54' 06" N 35° 32' 18" E
Jawz	Tanourin (Point accessible le plus proche de la source)	34° 12' 40" N 35° 52' 47" E
	Beit Chlela	34° 13' 22" N 35° 50' 24" E
	Bsatin El Assy	34° 14' 23" N 35° 49' 17" E
	Kaftoun	34° 15' 52" N 35° 45' 32" E
	Mseilha	34° 16' 27" N 35° 41' 17" E
	Embouchure	34° 30' 11" N 34° 57' 47" E
Ibrahim	Majdal (Point accessible le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	34° 06' 26" N 35° 53' 49" E
	Yanouh (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 05' 37" N 35° 53' 03" E
	Afqa (Point accessible le plus proche de la source du 2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 04' 04" N 35° 53' 33" E
	Mzarib (2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 04' 49" N 35° 52' 54" E
	Janneh	34° 04' 43" N 35° 49' 59" E
	Chouein	34° 04' 39" N 35° 43' 27" E
	Khdeira	34° 04' 58" N 35° 41' 03" E
	Jbeil	34° 03' 54" N 35° 38' 35" E
Al Bared	Fneidek (Point accessible le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	34° 28' 41" N 36° 11' 15" E
	Mechmch (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 28' 26" N 36° 09' 59" E
	Beit Ayoub (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 47' 34" N 36° 16' 62" E

	Hrar (2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 27' 57'' N 36° 09' 38'' E
	Al Qorneh (Confluence)	34° 27' 07'' N 36° 09' 30'' E
	Adweh	34° 26' 46'' N 36° 06' 56'' E
	Mahmara	34° 26' 59'' N 35° 59' 31'' E
	Embouchure	34° 30' 31'' N 35° 57' 42'' E
Al Kaleb	Faraya (Point accessible le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	34° 00' 49'' N 35° 49' 19'' E
	Hrajel (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 00' 44'' N 35° 47' 59'' E
	Kfardebian (Point accessible le plus proche de la source du 2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 57' 27'' N 35° 43' 18'' E
	Mazraat Kfardebian-Bkaatouta (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 59' 05'' N 35° 47' 03'' E
	Faytroun- Mazraat Kfardebian (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 59' 57'' N 35° 45' 46'' E
	Bteghrin (Point accessible le plus proche de la source du 3 <sup>ème</sup> affluent)	33° 56' 05'' N 35° 46' 07'' E
	Deir Chamra (3 <sup>ème</sup> affluent)	33° 56' 35'' N 35° 43' 21'' E
	Daraya-Deir Chamra (Confluence)	33° 57' 15'' N 35° 43' 19'' E
	Zouk El Kharab	33° 57' 22'' N 35° 35' 51'' E
	Jeita Loueizi	33° 56' 42'' N 35° 37' 21'' E
Qadicha	Al Arez (Point accessible le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	34° 17' 19'' N 35° 58' 49'' E
	Bcharreh (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 14' 48'' N 36° 01' 13'' E
	Ehden (2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 17' 01'' N 35° 55' 07'' E
	Zgharta (Confluence des 3 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> affluents)	34° 20' 22'' N 35° 51' 19'' E
	Jisr Rachin (3 <sup>ème</sup> affluent)	34° 23' 43'' N 35° 55' 09'' E
	Miryata Rachin (3 <sup>ème</sup> affluent)	34° 24' 43'' N 35° 55' 46'' E
	Ardeh (3 <sup>ème</sup> affluent)	34° 24' 14'' N 35° 53' 13'' E
	Deir Nbouh (4 <sup>ème</sup> affluent)	34° 37' 71'' N 35° 92' 39'' E
	Rachin (4 <sup>ème</sup> affluent)	34° 24' 04'' N 35° 54' 22'' E
	Tripoli-Zgharta (Confluence)	34° 25' 11'' N 35° 51' 17'' E

	Tripoli Souk	34° 26' 00'' N 35° 50' 44'' E
	Embouchure	34° 45' 38'' N 35° 54' 16'' E
Aarqa	Gebrayel (Point accessible le plus proche de la source)	34° 30' 47'' N 36° 04' 07'' E
	Qantara	34° 31' 51'' N 36° 02' 33'' E
	Aarqa	34° 32' 33'' N 36° 00' 36'' E
	Avant Qobbit Chamra	34° 32' 51'' N 35° 59' 40'' E
	Après Qobbit Chamra	34° 32' 39'' N 36° 00' 16'' E
	Minieh- Arida	24° 32' 58'' N 35° 59' 30'' E
	Embouchure	34° 32' 58'' N 35° 59' 30'' E
Al Janoubi Al Kabir	Hekr El Daher	34° 63' 07'' N 36° 02' 67'' E
	Embouchure	34° 38' 04'' N 35° 58' 42'' E
Ostuène	Hed (Point accessible le plus proche de la source)	34° 33' 25'' N 36° 10' 05'' E
	Mazraet Baldi (2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 33' 31'' N 36° 08' 52'' E
	Soueisseh (2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 33' 05'' N 36° 07' 24'' E
	Soueisseh-Khreibit El Joun (2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 33' 16'' N 36° 06' 41'' E
	Khouchah (2 <sup>ème</sup> affluent)	34° 33' 48'' N 36° 05' 36'' E
	Ain El Zeit (Point accessible le plus proche de la 1 <sup>ère</sup> source)	34° 35' 51'' N 36° 12' 00'' E
	Daouseh (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 35' 48'' N 36° 11' 25'' E
	Rihanyeh (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 34' 57'' N 36° 06' 36'' E
	Tal El Zafer (1 <sup>er</sup> affluent)	34° 31' 29'' N 36° 07' 59'' E
	Koueikhat (Confluence)	34° 34' 34'' N 36° 05' 57'' E
	Tal Abas Al Gharbeh	34° 35' 46'' N 36° 03' 44'' E
	Tal Abas Al Charkeh	34° 35' 16'' N 36° 04' 41'' E
	Masoudieh	34° 36' 16'' N 36° 02' 51'' E
	Kneiseh	34° 37' 16'' N 36° 01' 23'' E
Cheikh Zennad	34° 36' 07'' N 35° 59' 24'' E	

	Embouchure	34° 36' 07'' N 35° 59' 24'' E
Zahrani	Mlikh (Point accessible le plus proche de la source)	33° 28' 12'' N 35° 33' 43'' E
	Loueizeh	33° 25' 08'' N 35° 31' 06'' E
	Arab Salim	33° 25' 08'' N 35° 31' 06'' E
	Habouch	33° 25' 15'' N 35° 29' 21'' E
	Hmaileh	33° 26' 14'' N 35° 28' 17'' E
	Hejeh	33° 28' 35'' N 35° 22' 44'' E
	Embouchure	33° 29' 33'' N 35° 20' 34'' E
Damour	Bkhechtay (Point accessible le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	33° 47' 58'' N 35° 37' 06'' E
	Rejmeh (Point accessible le plus proche de la source du 2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 47' 45'' N 35° 37' 35'' E
	Bhouara (Confluence des 1 <sup>er</sup> et 2 <sup>ème</sup> affluents)	33° 47' 23'' N 35° 36' 17'' E
	Chartoun	33° 45' 32'' N 35° 35' 17'' E
	Ghaboun 1	33° 46' 59'' N 35° 36' 01'' E
	Ghaboun 2	33° 47' 07'' N 35° 35' 07'' E
	Ramlyeh (Point accessible le plus proche de la source du 3 <sup>ème</sup> affluent)	33° 44' 56'' N 35° 39' 46'' E
	Mazraat El Naher (3 <sup>ème</sup> affluent)	33° 45' 06'' N 35° 38' 37'' E
	Mecherfeh (3 <sup>ème</sup> affluent)	33° 45' 08'' N 35° 39' 57'' E
	Nabeh El Safa (Point accessible le plus proche de la source du 4 <sup>ème</sup> affluent)	33° 45' 00'' N 35° 41' 54'' E
	Wadi El Sett (4 <sup>ème</sup> affluent)	33° 42' 45'' N 35° 37' 46'' E
	Rechmaya (4 <sup>ème</sup> affluent)	33° 43' 31'' N 35° 35' 45'' E
	Amik (Confluence 3 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> affluent)	33° 43' 23'' N 35° 35' 38'' E
	Jisr El Kadi (Confluence des affluents 1,2,3 et 4)	33° 43' 37'' N 35° 33' 53'' E
	Lehbyeh	33° 42' 04'' N 35° 28' 07'' E
	Embouchure	33° 42' 17'' N 35° 26' 36'' E
Hasbani	Point accessible le plus proche de la source	33° 24' 28'' N 35° 40' 17'' E

	Bohsas	33° 24' 18'' N 35° 39' 55'' E
	Kawkaba	33° 23' 54'' N 35° 39' 35'' E
	Jisr el Chakaa	33° 22' 53'' N 35° 38' 49'' E
	Fardis (Confluence)	33° 22' 29'' N 35° 38' 47'' E
	Hebarieh (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 22' 20'' N 35° 39' 30'' E
	Hebaryeh-Chebaa (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 22' 14'' N 35° 41' 51'' E
	Al Mairie (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 21' 42'' N 35° 42' 37'' E
	Ain Arab (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 18' 41'' N 35° 38' 25'' E
	Wazani (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 16' 36'' N 35° 37' 11'' E
Assi	Bejjaje (Point accessible le plus proche de la source)	34° 22' 76'' N 36° 33' 91'' E
	Jabouli	34° 13' 40'' N 36° 20' 19'' E
	Jabouli	34° 14' 29'' N 36° 20' 49'' E
	Jabouli	34° 14' 48'' N 36° 20' 58'' E
	Grotte Mar Maroun	34° 21' 40'' N 36° 23' 40'' E
	Ras El Assi	34° 24' 04'' N 36° 25' 39'' E
	Hermel 2	34° 24' 25'' N 36° 26' 11'' E
	Hermel 1	34° 23' 25'' N 36° 24' 54'' E
	Choueghir 2	34° 24' 06'' N 36° 25' 50'' E
	Choueghir 1	34° 40' 14'' N 36° 42' 99'' E
Litani	Kaa El Rim (Point accessible le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	33° 53' 14'' N 35° 52' 17'' E
	Wadi El Arayech (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 85' 86'' N 35° 89' 15'' E
	Saadnayel 3 (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 51' 50'' N 35° 59' 20'' E
	Saadnayel 2 (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 49' 40'' N 35° 51' 38'' E
	Saadnayel 1 (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 50' 24'' N 35° 51' 23'' E
	Beit Chema (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 55' 26'' N 36° 02' 58'' E
	Tamnin (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 86' 80'' N 35° 99' 92'' E

	Dalhamyeh (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 50' 25'' N 35° 57' 48'' E
	Faour (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 46' 59'' N 35° 58' 05'' E
	Jaleila (Confluence)	33° 49' 16'' N 35° 51' 42'' E
	Chtoura	33° 81' 18'' N 35° 85' 93'' E
	Jdita	33° 48' 37'' N 35° 50' 36'' E
	Mekseh	33° 48' 29'' N 35° 49' 57'' E
	Kab Elias	33° 47' 42'' N 35° 49' 24'' E
	Mansoura	33° 44' 50'' N 35° 52' 39'' E
	Ghazeh	33° 45' 18'' N 35° 54' 42'' E
	Rawda (Confluence)	33° 44' 50'' N 35° 52' 38'' E
	Jib Janin	33° 38' 19'' N 35° 46' 46'' E
	Khreizeit	33° 46' 39'' N 35° 53' 34'' E
	Qaraoun	33° 57' 13'' N 35° 70' 04'' E
	Khardali	33° 20' 32'' N 35° 32' 34'' E
	Teir filsay	33° 32' 61'' N 35° 34' 29'' E
	Arzay	33° 32' 39'' N 35° 30' 79'' E
	Jdeideh	33° 32' 38'' N 35° 28' 45'' E
	Embouchure	33° 95' 61'' N 35° 59' 80'' E
Awali	Fraidis (Point accessible le plus proche de la source du 1 <sup>er</sup> affluent)	33° 42' 31'' N 35° 40' 35'' E
	Mokhtara-Bakaata (1 <sup>er</sup> affluent)	33° 37' 10'' N 35° 36' 04'' E
	Maaser El Chouf (Point accessible le plus proche de la source du 2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 40' 18'' N 35° 39' 21'' E
	Mokhtara-Baadaran (2 <sup>ème</sup> affluent)	33° 39' 13'' N 35° 37' 30'' E
	Bater (Confluence affluents 1 et 2)	33° 35' 53'' N 35° 35' 10'' E
	Wadi Jezzin (3 <sup>ème</sup> affluent)	33° 32' 42'' N 35° 35' 02'' E
	Hajyjeh-Dalghani (Confluence des affluents 1, 2 et 3)	33° 59' 76'' N 35° 58' 27'' E
	Bisri	33° 58' 01'' N 35° 53' 51'' E

	Alman El Chouf	33° 34' 47'' N 35° 32' 03'' E
	Embouchure	33° 35' 20'' N 35° 23' 12'' E

#### **Annexe 4: Les séquences des couples d'amorces pour les gènes ciblés**

<b>Nom de l'amorce (F)</b>	<b>Séquence</b>	<b>Nom de l'amorce (R)</b>	<b>Séquence</b>
catB3_F	5' AAG-GCA-AGC-TGC-TTT-CTG-AG 3'	catB3_R	5' TCG-AAT-GAG-TGC-CCA-TGA-TA 3'
cat_F	5' CAA-TCC-TCA-ATC-GAC-ACG-AA 3'	cat_R	5' GAT-TGT-GTA-GCA-AGG-CAG-CA 3'
cm1A1_F	5' AAT-GGG-ATG-CCT-GAT-AGC-TG 3'	cm1A1_R	5' ACC-CAC-TAG-CCA-CAT-TGG-AG 3'
aac(3)-IId_F	5' TGA-CGT-ATG-AGA-TGC-CGA-TG 3'	aac(3)-IId_R	5' GAG-AAT-GCC-GTT-TGA-ATC-GT 3'
aadE_F	5' GCA-TGA-TTT-CCT-GGC-TGA-TT 3'	aadE_R	5' CCA-CAA-TTC-CTC-TGG-GAC-AT 3'
aac(6')-Ib_F	5' TTG-CAA-TGC-TGA-ATG-GAG-AG 3'	aac(6')-Ib_R	5' TGG-TCT-ATT-CCG-CGT-ACT-CC 3'
aadA_F	5' CAG-CGG-AGG-AAT-TCT-TTG-AC 3'	aadA_R	5' GCT-GCG-AGT-TCC-ATA-GCT-TC 3'
aac(6')-IIa_F	5' GGA-ACA-CTA-CCT-GCC-CAG-AG 3'	aac(6')-IIa_R	5' GCG-ACG-TAC-GAC-TGA-GCA-TA 3'
spc_F	5' TGA-CGA-ACG-CAA-TGT-GAT-TT 3'	spc_R	5' TCA-GCT-GCC-AGA-TCT-TTT-GA 3'
aph(3')-III_F	5' CCG-GTA-TAA-AGG-GAC-CAC-CT 3'	aph(3')-III_R	5' CTT-TGG-AAC-AGG-CAG-CTT-TC 3'
aph(2'')-I(de)_F	5' CGG-AGG-TGG-TTT-TTA-CAG-GA 3'	aph(2'')-I(de)_R	5' TTG-CTT-CGG-CAG-ATT-ATT-GA 3'
aph(2'')-Ib_F	5' ATC-AAA-TCC-CTG-CGG-TAG-TG 3'	aph(2'')-Ib_R	5' CAA-GGG-CAT-CCT-TTT-CCT-TT 3'
aadB_F	5' GCC-GAT-GAA-GTA-CCA-CCA-GT 3'	aadB_R	5' CGC-AAG-ACC-TCA-ACC-TTT-TC 3'
aac(3)-Ib_F	5' CTA-CCC-AAG-TTC-GAG-CAA-GC 3'	aac(3)-Ib_R	5' GCT-TCA-GGT-GGC-TAA-TCA-GG 3'
strB_F	5' GGC-GAT-TAT-AGC-CGA-TCA-AA 3'	strB_R	5' CGC-GAC-TGG-AGA-ACA-TGA-TA 3'
aac(6')-aph(2'')_F	5' TCC-AAG-AGC-AAT-AAG-GGC-ATA 3'	aac(6')-aph(2'')_R	5' TGC-CCT-CGT-GTA-ATT-CAT-GT 3'
bacA_2_F	5' GAG-GCA-TTG-ATC-CTT-GGT-GT 3'	bacA_2_R	5' AAA-CAA-TGC-CGA-ACC-GAT-AG 3'
bacA_1_F	5' GGC-TGC-GTT-ACT-GTC-GTT-TT 3'	bacA_1_R	5' GGC-CAA-TGA-TAA-ATG-CAT-CC 3'
cepA_F	5' ATG-TCC-TGC-CCT-GGT-AGT-TG 3'	cepA_R	5' CTT-GCC-CGT-CGA-TAA-TGA-CT 3'
cbIA_F	5' TGC-CTG-CGA-CAT-CTT-GAT-AG 3'	cbIA_R	5' CCG-TCT-TCT-GTT-TCC-GAG-AG 3'
cfxA_F	5' GCG-CAA-ATC-CTC-CTT-TAA-CA 3'	cfxA_R	5' ACA-ATA-ACC-GCC-ACA-CCA-AT 3'
blaTEM_F	5' AAG-CCA-TAC-CAA-ACG-ACG-AG 3'	blaTEM_R	5' TTG-CCG-GGA-AGC-TAG-AGT-AA 3'
blaIMP_F	5' GCT-ACC-GCA-GCA-GAG-TCT-TT 3'	blaIMP_R	5' CCC-ACC-CGT-TAA-CTT-CTT-CA 3'
blaAMPC_F	5' ACC-GCT-AAA-CAG-TGG-AAT-GG 3'	blaAMPC_R	5' GCA-AGT-CGC-TTG-AGG-ATT-TC 3'
blaDHA_F	5' AAA-GTG-CGC-AAA-GCC-AGT-AT 3'	blaDHA_R	5' AAG-ATT-CCG-CAT-CAA-GCT-GT 3'
blaCMY-2_F	5' CGA-TCC-GGT-CAC-GAA-ATA-CT 3'	blaCMY-2_R	5' CCT-GCC-GTA-TAG-GTG-GCT-AA 3'
blaACC_F	5' TTG-TTA-CGC-TAC-GTG-CAA-GC 3'	blaACC_R	5' CGA-TTT-GAA-ATA-GCC-GGT-GT 3'
blaSHV_F	5' CTT-TCC-CAT-GAT-GAG-CAC-CT 3'	blaSHV_R	5' CAG-ATC-CTG-CTG-GCG-ATA-GT 3'
blaVIM_F	5' TGT-CCG-TGA-TGG-TGA-TGA-GT 3'	blaVIM_R	5' TTT-CAA-TCT-CCG-CGA-GAA-GT 3'
blaKPC_F	5' TGG-CTA-AAG-GGA-AAC-ACG-AC 3'	blaKPC_R	5' TAG-TCA-TTT-GCC-GTG-CCA-TA 3'
blaIMI_F	5' AGT-CGA-TCC-CAG-CAG-CTT-TA 3'	blaIMI_R	5' CCA-AGA-AAC-TGT-GCA-TTC-CA 3'
blaBIC-1_F	5' CCA-TCA-GCG-CAC-AAC-ATA-GT 3'	blaBIC-1_R	5' CCA-GAA-CGT-TTT-CCA-GAA-GC 3'
blaGES_F	5' GAC-CCA-CAC-CAT-TGA-GAG-GT 3'	blaGES_R	5' GCG-CAG-GTA-CCA-GTT-TTC-TC 3'
blaNDM_F	5' TGG-ATC-AAG-CAG-GAG-ATC-AA 3'	blaNDM_R	5' ATT-GGC-ATA-AGT-CGC-AAT-CC 3'
blaOXA_F	5' GTG-GCA-TCG-ATT-ATC-GGA-AT 3'	blaOXA_R	5' AGA-GCA-CAA-CTA-CGC-CCT-GT 3'
blaCTX-M_F	5' ACT-ATG-GCA-CCA-CCA-ACG-AT 3'	blaCTX-M_R	5' GGT-TGA-GGC-TGG-GTG-AAG-TA 3'
blaPer-1_F	5' GAA-AGG-TGC-TGC-AGA-GAT-CCT-A 3'	blaPer-1_R	5' CTC-TGG-TCC-TGT-GGT-GGT-TT 3'
ermF_F	5' AGC-ACC-CGC-TTT-TTC-CTT-AT 3'	ermF_R	5' GAT-CAA-GAG-GGG-CTT-TAG-GG 3'
ermB_F	5' GGT-TGC-TCT-TGC-ACA-CTC-AA 3'	ermB_R	5' CTG-TGG-TAT-GGC-GGG-TAA-GT 3'
ermC_F	5' TGA-AAT-CGG-CTC-AGG-AAA-AG 3'	ermC_R	5' GGT-CTA-TTT-CAA-TGG-CAG-TTA-CG 3'

ermY_F	5' AAG-TTC-CCA-AAC-AAC-AAA-GCA 3'	ermY_R	5' TTC-ACT-TTC-AAA-GAC-AAT-TTT-TCG 3'
mfsA_F	5' AAT-ATG-CTC-TCC-GGG-CTT-TT 3'	mfsA_R	5' TTT-GCA-CAC-CGT-AAA-ATG-GA 3'
mefA_10_F	5' CCT-GCA-AAT-GGC-GAT-TAT-TT 3'	mefA_10_R	5' CCA-AAG-ACC-GCA-TAG-GGT-AA 3'
macB_F	5' GGC-TGG-AAG-ACC-GTA-CAG-AG 3'	macB_R	5' GTT-GGT-TCA-TCG-GCA-AGA-AT 3'
ermX_F	5' TGA-CGC-TGT-ACT-CCT-CAT-GC 3'	ermX_R	5' CGA-GAA-CCC-AGG-TGA-AAT-GT 3'
acrA_F	5' GAA-GGT-AGC-GAC-ATC-GAA-GC 3'	acrA_R	5' CTT-TCG-CCA-GAT-CAC-CTT-TC 3'
mdtO_F	5' TTG-TTG-GCC-TCT-ATC-CAA-CC 3'	mdtO_R	5' TTA-AGC-GCT-TGA-TGC-ATT-TG 3'
tolC_F	5' CTG-AAA-GAA-GCC-GAA-AAA-CG 3'	tolC_R	5' CGT-CGG-TAA-GTG-ACC-ATC-CT 3'
mdtL_F	5' CGG-ACA-AAC-CAC-GAG-AAA-AT 3'	mdtL_R	5' GAA-GGT-GAG-GAT-CAC-CGA-AA 3'
mdtF_F	5' GGA-CCC-GCA-AAA-ACT-CAA-TA 3'	mdtF_R	5' AGT-TGA-CCA-CCG-GAA-ATC-TG 3'
qnrA_F	5' ATT-TCT-CAC-GCC-AGG-ATT-TG 3'	qnrA_R	5' ACT-GCA-ATC-CTC-GAA-ACT-GG 3'
qnrB_F	5' CGA-TCT-GAC-CAA-TTC-GGA-GT 3'	qnrB_R	5' ACG-ATG-CCT-GGT-AGT-TGT-CC 3'
qnrS_F	5' TGG-AAA-CCT-ACC-GTC-ACA-CA 3'	qnrS_R	5' AAT-CGC-ATC-GGA-TAA-AGG-TG 3'
qnrC_F	5' GCA-GAA-TTC-AGG-GGT-GTG-AT 3'	qnrC_R	5' AAC-TGC-TCC-AAA-AGC-TGC-TC 3'
cusF_F	5' CCC-AGG-CTA-ACG-AAC-ATC-AT 3'	cusF_R	5' TGC-TTT-CCA-GAT-CGA-TAC-CC 3'
copA_F	5' CGA-CAT-GAC-CAT-CAA-CAA-CC 3'	copA_R	5' TAG-TAC-TCC-CCG-TGC-GTG-AT 3'
copD_F	5' GAG-TGT-GCC-TGA-CCC-TGT-TT 3'	copD_R	5' TCT-TCG-GCT-ACC-AGC-AGT-TT 3'
cadA_F	5' CGA-TCG-CTG-TCT-TTT-TAG-GC 3'	cadA_R	5' TAC-ACC-AAA-GCC-AAC-ACG-AA 3'
merA_F	5' TTG-TAC-AAG-GCA-CGT-TGA-GG 3'	merA_R	5' CGC-CTT-GTT-CGA-TGG-ATA-AT 3'
czcA_F	5' CGT-TCG-TGG-ACG-TGA-TAT-TG 3'	czcA_R	5' ACC-CCA-TGT-CAT-CCA-GTA-GC 3'
qacA_F	5' GAC-CCT-TCT-GGT-ACC-CAA-CA 3'	qacA_R	5' TCC-CCA-TTT-ATC-AGC-AAA-GG 3'
qacC_F	5' TGG-GCG-GGA-CTA-GGT-TTA-G 3'	qacC_R	5' ACG-AAA-CTA-CGC-CGA-CTA-TGA 3'
qacE_F	5' TCG-GTG-TTG-CTT-ATG-CAG-TC 3'	qacE_R	5' ATC-AAG-CTT-TTG-CCC-ATG-AA 3'
vanA_F	5' GTG-CGG-TAT-TGG-GAA-ACA-GT 3'	vanA_R	5' TGC-GTT-TTC-AGA-GCC-TTT-TT 3'
vanB_F	5' CCT-GCC-TGG-TTT-TAC-ATC-GT 3'	vanB_R	5' GCT-GTC-AAT-CAG-TGC-AGG-AA 3'
tetQ_F	5' GCA-AAG-GAA-GGC-ATA-CAA-GC 3'	tetQ_R	5' AAA-CGC-TCC-AAA-TTC-ACA-CC 3'
tetW_F	5' GGT-GCA-GTT-GGA-GGT-TGT-TT 3'	tetW_R	5' AAA-TGA-CGG-AGG-GTT-CCT-TT 3'
tetM_F	5' TTG-ATG-CGG-GAA-AAA-CTA-CC 3'	tetM_R	5' TAC-CTC-TGT-CCA-CGC-TTC-CT 3'
tetO_F	5' GCG-TCA-AAG-GGG-AAT-CAC-TA 3'	tetO_R	5' CGG-TAT-ACT-TCC-GCC-AAA-AA 3'
tetB_F	5' CAA-AAC-TTG-CCC-CTA-ACC-AA 3'	tetB_R	5' GCT-TTC-AGG-GAT-CAC-AGG-AG 3'
arnA_F	5' GAA-ATT-CAC-CGT-CTG-GTC-GT 3'	arnA_R	5' GTG-GTG-CAA-CAG-AAA-TCA-CG 3'
mcr-1_F	5' TCC-AAA-ATG-CCC-TAC-AGA-CC 3'	mcr-1_R	5' TAG-CAC-ACC-CAA-ACC-AAT-GA 3'
sul1_F	5' AGG-CTG-GTG-GTT-ATG-CAC-TC 3'	sul1_R	5' AAG-AAC-CGC-ACA-ATC-TCG-TC 3'
sulA_F	5' GAT-ATT-CGC-GGT-TTT-CCA-GA 3'	sulA_R	5' GTC-TTG-CAC-CGA-ATG-CAT-AA 3'
mecA_F	5' TCC-AGG-AAT-GCA-GAA-AGA-CC 3'	mecA_R	5' GGC-CAA-TTC-CAC-ATT-GTT-TC 3'
dfrA27_F	5' TTG-TTG-TTT-CTG-GTG-GTG-GA 3'	dfrA27_R	5' TTC-CGG-AAA-GAA-AAC-ATT-GC 3'
dfrF_F	5' GAT-TGT-TGC-GAG-GTC-AAA-GAA 3'	dfrF_R	5' CGC-CCC-ATA-ATA-ACC-ACA-TT 3'
dfrB1_F	5' GAT-TGT-CGG-GTG-GTA-CTG-CA 3'	dfrB1_R	5' TCT-GTA-CTG-AGC-CTG-GGT-GA 3'
vatB_F	5' TGG-GAA-AAA-GCA-ACT-CCA-TC 3'	vatB_R	5' TTC-TGA-CCA-ATC-CAC-ACA-TCA 3'
vat(A)_F	5' GGG-TTG-GGA-GAA-GTA-TAT-GCC-T 3'	vat(A)_R	5' TCC-CCA-ATT-TTC-ACC-CCA-GG 3'
ISSW1_F	5' TTG-AAC-AAG-ACC-ATC-GTC-CA 3'	ISSW1_R	5' TCT-CCA-TCC-CCT-TAA-TCG-TG 3'
ISS1N_F	5' GAC-AGA-GCA-CCG-AAC-TGT-GA 3'	ISS1N_R	5' TGC-CCT-TAA-TCG-TGG-AAG-AG 3'
IS6_IS6100_F	5' GAG-AGA-GCT-TTT-GGC-ATT-GG 3'	IS6_IS6100_R	5' AGA-GGT-AGG-CTG-TCG-CTC-TG 3'
tp614_F	5' TTT-CAC-TGA-GGG-GAT-GGA-AG 3'	tp614_R	5' TTG-CCT-TCC-CAT-TTC-TCA-AC 3'
IS613_F	5' GTG-GCG-GTT-ATT-GAC-GAC-TT 3'	IS613_R	5' TTC-AGC-GTG-TCC-TTC-TGA-TG 3'
IS6_group_F	5' ACC-TTT-GAT-GGT-GGC-GTA-AG 3'	IS6_group_R	5' TAC-CGG-AAC-AAC-GTG-ATT-GA 3'
tn3_tnpA_F	5' TCT-TCG-TCG-CTA-CAG-AGC-AA 3'	tn3_tnpA_R	5' CGT-GGC-TAT-AGG-CTT-TCA-GG 3'
ISec9_F	5' TGA-AAA-GCG-TGG-TAA-TGC-TG 3'	ISec9_R	5' TCG-CCC-AAA-ATG-ACT-TTA-GC 3'
intl1_F	5' GCC-TTG-ATG-TTA-CCC-GAG-AG 3'	intl1_R	5' GAT-CGG-TCG-AAT-GCG-TGT 3'
intl2_F	5' TGC-TTT-TCC-CAC-CCT-TAC-C 3'	intl2_R	5' GAC-GGC-TAC-CCT-CTG-TTA-TCT-C 3'
intl3_F	5' GCC-ACC-ACT-TGT-TTG-AGG-A 3'	intl3_R	5' GGA-TGT-CTG-TGC-CTG-CCT-G 3'



Inc-P1_F	5' TGA-TCC-CAA-CAC-CGT-CGA-TG 3'	Inc-P1_R	5' CTT-CTT-CCC-CTT-GGC-GTC-AT 3'
CrAssphage_F	5' CAG-AAG-TAC-AAA-CTC-CTA-AAA-AAC-GTA-GAG 3'	CrAssphage_R	5' AAT-AAC-GAT-TTA-CGT-GAT-GTA-AC 3'
TTV_F	5' GTA-AGT-GCA-CTT-CCG-AAT-GGC-TGA-G 3'	TTV_R	5' GCC-GAA-TTG-CCC-TTG-AC 3'
16S rRNA_F	5' CAA-CGC-GAR-GAA-CCT-TAC-C 3'	16S rRNA_R	5' ACA-ACA-CGA-GCT-GAC-GAC 3'

**Annexe 5: Profils de résistance (I+R) aux antibiotiques des isolats d'Enterobacterales et de *Pseudomonas spp.* résistantes sélectionnés en hiver le long des fleuves**

<sup>a</sup> : BLSE

<sup>b</sup> : résistance à l'imipénème

Enterobacterales (1 CFU)		Amoxicilline - acide clavulanique	Céfépime	Impipénème	Ceftazidime	Pipéracilline - tazobactam	Gentamicine	Amikacine	Aztréonam
<b>Beyrouth</b>									
Dleibeh	<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	R	I	R	S	S	R	R	R
Qanatir Zbeida	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>	S	R	S	R	S	I	S	R
	<i>Enterobacter cloacae</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	I	S	R
Embouchure	<i>Hafnia alvei</i>	R	R	S	R	R	S	I	R
<b>Jawz</b>									
Kaftoun	<i>Escherichia coli</i>	R	I	S	I	S	S	S	R
<b>Bared</b>									
Mechmech	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>b</sup>	R	R	I	R	I	S	S	R
	<i>Enterobacter aerogenes</i> <sup>a,b</sup>	R	R	R	R	I	R	I	R
	<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	R	R	I	R	I	R	I	R
Al Qorneh	<i>Serratia fonticola</i>	R	I	S	S	S	S	S	R
Adweh	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>b</sup>	R	R	I	R	R	I	S	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	I	S	S	S	R
<b>Kaleb</b>									
<b>Qadicha</b>									
Al Arez	<i>Enterobacter aerogenes</i> <sup>b</sup>	R	R	R	R	R	I	R	R
	<i>Pantpeoe spp3</i>	R	I	S	R	S	I	S	I
Mir yat <sup>a</sup>	<i>Hafnia alvei</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	I	S	R
	<i>Hafnia alvei</i>	R	R	S	R	I	S	S	R
Deir Nbouh	<i>Hafnia alvei</i> <sup>a,b</sup>	R	R	I	R	S	I	S	R
Rachiin	<i>Escherichia coli</i> <sup>a,b</sup>	R	R	S	R	S	R	S	R
Tripoli- Zgharta	<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R

Aarqa									
Sortie Qobbit Chamra	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>a b</sup>	R	R	I	R	S	I	S	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	S	R
Minieh-Arida	<i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
Embouchure	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	R	S	R
Janoubi									
Hekr El Daher	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	R	R	R	R	I	S	S	R
Embouchure	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	S	R	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
Ostuene									
Ain El Zeit	<i>Enterobacter amnigenus</i>	R	I	S	S	S	S	S	S
Daousseh	<i>Salmonella spp.</i>	R	S	S	R	S	S	S	R
Tal El Zafer	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	I	S	R
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	R	S	S	I	R	R	S	R
	<i>Serratia liquefaciens</i> <sup>b</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R
Masoudieh	<i>Pantoeae spp1</i>	R	S	S	R	S	S	S	S
Kneiseh	<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	R	I	I	R	R	S	R	I
Damour									
Bkhechtay	<i>Moellerella wisconsensis</i>	S	I	S	R	S	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>	R	I	S	S	S	R	S	R
Bhouara	<i>Salmonella spp</i>	R	I	S	S	S	S	S	R
Ghaboun 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
Ghaboun 2	<i>Shigellae spp</i> <sup>a</sup>	R	I	S	R	R	S	S	R
Mazraaet El Naher	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	I	I	S	R	R
Lehbyeh	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	S	S	I
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	I	R	I	R
Hasbani									
Jisr El Chakaa	<i>Enterobacter cloaceae</i> <sup>b</sup>	R	R	I	R	S	S	S	R
Litani									
Beit Cheima	<i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>	R	I	S	I	S	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>	R	R	S	S	S	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i> <sup>a</sup>	R	R	S	I	S	S	S	R
	<i>Enterobacter aerogenes</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
	<i>Serratia liquefaciens</i>	R	S	S	S	S	R	S	R
H a E c	<i>Escherichia coli</i>	R	I	S	S	R	S	S	I

	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R
Faour	<i>Enterobacter sakazakii</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Serratia marcescens</i> <sup>a b</sup>	R	S	R	I	S	S	S	R
	<i>Serratia liquefaciens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Enterobacter cloacae</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	R	R	R
	<i>Enterobacter cloacae</i> <sup>a</sup>	R	S	S	R	S	S	S	R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	S	S	S	I	S	S
	<i>Pantoea spp3</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	R	S	S	R
	<i>Serratia odorifera</i> <sup>a</sup>	R	S	S	I	S	S	S	R
<b>Awali</b>									
Maaser El Chouf	<i>Pantoea spp1</i>	R	R	S	S	S	S	S	R
Embouchure	<i>Enterobacter amnigenus</i>	R	I	S	R	R	S	S	R
	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	S	R
	<i>Pseudomonas spp.</i> (1 UFC)	Amoxicillin-clavulanic acid	Céfépime	Imipénème	Céftazidime	Pipéracilline-tazobactam	Gentamicine	Amikacine	Aztréonam
<b>Beirut</b>									
Beit Meri	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	S	S	R
Deir Khouna	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	S	S	R
Embouchure	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	S	R
<b>Jawz</b>									
Beit Chlela	<i>Pseudomonas putids</i>	R	R	S	R	S	R	S	R
Bsatin el Assy	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
Embouchure	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	S	I	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	S	S	R

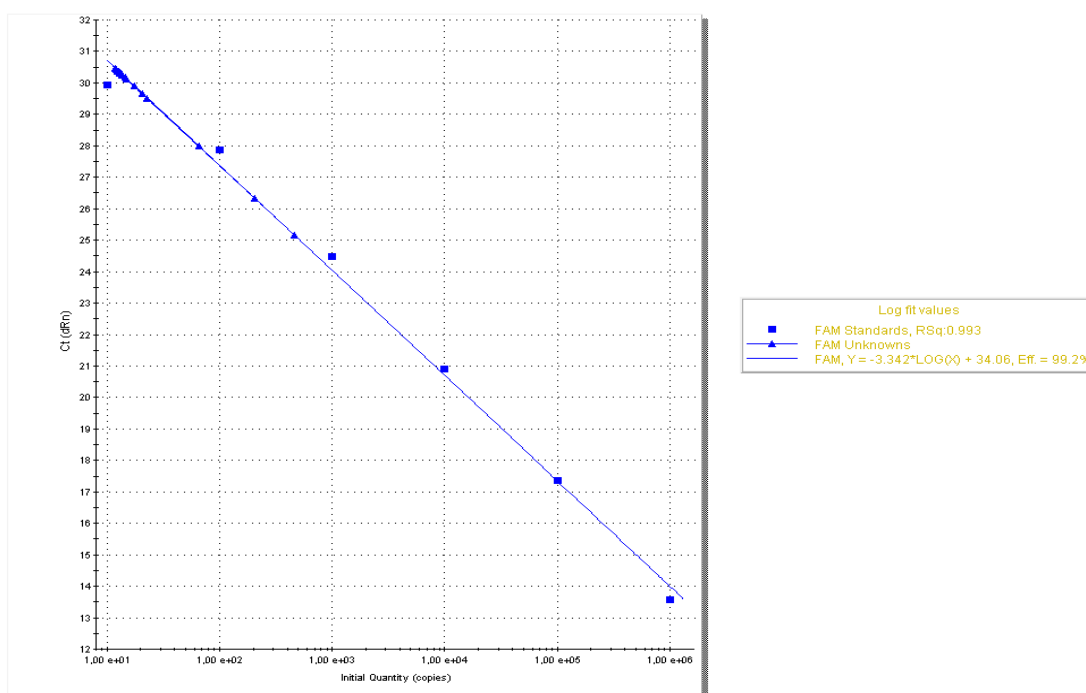
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
<b>Bared</b>									
Mechmech	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	R	S	S	R
Embouchure	<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	R	S	S	R
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	S	R	R	S	S	R
<b>Kaleb</b>									
Faytroun – Mazraaet Kfardebien	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	R	S	S	S	R
<b>Qadicha</b>									
Al Arez	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	R	S	R
Bcharreh	<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	R	S	R
Ehden	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	R	S	R
Rachiin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
Tripoli-Zgharta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	S	R	S	S	R
Tripoli Souk	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>b</sup>	R	R	R	R	R	S	S	R
<b>Aarqa</b>									
Qantara	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	S	R	S	S	I
Sortie Qobbit Chamra	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	S	S	R	R
<b>Janoubi</b>									
Hekr el Daher	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R

Embouchure	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	S	R	R	S	S	R
	<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>	R	R	S	R	R	R	R	R
<b>Ostuène</b>									
Soueisseh	<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	R	R	I	R
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	R	S	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	S	R	S	S	R
Rihanyeh	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	R	R	S	S	R
Koueikhat	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a b</sup>	R	R	R	R	R	S	I	R
Tal Abbas Al Gharbeh	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	R	S	R	S	R
Massoudyeh	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
<b>Damour</b>									
Bhouara	<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	R	S	R
	<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
Ghaboun 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	S	R	S	R
Mazraaet El Naher	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	S	R	S	S	R
Mecherfeh	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	S	S	R
<b>Hasbani</b>									
Fardis	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	S	R	R	R	R	R
Mairie	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	S	S	I	R
Wazani	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	S	S	S	R
<b>Litani</b>									
Faour	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	R	S	R	S	S	S	R
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	S	S	S	R

Chtoura	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>b</sup>	R	R	I	R	S	R	S	R
	<i>Pseudomonas putida</i>	R	S	S	S	S	S	S	R
Tamnin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>b</sup>	R	R	I	R	R	S	S	R
Dalhameh	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>a</sup>	R	R	S	S	S	S	S	R
<b>Awali</b>									
Maaser El Chouf	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	S	R	R	S	R
Embouchure	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	S	R	R	R	S	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	R	R	R

### Annexe 6: Courbe standard « Standard Curve » de la qPCR du crAssphage

Standard Curve



## Références

- Adams, Mark D *et al.* 2008. "Comparative Genome Sequence Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Journal of bacteriology* 190(24): 8053–64.
- Ahmed, Warish *et al.* 2018. "Precipitation Influences Pathogenic Bacteria and Antibiotic Resistance Gene Abundance in Storm Drain Outfalls in Coastal Sub-Tropical Waters." *Environment international* 116: 308–18.
- Albalat, Ricard, and Cristian Cañestro. 2016. "Evolution by Gene Loss." *Nature Reviews Genetics* 17(7): 379.
- Allmeier, Helmut, Bronislava Cresnar, Michaela Greck, and Rüdiger Schmitt. 1992. "Complete Nucleotide Sequence of Tn1721: Gene Organization and a Novel Gene Product with Features of a Chemotaxis Protein." *Gene* 111(1): 11–20.
- Alyamani, Essam J *et al.* 2017. "The Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia Coli* Carrying Aminoglycoside Resistance Genes in Urinary Tract Infections in Saudi Arabia." *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 16(1): 1.
- Amarasiri, Mohan, Daisuke Sano, and Satoru Suzuki. 2019. "Understanding Human Health Risks Caused by Antibiotic Resistant Bacteria (ARB) and Antibiotic Resistance Genes (ARG) in Water Environments: Current Knowledge and Questions to Be Answered." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*: 1–44.
- Amarasiri, Mohan, Daisuke Sano, and Satoru Suzuki. 2020. "Understanding Human Health Risks Caused by Antibiotic Resistant Bacteria (ARB) and Antibiotic Resistance Genes (ARG) in Water Environments: Current Knowledge and Questions to Be Answered." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50(19): 2016–59.
- Ambrose, Stephanie J, and Ruth M Hall. 2019. "Novel Trimethoprim Resistance Gene, DfrA35, in IncC Plasmids from Australia." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74(7): 1863–66.
- Amos, Gregory C A *et al.* 2015. "Validated Predictive Modelling of the Environmental Resistome." *The ISME journal* 9(6): 1467.
- Amos, Gregory C A *et al.* 2018. 2018. "The Widespread Dissemination of Integrons throughout Bacterial Communities in a Riverine System." *The ISME journal* 12(3): 681–91.
- An, Xin-Li *et al.* 2018. "Tracking Antibiotic Resistome during Wastewater Treatment Using High Throughput Quantitative PCR." *Environment international* 117: 146–53.
- An, Xin-Li *et al.* 2020. "High-Throughput Diagnosis of Human Pathogens and Fecal Contamination in Marine Recreational Water." *Environmental Research* 190: 109982.
- Andrade, Luisa *et al.* 2020. "Groundwater Resources as a Global Reservoir for Antimicrobial-Resistant Bacteria." *Water Research* 170: 115360.
- ANSES. 2020. "No Title." *Antibiorésistance et environnement État et causes possibles de la*

*contamination des milieux en France.*

<https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf>.

- Anthony, Eric Tobeckukwu, Omobola O Okoh, Anthony I Okoh, and Mike O Ojemaye. 2019. "A Critical Review on the Occurrence of Resistomes in the Environment and Their Removal from Wastewater Using Apposite Treatment Technologies: Limitations, Successes and Future Improvement." *Environmental Pollution*: 113791.
- Arakawa, Yoshichika *et al.* 1995. "A Novel Integron-like Element Carrying the Metallo-Beta-Lactamase Gene Bla<sub>IMP</sub>." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39(7): 1612–15.
- Arola, Kimmo, Bart Van der Bruggen, Mika Mänttari, and Mari Kallioinen. 2019. "Treatment Options for Nanofiltration and Reverse Osmosis Concentrates from Municipal Wastewater Treatment: A Review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 49(22): 2049–2116.
- Arthur, MICHEL, C Molinas, F Depardieu, and P Courvalin. 1993. "Characterization of Tn1546, a Tn3-Related Transposon Conferring Glycopeptide Resistance by Synthesis of Depsipeptide Peptidoglycan Precursors in Enterococcus Faecium BM4147." *Journal of bacteriology* 175(1): 117–27.
- Asante, Jonathan, and John Osei Sekyere. 2019. "Understanding Antimicrobial Discovery and Resistance from a Metagenomic and Metatranscriptomic Perspective: Advances and Applications." *Environmental microbiology reports* 11(2): 62–86.
- Aubertheau, Elodie *et al.* 2017. "Impact of Wastewater Treatment Plant Discharge on the Contamination of River Biofilms by Pharmaceuticals and Antibiotic Resistance." *Science of the Total Environment* 579: 1387–98.
- Bae, Sungwoo, Juan P Maestre, Kerry A Kinney, and Mary Jo Kirisits. 2019. "An Examination of the Microbial Community and Occurrence of Potential Human Pathogens in Rainwater Harvested from Different Roofing Materials." *Water research* 159: 406–13.
- Bai, Ying, Xiaohong Ruan, Xianchuan Xie, and Zhongyue Yan. 2019. "Antibiotic Resistome Profile Based on Metagenomics in Raw Surface Drinking Water Source and the Influence of Environmental Factor: A Case Study in Huaihe River Basin, China." *Environmental Pollution* 248: 438–47.
- Ballesté, E *et al.* 2019. "Dynamics of CrAssphage as a Human Source Tracking Marker in Potentially Faecally Polluted Environments." *Water research* 155: 233–44.
- Becker, Karsten *et al.* 2018. "Plasmid-Encoded Transferable MecB-Mediated Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus." *Emerging infectious diseases* 24(2): 242.
- Ben, Yujie *et al.* 2018. "Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review." *Environmental research*.
- Bengtsson-Palme, Johan, and D G Joakim Larsson. 2015. "Antibiotic Resistance Genes in the Environment: Prioritizing Risks." *Nature Reviews Microbiology* 13(6): 396.
- Bengtsson-Palme, Johan, D G Joakim Larsson, and Erik Kristiansson. 2017. "Using



- Metagenomics to Investigate Human and Environmental Resistomes." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(10): 2690–2703.
- Berendonk, Thomas U *et al.* 2015. "Tackling Antibiotic Resistance: The Environmental Framework." *Nature Reviews Microbiology* 13(5): 310–17.
- Berglund, Fanny *et al.* 2019. "Identification and Reconstruction of Novel Antibiotic Resistance Genes from Metagenomes." *Microbiome* 7(1): 52.
- Bethke, Jonathan H *et al.* 2020. "Environmental and Genetic Determinants of Plasmid Mobility in Pathogenic Escherichia Coli." *Science Advances* 6(4): eaax3173.
- Bielen, Ana *et al.* 2017. "Negative Environmental Impacts of Antibiotic-Contaminated Effluents from Pharmaceutical Industries." *Water research* 126: 79–87.
- Bivins, Aaron *et al.* 2020. "CrAssphage and Pepper Mild Mottle Virus as Viral Water Quality Monitoring Tools—Potential, Research Gaps, and Way Forward." *Current Opinion in Environmental Science & Health*.
- Bleichenbacher, Stephanie *et al.* 2020. "Environmental Dissemination of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Rivers in Switzerland." *Environmental pollution* 265: 115081.
- Bohan, David A *et al.* 2017. "Next-Generation Global Biomonitoring: Large-Scale, Automated Reconstruction of Ecological Networks." *Trends in Ecology & Evolution* 32(7): 477–87.
- Bondarczuk, Kinga, Anna Markowicz, and Zofia Piotrowska-Seget. 2016. "The Urgent Need for Risk Assessment on the Antibiotic Resistance Spread via Sewage Sludge Land Application." *Environment international* 87: 49–55.
- Bondarczuk, Kinga, and Zofia Piotrowska-Seget. 2019. "Microbial Diversity and Antibiotic Resistance in a Final Effluent-Receiving Lake." *Science of The Total Environment* 650: 2951–61.
- Borowiak, Maria *et al.* 2019. "Characterization of Mcr-5-Harboring Salmonella Enterica Subsp. Enterica Serovar Typhimurium Isolates from Animal and Food Origin in Germany." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63(6): e00063-19.
- Bourgin, Marc *et al.* 2018. "Evaluation of a Full-Scale Wastewater Treatment Plant Upgraded with Ozonation and Biological Post-Treatments: Abatement of Micropollutants, Formation of Transformation Products and Oxidation by-Products." *Water research* 129: 486–98.
- Bräu, Barbara, and Wolfgang Piepersberg. 1983. "Cointegrational Transduction and Mobilization of Gentamicin Resistance Plasmid PWP14a Is Mediated by IS140." *Molecular and General Genetics MGG* 189(2): 298–303.
- Brown, A M, G M Coupland, and NEIL S Willetts. 1984. "Characterization of IS46, an Insertion Sequence Found on Two IncN Plasmids." *Journal of bacteriology* 159(2): 472–81.
- Brown, Philip C, Ewa Borowska, Thomas Schwartz, and Harald Horn. 2019. "Impact of the Particulate Matter from Wastewater Discharge on the Abundance of Antibiotic

- Resistance Genes and Facultative Pathogenic Bacteria in Downstream River Sediments." *Science of The Total Environment* 649: 1171–78.
- Buelow, Elena *et al.* 2017. "Comparative Gut Microbiota and Resistome Profiling of Intensive Care Patients Receiving Selective Digestive Tract Decontamination and Healthy Subjects." *Microbiome* 5(1): 88.
- Buelow, Elena *et al.* 2018. "Limited Influence of Hospital Wastewater on the Microbiome and Resistome of Wastewater in a Community Sewerage System." *FEMS microbiology ecology* 94(7): fiy087.
- Buelow, Elena *et al.* 2020. "Hospital Discharges in Urban Sanitation Systems: Long-Term Monitoring of Wastewater Resistome and Microbiota in Relationship to Their Eco-Exposome." *Water Research X*: 100045.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589914720300050> (February 4, 2020).
- Bush, Karen, George A Jacoby, and Antone A Medeiros. 1995. "A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39(6): 1211–33.
- Cacace, Damiano *et al.* 2019. "Antibiotic Resistance Genes in Treated Wastewater and in the Receiving Water Bodies: A Pan-European Survey of Urban Settings." *Water research* 162: 320–30.
- Cafini, Fabio, Veronica Medrano Romero, and Kazuya Morikawa. 2017. "Mechanisms of Horizontal Gene Transfer." *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*: 61.
- Calero-Cáceres, William, Javier Méndez, Julia Martín-Díaz, and Maite Muniesa. 2017. "The Occurrence of Antibiotic Resistance Genes in a Mediterranean River and Their Persistence in the Riverbed Sediment." *Environmental Pollution* 223: 384–94.
- Cars, Otto *et al.* 2016. "Building Bridges to Operationalise One Health—a Sino-Swedish Collaboration to Tackle Antibiotic Resistance." *One Health* 2: 139–43.
- Cavaco, L M<sup>†</sup>, Henrik Hasman, S Xia, and Frank Møller Aarestrup. 2009. "QnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in Salmonella Enterica Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(2): 603–8.
- Charlebois, Audrey *et al.* 2012. "Characterization of Genes Encoding for Acquired Bacitracin Resistance in Clostridium Perfringens."
- Chatterjee, Anuja *et al.* 2018. "Quantifying Drivers of Antibiotic Resistance in Humans: A Systematic Review." *The Lancet Infectious Diseases* 18(12): e368–78.
- Chaturvedi, Preeti, Pankaj Chowdhary, *et al.* 2021. "Dissemination of Antibiotic Resistance Genes, Mobile Genetic Elements, and Efflux Genes in Anthropogenically Impacted Riverine Environments." *Chemosphere*: 129693.
- Chaturvedi, Preeti, Anuradha Singh, *et al.* 2021. "Occurrence of Emerging Sulfonamide

- Resistance (Sul1 and Sul2) Associated with Mobile Integrations-Integrase (Int1 and Int2) in Riverine Systems." *Science of The Total Environment* 751: 142217.
- Che, You *et al.* 2021. "Conjugative Plasmids Interact with Insertion Sequences to Shape the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(6).
- Chen, Baowei *et al.* 2016. "Metagenomic Analysis Revealing Antibiotic Resistance Genes (ARGs) and Their Genetic Compartments in the Tibetan Environment." *Environmental science & technology* 50(13): 6670–79.
- Chen, Baowei *et al.* 2018. "Complex Pollution of Antibiotic Resistance Genes Due to Beta-Lactam and Aminoglycoside Use in Aquaculture Farming." *Water research* 134: 200–208.
- Chen, Haiyang, Ruihui Chen, *et al.* 2019. "A Metagenomic Analysis Framework for Characterization of Antibiotic Resistomes in River Environment: Application to an Urban River in Beijing." *Environmental pollution* 245: 398–407.
- Chen, Haiyang, Xiaomei Bai, Yuezhao Li, *et al.* 2019a. "Characterization and Source-Tracking of Antibiotic Resistomes in the Sediments of a Peri-Urban River." *Science of The Total Environment* 679: 88–96.
- Chen, Haiyang, Xiaomei Bai, Lijun Jing, *et al.* 2019. "Characterization of Antibiotic Resistance Genes in the Sediments of an Urban River Revealed by Comparative Metagenomics Analysis." *Science of The Total Environment* 653: 1513–21.
- Chen, Haiyang, Xiaomei Bai, Yuezhao Li, *et al.* 2019b. "Source Identification of Antibiotic Resistance Genes in a Peri-Urban River Using Novel CrAssphage Marker Genes and Metagenomic Signatures." *Water Research* 167: 115098.
- Chen, Haiyang *et al.* 2021. "Environmental Risk Characterization and Ecological Process Determination of Bacterial Antibiotic Resistome in Lake Sediments." *Environment International* 147: 106345.
- Chen, Jun *et al.* 2019. "Fate and Removal of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Hybrid Constructed Wetlands." *Environmental Pollution* 249: 894–903.
- Cheruvanky, Anita *et al.* 2017. "Enhanced Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61(6).
- Chiou, C S, and A L Jones. 1993. "Nucleotide Sequence Analysis of a Transposon (Tn5393) Carrying Streptomycin Resistance Genes in Erwinia Amylovora and Other Gram-Negative Bacteria." *Journal of bacteriology* 175(3): 732–40.
- Christou, Anastasis *et al.* 2017. "The Potential Implications of Reclaimed Wastewater Reuse for Irrigation on the Agricultural Environment: The Knowns and Unknowns of the Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes—a Review." *Water research* 123: 448–67.
- Collignon, Peter *et al.* 2018. "Anthropological and Socioeconomic Factors Contributing to

- Global Antimicrobial Resistance: A Univariate and Multivariable Analysis." *The Lancet Planetary Health* 2(9): e398–405.
- Collis, Christina M *et al.* 2002. "Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines." *Journal of bacteriology* 184(11): 3017–26.
- Colonna, Bianca *et al.* 1988. "The Salmonella Wien Virulence Plasmid PZM3 Carries Tn1935, a Multiresistance Transposon Containing a Composite IS1936-Kanamycin Resistance Element." *Plasmid* 20(3): 221–31.
- Coolen, Jordy P M *et al.* 2019. "Development of an Algorithm to Discriminate between Plasmid- and Chromosomal-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Production in Escherichia Coli by Elaborate Phenotypic and Genotypic Characterization." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74(12): 3481–88.
- Couturier, MARTINE, Françoise Bex, Peter L Bergquist, and Werner K Maas. 1988. "Identification and Classification of Bacterial Plasmids." *Microbiological reviews* 52(3): 375–95.
- Couvé-Deacon, E *et al.* 2019. "Proteae: A Reservoir of Class 2 Integrons?" *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74(6): 1560–62.
- Crofts, Terence S, Andrew J Gasparrini, and Gautam Dantas. 2017. "Next-Generation Approaches to Understand and Combat the Antibiotic Resistome." *Nature Reviews Microbiology* 15(7): 422.
- Cury, Jean *et al.* 2016. "Identification and Analysis of Integrons and Cassette Arrays in Bacterial Genomes." *Nucleic acids research* 44(10): 4539–50.
- Czekalski, Nadine *et al.* 2015. "Does Human Activity Impact the Natural Antibiotic Resistance Background? Abundance of Antibiotic Resistance Genes in 21 Swiss Lakes." *Environment international* 81: 45–55.
- Czekalski, Nadine, Elena Gascón Díez, and Helmut Bürgmann. 2014. "Wastewater as a Point Source of Antibiotic-Resistance Genes in the Sediment of a Freshwater Lake." *The ISME journal* 8(7): 1381–90.
- Dagher, Lea A *et al.* 2021. "Nationwide Assessment of Water Quality in Rivers across Lebanon by Quantifying Fecal Indicators Densities and Profiling Antibiotic Resistance of Escherichia Coli." *Antibiotics* 10(7): 883.
- Dang, Bingjun, Daqing Mao, Yan Xu, and Yi Luo. 2017. "Conjugative Multi-Resistant Plasmids in Haihe River and Their Impacts on the Abundance and Spatial Distribution of Antibiotic Resistance Genes." *Water research* 111: 81–91.
- Darwish, T *et al.* 2021. "Sustaining the Ecological Functions of the Litani River Basin, Lebanon." *International Journal of River Basin Management*: 1–15.
- Datta, Naomi, and R W Hedges. 1971. "Compatibility Groups among Fi- R Factors." *Nature* 234(5326): 222–23.
- Dennis, Matthew L *et al.* 2018. "8-Mercaptoguanine Derivatives as Inhibitors of

- Dihydropteroate Synthase." *Chemistry—A European Journal* 24(8): 1922–30.
- Desbiolles, Fanny *et al.* 2018. "Occurrence and Ecotoxicological Assessment of Pharmaceuticals: Is There a Risk for the Mediterranean Aquatic Environment?" *Science of the Total Environment* 639: 1334–48.
- Diab, Mohamad *et al.* 2018. "Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Water Sources in Lebanon." *Veterinary microbiology* 217: 97–103.
- Dickinson, Andrew William *et al.* 2019. "Heavy Metal Pollution and Co-Selection for Antibiotic Resistance: A Microbial Palaeontology Approach." *Environment international* 132: 105117.
- Dinos, George P. 2017. "The Macrolide Antibiotic Renaissance." *British journal of pharmacology* 174(18): 2967–83.
- Du, Dijun *et al.* 2018. "Multidrug Efflux Pumps: Structure, Function and Regulation." *Nature Reviews Microbiology* 16(9): 523–39.
- Duan, Manli *et al.* 2019. "Factors That Affect the Occurrence and Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Soils from Livestock and Poultry Farms." *Ecotoxicology and environmental safety* 180: 114–22.
- Dunachie, Susanna J, Nicholas P J Day, and Christiane Dolecek. 2020. "The Challenges of Estimating the Human Global Burden of Disease of Antimicrobial Resistant Bacteria." *Current Opinion in Microbiology* 57: 95–101.
- Dzyubak, Ekaterina, and Mee-Ngan F Yap. 2016. "The Expression of Antibiotic Resistance Methyltransferase Correlates with mRNA Stability Independently of Ribosome Stalling." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60(12): 7178–88.
- Engelstädter, Jan, Klaus Harms, and Pål J Johnsen. 2016. "The Evolutionary Dynamics of Integrons in Changing Environments." *The ISME journal* 10(6): 1296–1307.
- Essack, Sabiha Y. 2018. "Environment: The Neglected Component of the One Health Triad." *The Lancet Planetary Health* 2(6): e238–39.
- Fahrenfeld, N L *et al.* 2017. "Shifts in Microbial Community Structure and Function in Surface Waters Impacted by Unconventional Oil and Gas Wastewater Revealed by Metagenomics." *Science of the Total Environment* 580: 1205–13.
- Falk, N *et al.* 2019. "Microbial Metatranscriptomic Investigations across Contaminant Gradients of the Detroit River." *Science of the Total Environment* 690: 121–31.
- Fang, Tingting *et al.* 2018. "Diversity of Potential Antibiotic-Resistant Bacterial Pathogens and the Effect of Suspended Particles on the Spread of Antibiotic Resistance in Urban Recreational Water." *Water research* 145: 541–51.
- Fayad, Abbas. 2017. "Evaluation of the Snow Water Resources in Mount Lebanon Using Observations and Modelling."

- Fernandez-Lopez, Raul, Santiago Redondo, M Pilar Garcillan-Barcia, and Fernando de la Cruz. 2017. "Towards a Taxonomy of Conjugative Plasmids." *Current opinion in microbiology* 38: 106–13.
- Fiorentino, Antonino *et al.* 2019. "Impact of Industrial Wastewater on the Dynamics of Antibiotic Resistance Genes in a Full-Scale Urban Wastewater Treatment Plant." *Science of the Total Environment* 646: 1204–10.
- Fleres, Giuseppe *et al.* 2019. "Detection of a Novel Mcr-5.4 Gene Variant in Hospital Tap Water by Shotgun Metagenomic Sequencing." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74(12): 3626–28.
- Flores-Orozco, Daniel *et al.* 2020. "Effect of Mesophilic Anaerobic Digestion on the Resistome Profile of Dairy Manure." *Bioresource Technology* 315: 123889.
- Focosi, Daniele, Guido Antonelli, Mauro Pistello, and Fabrizio Maggi. 2016. "Torquetenovirus: The Human Virome from Bench to Bedside." *Clinical Microbiology and Infection* 22(7): 589–93.
- Gatica, Joao *et al.* 2016. "High Throughput Analysis of Integron Gene Cassettes in Wastewater Environments." *Environmental science & technology* 50(21): 11825–36.
- El Ghachi, Meriem *et al.* 2018. "Crystal Structure of Undecaprenyl-Pyrophosphate Phosphatase and Its Role in Peptidoglycan Biosynthesis." *Nature communications* 9(1): 1–13.
- Ghaly, Timothy M, Jemma L Geoghegan, Sasha G Tetu, and Michael R Gillings. 2020. "The Peril and Promise of Integrons: Beyond Antibiotic Resistance." *Trends in Microbiology*.
- Ghaly, Timothy M, and Michael R Gillings. 2018. "Mobile DNAs as Ecologically and Evolutionarily Independent Units of Life." *Trends in microbiology* 26(11): 904–12.
- Gill, Christian M, Tomefa E Asempa, and David P Nicolau. 2020. "Development and Application of a Pragmatic Algorithm to Guide Definitive Carbapenemase Testing to Identify Carbapenemase-Producing Pseudomonas Aeruginosa." *Antibiotics* 9(11): 738.
- Gillings, M R, M Westoby, and T M Ghaly. 2018. "Pollutants That Replicate: Xenogenetic DNAs." *Trends in microbiology* 26(12): 975–77.
- Gillings, Michael R *et al.* 2009. "Mobilization of a Tn 402-like Class 1 Integron with a Novel Cassette Array via Flanking Miniature Inverted-Repeat Transposable Element-like Structures." *Applied and environmental microbiology* 75(18): 6002–4.
- Gillings, Michael R *et al.* 2014. "Integrons: Past, Present, and Future." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78(2): 257–77.
- Gillings, Michael R *et al.* 2017. "Class 1 Integrons as Invasive Species." *Current opinion in microbiology* 38: 10–15.
- Godbole, Gauri S *et al.* 2018. "First Report of CTX-M-15 Salmonella Typhi from England." *Clinical infectious diseases* 66(12): 1976–77.

- González-Plaza, Juan José *et al.* 2019. "Antibiotic-Manufacturing Sites Are Hot-Spots for the Release and Spread of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Receiving Aquatic Environments." *Environment international* 130: 104735.
- Gou, Min *et al.* 2018. "Aerobic Composting Reduces Antibiotic Resistance Genes in Cattle Manure and the Resistome Dissemination in Agricultural Soils." *Science of The Total Environment* 612: 1300–1310.
- Goulas, Anais *et al.* 2020. "How Effective Are Strategies to Control the Dissemination of Antibiotic Resistance in the Environment? A Systematic Review." *Environmental Evidence* 9(1): 1–32.
- Grinsted, John, and Fernando De La Cruz. 1990. "The Tn21 Subgroup of Bacterial Transposable Elements." *Plasmid* 24(3): 163–89.
- Guerin, Émilie *et al.* 2009. "The SOS Response Controls Integron Recombination." *Science* 324(5930): 1034.
- Gullberg, Erik *et al.* 2014. "Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals." *MBio* 5(5): e01918-14.
- Guo, Jianhua *et al.* 2017. "Metagenomic Analysis Reveals Wastewater Treatment Plants as Hotspots of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements." *Water research* 123: 468–78.
- Guo, Xiaoyu *et al.* 2019. "Spatial Distribution, Source Apportionment and Risk Assessment of Antibiotics in the Surface Water and Sediments of the Yangtze Estuary." *Science of the Total Environment* 671: 548–57.
- Guo, Xing-pan *et al.* 2018. "Seasonal and Spatial Distribution of Antibiotic Resistance Genes in the Sediments along the Yangtze Estuary, China." *Environmental Pollution* 242: 576–84.
- Hajjar, K Z. 1997. "Lebanese Water and the Peace in the Near East."
- Hamidian, Mohammad, and Ruth M Hall. 2017. "Origin of the AbGRI1 Antibiotic Resistance Island Found in the ComM Gene of Acinetobacter Baumannii GC2 Isolates." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(10): 2944–47.
- Hansson, Karin, Lars Sundström, Alex Pelletier, and Paul H Roy. 2002. "IntI2 Integron Integrase in Tn7." *Journal of bacteriology* 184(6): 1712–21.
- Hardwick, Simon A *et al.* 2018. "Synthetic Microbe Communities Provide Internal Reference Standards for Metagenome Sequencing and Analysis." *Nature communications* 9(1): 1–10.
- Harmer, Christopher J, and Ruth M Hall. 2019. "An Analysis of the IS6/IS26 Family of Insertion Sequences: Is It a Single Family?" *Microbial genomics* 5(9).
- Hata, Mami *et al.* 2005. "Cloning of a Novel Gene for Quinolone Resistance from a Transferable Plasmid in Shigella Flexneri 2b." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(2): 801–3.

- Hernando-Amado, Sara, Teresa M Coque, Fernando Baquero, and José L Martínez. 2019. "Defining and Combating Antibiotic Resistance from One Health and Global Health Perspectives." *Nature microbiology* 4(9): 1432–42.
- Hitchcock, James N, and Simon M Mitrovic. 2019. "Microplastic Pollution in Estuaries across a Gradient of Human Impact." *Environmental Pollution* 247: 457–66.
- Holmes, Alison H *et al.* 2016. "Understanding the Mechanisms and Drivers of Antimicrobial Resistance." *The Lancet* 387(10014): 176–87.
- Huang, Haiwei *et al.* 2019. "Diverse and Abundant Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in an Urban Water System." *Journal of environmental management* 231: 494–503.
- Huang, Xu *et al.* 2015. "Performance of Vertical Up-Flow Constructed Wetlands on Swine Wastewater Containing Tetracyclines and Tet Genes." *Water research* 70: 109–17.
- Hudson, John A *et al.* 2017. "The Agri-Food Chain and Antimicrobial Resistance: A Review." *Trends in Food Science & Technology* 69: 131–47.
- Huijbers, Patricia M C *et al.* 2015. "Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review." *Environmental science & technology* 49(20): 11993–4.
- Huijbers, Patricia M C, Carl-Fredrik Flach, and D G Joakim Larsson. 2019. "A Conceptual Framework for the Environmental Surveillance of Antibiotics and Antibiotic Resistance." *Environment international* 130: 104880.
- Hülter, Nils *et al.* 2017. "An Evolutionary Perspective on Plasmid Lifestyle Modes." *Current opinion in microbiology* 38: 74–80.
- Hultman, Jenni *et al.* 2018. "Host Range of Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment Plant Influent and Effluent." *FEMS microbiology ecology* 94(4): fiy038.
- Humeniuk, Christel *et al.* 2002. "β-Lactamases of *Kluyvera Ascorbata*, Probable Progenitors of Some Plasmid-Encoded CTX-M Types." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(9): 3045–49.
- Humphries, R M, and J A Hindler. 2016. "Emerging Resistance, New Antimicrobial Agents... but No Tests! The Challenge of Antimicrobial Susceptibility Testing in the Current US Regulatory Landscape." *Clinical Infectious Diseases* 63(1): 83–88.
- Imran, Md, Kirti Ranjan Das, and Milind Mohan Naik. 2019. "Co-Selection of Multi-Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens in Metal and Microplastic Contaminated Environments: An Emerging Health Threat." *Chemosphere* 215: 846–57.
- Ishii, Satoshi. 2020. "Quantification of Antibiotic Resistance Genes for Environmental Monitoring: Current Methods and Future Directions." *Current Opinion in Environmental Science & Health* 16: 47–53.
- Jacoby, George A *et al.* 2006. "QnrB, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(4): 1178–82.



- Jacoby, George A *et al.* 2009. "AmpC  $\beta$ -Lactamases." *Clinical microbiology reviews* 22(1): 161–82.
- Jangam, Diwash, Cédric Feschotte, and Esther Betrán. 2017. "Transposable Element Domestication as an Adaptation to Evolutionary Conflicts." *Trends in Genetics* 33(11): 817–31.
- Jardine, Jocelyn, Vuyo Mavumengwana, and Eunice Ubomba-Jaswa. 2019. "Antibiotic Resistance and Heavy Metal Tolerance in Cultured Bacteria from Hot Springs as Indicators of Environmental Intrinsic Resistance and Tolerance Levels." *Environmental pollution* 249: 696–702.
- Jaya Divakaran, Soumya *et al.* 2019. "Insights into the Bacterial Profiles and Resistome Structures Following the Severe 2018 Flood in Kerala, South India." *Microorganisms* 7(10): 474.
- Jesus, Tiago F *et al.* 2019. "Plasmid ATLAS: Plasmid Visual Analytics and Identification in High-Throughput Sequencing Data." *Nucleic acids research* 47(D1): D188–94.
- Jia, Jia *et al.* 2018. "Occurrence and Distribution of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Ba River, China." *Science of the total environment* 642: 1136–44.
- Jiang, Xinglin *et al.* 2017. "Dissemination of Antibiotic Resistance Genes from Antibiotic Producers to Pathogens." *Nature communications* 8(1): 1–7.
- Jin, Yuanxiang, Sisheng Wu, Zhaoyang Zeng, and Zhengwei Fu. 2017. "Effects of Environmental Pollutants on Gut Microbiota." *Environmental Pollution* 222: 1–9.
- Jové, Thomas. 2010. "Régulation de l'expression Des Gènes de Cassettes et de l'intégrase Des Intégrons de Multirésistance Aux Antibiotiques."
- Jové, Thomas *et al.* 2017. "Gene Expression in Class 2 Integrons Is SOS-Independent and Involves Two Pc Promoters." *Frontiers in microbiology* 8: 1499.
- Ju, Feng *et al.* 2019. "Wastewater Treatment Plant Resistomes Are Shaped by Bacterial Composition, Genetic Exchange, and Upregulated Expression in the Effluent Microbiomes." *The ISME journal* 13(2): 346–60.
- Karkman, Antti, Thi Thuy Do, Fiona Walsh, and Marko P J Virta. 2018. "Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water." *Trends in microbiology* 26(3): 220–28.
- Karkman, Antti, Katariina Pärnänen, and D G Joakim Larsson. 2019. "Fecal Pollution Can Explain Antibiotic Resistance Gene Abundances in Anthropogenically Impacted Environments." *Nature communications* 10(1): 80.
- Karlowsky, James A *et al.* 2017. "In Vitro Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Isolates Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014." *Journal of clinical microbiology* 55(6): 1638–49.
- Kassem, Youssef, and H Gökçekuş. 2019. "Water Resources and Rainfall Distribution Function: A Case Study in Lebanon." *Desalination and Water Treatment* 177: 306–21.

- Kazour, Maria *et al.* 2019. "Microplastics Pollution along the Lebanese Coast (Eastern Mediterranean Basin): Occurrence in Surface Water, Sediments and Biota Samples." *Science of the Total Environment* 696: 133933.
- Khalifeh, Malak, Nicholas Moore, and Pascale Salameh. 2017. "Community Usage Pattern of Antibiotics within Lebanese Population: A Prospective Study." *American Journal of Pharmacological Sciences* 5(2): 49–56.
- Kieffer, Nicolas *et al.* 2020. "ISEcp1-Mediated Transposition Leads to Fosfomycin and Broad-Spectrum Cephalosporin Resistance in *Klebsiella Pneumoniae*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64(5).
- Klompe, Sanne E, Phuc L H Vo, Tyler S Halpin-Healy, and Samuel H Sternberg. 2019. "Transposon-Encoded CRISPR–Cas Systems Direct RNA-Guided DNA Integration." *Nature* 571(7764): 219–25.
- Kowal, Przemysław *et al.* 2021. "Assessment of Diversity and Composition of Bacterial Community in Sludge Treatment Reed Bed Systems." *Science of The Total Environment* 756: 144060.
- Krause, Kevin M, Alisa W Serio, Timothy R Kane, and Lynn E Connolly. 2016. "Aminoglycosides: An Overview." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6(6): a027029.
- Krizova, Lenka, Lenie Dijkshoorn, and Alexandr Nemec. 2011. "Diversity and Evolution of AbaR Genomic Resistance Islands in *Acinetobacter Baumannii* Strains of European Clone I." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(7): 3201–6.
- Krzeminski, Pawel *et al.* 2019. "Performance of Secondary Wastewater Treatment Methods for the Removal of Contaminants of Emerging Concern Implicated in Crop Uptake and Antibiotic Resistance Spread: A Review." *Science of the Total Environment* 648: 1052–81.
- Kulifaj, Dorian *et al.* 2018. "Development of a Standardized Real Time PCR for Torque Teno Viruses (TTV) Viral Load Detection and Quantification: A New Tool for Immune Monitoring." *Journal of Clinical Virology* 105: 118–27.
- Kumar, Manish *et al.* 2020. "Treatment Enhances the Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes in the Wastewater of Sri Lanka, and India." *Environmental research* 183: 109179.
- Kumar, Mohit *et al.* 2019. "Antibiotics Bioremediation: Perspectives on Its Ecotoxicity and Resistance." *Environment international* 124: 448–61.
- De La Cruz, F, and JOHN Grinsted. 1982. "Genetic and Molecular Characterization of Tn21, a Multiple Resistance Transposon from R100. 1." *Journal of Bacteriology* 151(1): 222–28.
- Laffite, Amandine *et al.* 2020. "Impact of Anthropogenic Activities on the Occurrence and Distribution of Toxic Metals, Extending-Spectra  $\beta$ -Lactamases and Carbapenem Resistance in Sub-Saharan African Urban Rivers." *Science of The Total Environment*: 138129.

- Lallement, Claire. 2018. "Thèse de Doctorat Caractérisation Des Séquences d'Insertions ISCR Bactériennes Impliquées Dans La Résistance Aux."
- Lallement, Claire, Cécile Pasternak, Marie-Cécile Ploy, and Thomas Jové. 2018. "The Role of ISCR1-Borne POUT Promoters in the Expression of Antibiotic Resistance Genes." *Frontiers in microbiology* 9: 2579.
- Lanza, Val F *et al.* 2018. "In-Depth Resistome Analysis by Targeted Metagenomics." *Microbiome* 6(1): 11.
- Laquaz, Marine *et al.* 2018. "Ecotoxicity and Antibiotic Resistance of a Mixture of Hospital and Urban Sewage in a Wastewater Treatment Plant." *Environmental Science and Pollution Research* 25(10): 9243–53.
- Laroche, Emilie *et al.* 2009. "Occurrence of Antibiotic Resistance and Class 1, 2 and 3 Integrons in Escherichia Coli Isolated from a Densely Populated Estuary (Seine, France)." *FEMS microbiology ecology* 68(1): 118–30.
- Larsson, D G Joakim *et al.* 2018. "Critical Knowledge Gaps and Research Needs Related to the Environmental Dimensions of Antibiotic Resistance." *Environment international* 117: 132–38.
- Lau, Calvin Ho-Fung, Yuan-Ching Tien, Robert D Stedtfeld, and Edward Topp. 2020. "Impacts of Multi-Year Field Exposure of Agricultural Soil to Macrolide Antibiotics on the Abundance of Antibiotic Resistance Genes and Selected Mobile Genetic Elements." *Science of The Total Environment*: 138520.
- Laxminarayan, Ramanan *et al.* 2016. "Access to Effective Antimicrobials: A Worldwide Challenge." *The Lancet* 387(10014): 168–75.
- Lee, Chao-Hung, Ashok Bhagwat, and Fred Heffron. 1983. "Identification of a Transposon Tn3 Sequence Required for Transposition Immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(22): 6765–69.
- Lee, Kihyun *et al.* 2020. "Mobile Resistome of Human Gut and Pathogen Drives Anthropogenic Bloom of Antibiotic Resistance." *Microbiome* 8(1): 1–14.
- Lehmann, Katja *et al.* 2016. "Trace Levels of Sewage Effluent Are Sufficient to Increase Class 1 Integron Prevalence in Freshwater Biofilms without Changing the Core Community." *Water research* 106: 163–70.
- Lekunberri, Itziar, José Luis Balcázar, and Carles M Borrego. 2018. "Metagenomic Exploration Reveals a Marked Change in the River Resistome and Mobilome after Treated Wastewater Discharges." *Environmental pollution* 234: 538–42.
- Leonard, Anne F C *et al.* 2018. "Exposure to and Colonisation by Antibiotic-Resistant E. Coli in UK Coastal Water Users: Environmental Surveillance, Exposure Assessment, and Epidemiological Study (Beach Bum Survey)." *Environment international* 114: 326–33.
- Levy, Stuart B, and Bonnie Marshall. 2004. "Antibacterial Resistance Worldwide: Causes, Challenges and Responses." *Nature medicine* 10(12): S122–29.

- Li, Bing *et al.* 2015. "Metagenomic and Network Analysis Reveal Wide Distribution and Co-Occurrence of Environmental Antibiotic Resistance Genes." *The ISME journal* 9(11): 2490–2502.
- Li, Li-Guan, Yu Xia, and Tong Zhang. 2017. "Co-Occurrence of Antibiotic and Metal Resistance Genes Revealed in Complete Genome Collection." *The ISME journal* 11(3): 651–62.
- Liang, Jinsong *et al.* 2020. "Identification and Quantification of Bacterial Genomes Carrying Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factor Genes for Aquatic Microbiological Risk Assessment." *Water Research* 168: 115160.
- Liebert, Cynthia A, Ruth M Hall, and Anne O Summers. 1999. "Transposon Tn 21, Flagship of the Floating Genome." *Microbiology and molecular biology reviews* 63(3): 507–22.
- Lima-Mendez, Gipsi *et al.* 2020. "Toxin-Antitoxin Gene Pairs Found in Tn3 Family Transposons Appear to Be an Integral Part of the Transposition Module." *Mbio* 11(2).
- Lima, Lidia Moreira, Bianca Nascimento Monteiro da Silva, Gisele Barbosa, and Eliezer J Barreiro. 2020. "β-Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective." *European Journal of Medicinal Chemistry*: 112829.
- Lin, Wenfang, Menglu Zhang, Shenghua Zhang, and Xin Yu. 2016. "Can Chlorination Co-Select Antibiotic-Resistance Genes?" *Chemosphere* 156: 412–19.
- Liu, Lemian *et al.* 2018. "Large-Scale Biogeographical Patterns of Bacterial Antibiotic Resistome in the Waterbodies of China." *Environment international* 117: 292–99.
- Liu, Xiaohui, Xiaochun Guo, *et al.* 2019. "A Review on Removing Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes from Wastewater by Constructed Wetlands: Performance and Microbial Response." *Environmental Pollution* 254: 112996.
- Liu, Xiaohui, Guodong Zhang, *et al.* 2019. "Occurrence and Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Typical Urban Water of Beijing, China." *Environmental pollution* 246: 163–73.
- Liu, Xuan, Peng Xiao, *et al.* 2019. "The Impacts of Different High-Throughput Profiling Approaches on the Understanding of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in a Freshwater Reservoir." *Science of The Total Environment* 693: 133585.
- Liu, Yi-Yun *et al.* 2016. "Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study." *The Lancet infectious diseases* 16(2): 161–68.
- Liu, Zongbao, Uli Klümper, *et al.* 2019. "Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses Reveal Activity and Hosts of Antibiotic Resistance Genes in Activated Sludge." *Environment international* 129: 208–20.
- Loog, Liisa, and Greger Larson. 2019. "Ancient DNA." *Archaeological Science: An Introduction*: 13.
- Loot, Céline *et al.* 2017. "Differences in Integron Cassette Excision Dynamics Shape a Trade-

- off between Evolvability and Genetic Capacitance." *MBio* 8(2): e02296-16.
- Lopatkin, Allison J *et al.* 2016. "Antibiotics as a Selective Driver for Conjugation Dynamics." *Nature microbiology* 1(6): 1–8.
- Lopatkin, Allison J, and James J Collins. 2020. "Predictive Biology: Modelling, Understanding and Harnessing Microbial Complexity." *Nature Reviews Microbiology* 18(9): 507–20.
- Lorenzo, Proia *et al.* 2018. "Antibiotic Resistance in Urban and Hospital Wastewaters and Their Impact on a Receiving Freshwater Ecosystem." *Chemosphere* 206: 70–82.
- Lu, Ji *et al.* 2020. "Both Silver Ions and Silver Nanoparticles Facilitate the Horizontal Transfer of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Genes." *Water Research* 169: 115229.
- Lucius, Nick *et al.* 2019. "Predicting E. Coli Concentrations Using Limited QPCR Deployments at Chicago Beaches." *Water research X* 2: 100016.
- Lundborg, Cecilia Stålsby, and Ashok J Tamhankar. 2017. "Antibiotic Residues in the Environment of South East Asia." *Bmj* 358: j2440.
- Luprano, Maria Laura *et al.* 2016. "Antibiotic Resistance Genes Fate and Removal by a Technological Treatment Solution for Water Reuse in Agriculture." *Science of the Total Environment* 571: 809–18.
- Lye, Ying Ling *et al.* 2019. "Anthropogenic Impacts on Sulfonamide Residues and Sulfonamide Resistant Bacteria and Genes in Larut and Sangga Besar River, Perak." *Science of the Total Environment* 688: 1335–47.
- Ma, Ling, Leung Kris Siu, and Po-Liang Lu. 2011. "Effect of Spacer Sequences between BlaCTX-M and ISEcp1 on BlaCTX-M Expression." *Journal of medical microbiology* 60(12): 1787–92.
- Ma, Liping, An-Dong Li, Xiao-Le Yin, and Tong Zhang. 2017. "The Prevalence of Integrons as the Carrier of Antibiotic Resistance Genes in Natural and Man-Made Environments." *Environmental science & technology* 51(10): 5721–28.
- MacFadden, Derek R *et al.* 2018. "Antibiotic Resistance Increases with Local Temperature." *Nature Climate Change* 8(6): 510–14.
- MacNair, Craig R *et al.* 2018. "Overcoming Mcr-1 Mediated Colistin Resistance with Colistin in Combination with Other Antibiotics." *Nature communications* 9(1): 1–8.
- Maher Salman, Motasem Abukhalaf, Alberto Del Lungo. 2016. "Assessment of Treated Wastewater for Agriculture in Lebanon." *FAO*.
- Makowska, Nicoletta, Ryszard Koczura, and Joanna Mokracka. 2016. "Class 1 Integrase, Sulfonamide and Tetracycline Resistance Genes in Wastewater Treatment Plant and Surface Water." *Chemosphere* 144: 1665–73.
- Manaia, Célia M. 2017. "Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk." *Trends in microbiology* 25(3): 173–81.

- Manaia, Célia M *et al.* 2018. "Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants: Tackling the Black Box." *Environment international* 115: 312–24.
- Mao, Yixin *et al.* 2019. "Comparison of Culturable Antibiotic-Resistant Bacteria in Polluted and Non-Polluted Air in Beijing, China." *Environment international* 131: 104936.
- Marano, Roberto B M, Avihai Zolti, Edouard Jurkevitch, and Eddie Cytryn. 2019. "Antibiotic Resistance and Class 1 Integron Gene Dynamics along Effluent, Reclaimed Wastewater Irrigated Soil, Crop Continua: Elucidating Potential Risks and Ecological Constraints." *Water research* 164: 114906.
- Marathe, Nachiket P *et al.* 2017. "Untreated Urban Waste Contaminates Indian River Sediments with Resistance Genes to Last Resort Antibiotics." *Water research* 124: 388–97.
- Márquez, Carolina *et al.* 2008. "Recovery of a Functional Class 2 Integron from an Escherichia Coli Strain Mediating a Urinary Tract Infection." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(11): 4153–54.
- Martínez-Martínez, Luis, Alvaro Pascual, and George A Jacoby. 1998. "Quinolone Resistance from a Transferable Plasmid." *The Lancet* 351(9105): 797–99.
- Martínez, José L, Teresa M Coque, and Fernando Baquero. 2015. "What Is a Resistance Gene? Ranking Risk in Resistomes." *Nature Reviews Microbiology* 13(2): 116–23.
- Matamoros, Víctor *et al.* 2012. "Musk Fragrances, DEHP and Heavy Metals in a 20 Years Old Sludge Treatment Reed Bed System." *Water research* 46(12): 3889–96.
- Mayers, Douglas L *et al.* 2017. *2 Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects*. Springer.
- McCombie, W Richard, John D McPherson, and Elaine R Mardis. 2019. "Next-Generation Sequencing Technologies." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9(11): a036798.
- McLaren, Michael R, Amy D Willis, and Benjamin J Callahan. 2019. "Consistent and Correctable Bias in Metagenomic Sequencing Experiments." *Elife* 8.
- McMillan, Elizabeth A *et al.* 2019. "Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in Salmonella Enterica Associated with United States Food Animals." *Frontiers in microbiology* 10: 832.
- Merhabi, Fatme *et al.* 2021. "Occurrence, Distribution, and Ecological Risk Assessment of Emerging and Legacy Contaminants in the Kadicha River in Lebanon."
- Miguel, Ana B Rios, Mike S M Jetten, and Cornelia U Welte. 2020. "The Role of Mobile Genetic Elements in Organic Micropollutant Degradation during Biological Wastewater Treatment." *Water Research X*: 100065.
- Milaković, Milena *et al.* 2019. "Pollution from Azithromycin-Manufacturing Promotes Macrolide-Resistance Gene Propagation and Induces Spatial and Seasonal Bacterial Community Shifts in Receiving River Sediments." *Environment international* 123: 501–11.

- Mills, Molly C, and Jiyoung Lee. 2019. "The Threat of Carbapenem-Resistant Bacteria in the Environment: Evidence of Widespread Contamination of Reservoirs at a Global Scale." *Environmental Pollution*: 113143.
- Minakhina, S *et al.* 1999. "Tn5053 Family Transposons Are Res Site Hunters Sensing Plasmidal Res Sites Occupied by Cognate Resolvases." *Molecular microbiology* 33(5): 1059–68.
- Mokh, Samia *et al.* 2017. "Innovative SPE-LC-MS/MS Technique for the Assessment of 63 Pharmaceuticals and the Detection of Antibiotic-Resistant-Bacteria: A Case Study Natural Water Sources in Lebanon." *Science of the Total Environment* 609: 830–41.
- mondiale de la Santé, Organisation. 2017. "L'OMS Publie Une Liste de Bactéries Contre Lesquelles Il Est Urgent d'avoir de Nouveaux Antibiotiques." *communiqué*, févr.
- Montiel-Riquelme, Francisco *et al.* 2020. "Clinical Relevance of Antibiotic Susceptibility Profiles for Screening Gram-Negative Microorganisms Resistant to Beta-Lactam Antibiotics." *Microorganisms* 8(10): 1555.
- Moore, Catrin E. 2019. "Changes in Antibiotic Resistance in Animals." *Science* 365(6459): 1251–52.
- Mortimer, Monika, Alyssa Winchell, and Patricia A Holden. 2020. "Evaluation of Frameworks Proposed as Protective of Antimicrobial Resistance Propagation in the Environment." *Environment International* 144: 106053.
- Mughini-Gras, Lapo *et al.* 2019. "Attributable Sources of Community-Acquired Carriage of Escherichia Coli Containing  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistance Genes: A Population-Based Modelling Study." *The Lancet Planetary Health* 3(8): e357–69.
- de Muinck, Eric J *et al.* 2017. "A Novel Ultra High-Throughput 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing Library Preparation Method for the Illumina HiSeq Platform." *Microbiome* 5(1): 68.
- Naas, Thierry *et al.* 2008. "Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -Lactamase Bla KPC Gene." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(4): 1257–63.
- Nagata, Yuji, Hiromi Kato, Yoshiyuki Ohtsubo, and Masataka Tsuda. 2019. "Mobile Genetic Elements Involved in the Evolution of Bacteria That Degrade Recalcitrant Xenobiotic Compounds." In *DNA Traffic in the Environment*, Springer, 215–44.
- Nagshetty, Kavita *et al.* 2021. "An Overview of Extended Spectrum Beta Lactamases and Metallo Beta Lactamases." *Advances in Microbiology* 11(01): 37.
- Ng, Charmaine *et al.* 2017. "Characterization of Metagenomes in Urban Aquatic Compartments Reveals High Prevalence of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Wastewaters." *Frontiers in microbiology* 8: 2200.
- Nicoletti, Adriana Giannini *et al.* 2015. "Characterization of BKC-1 Class A Carbapenemase from Klebsiella Pneumoniae Clinical Isolates in Brazil." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59(9): 5159–64.

- Nicoletti, Adriana Giannini *et al.* 2016. "Reply to 'Mobilization of BlaBKC-1 by ISKpn23?'" *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60(8): 5105.
- Nies, B A, J F Meyer, and B Wiedemann. 1985. "Tn2440, a Composite Tetracycline Resistance Transposon with Direct Repeated Copies of IS160 at Its Flanks." *Microbiology* 131(9): 2443–47.
- Niestępski, Sebastian *et al.* 2019. "The Emergence of Antimicrobial Resistance in Environmental Strains of the Bacteroides Fragilis Group." *Environment international* 124: 408–19.
- Nijsingh, Niels, Christian Munthe, and D G Joakim Larsson. 2019. "Managing Pollution from Antibiotics Manufacturing: Charting Actors, Incentives and Disincentives." *Environmental Health* 18(1): 95.
- O'Flaherty, Eithne, and Enda Cummins. 2017. "Antibiotic Resistance in Surface Water Ecosystems: Presence in the Aquatic Environment, Prevention Strategies, and Risk Assessment." *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 23(2): 299–322.
- Oberlé, Kenny *et al.* 2012. "Evidence for a Complex Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant Escherichia Coli: From Medical Center Patients to a Receiving Environment." *Environmental science & technology* 46(3): 1859–68.
- Oliveira, Micaela, Mónica Nunes, Maria Teresa Barreto Crespo, and Ana Filipa Silva. 2020. "The Environmental Contribution to the Dissemination of Carbapenem and (Fluoro) Quinolone Resistance Genes by Discharged and Reused Wastewater Effluents: The Role of Cellular and Extracellular DNA." *Water Research* 182: 116011.
- Oravcova, Veronika *et al.* 2017. "Vancomycin-Resistant Enterococci with VanA Gene in Treated Municipal Wastewater and Their Association with Human Hospital Strains." *Science of the Total Environment* 609: 633–43.
- Organization, World Health. 2018. *Antimicrobial Resistance and Primary Health Care: Brief*. World Health Organization.
- Osman, Marwan *et al.* 2019. "Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Lebanese Extra-Hospital Settings: An Overview." *Journal of global antimicrobial resistance* 17: 123–29.
- Östman, Marcus *et al.* 2017. "Screening of Biocides, Metals and Antibiotics in Swedish Sewage Sludge and Wastewater." *Water research* 115: 318–28.
- Paiva, José-Artur, and Philippe Eggimann. 2017. "Treatment of Severe MRSA Infections: Current Practice and Further Development."
- Pal, Chandan *et al.* 2017. "Metal Resistance and Its Association with Antibiotic Resistance." In *Advances in Microbial Physiology*, Elsevier, 261–313.
- Pal, Chandan, Johan Bengtsson-Palme, Erik Kristiansson, and D G Joakim Larsson. 2016. "The Structure and Diversity of Human, Animal and Environmental Resistomes." *Microbiome* 4(1): 54.



- Pallares-Vega, Rebeca *et al.* 2019. "Determinants of Presence and Removal of Antibiotic Resistance Genes during WWTP Treatment: A Cross-Sectional Study." *Water research* 161: 319–28.
- Pan, Min, and L M Chu. 2018. "Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Soils from Wastewater Irrigation Areas in the Pearl River Delta Region, Southern China." *Science of the total environment* 624: 145–52.
- Pärnänen, Katariina M M *et al.* 2019. "Antibiotic Resistance in European Wastewater Treatment Plants Mirrors the Pattern of Clinical Antibiotic Resistance Prevalence." *Science advances* 5(3): eaau9124.
- Partridge, Sally R, Stephen M Kwong, Neville Firth, and Slade O Jensen. 2018. "Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance." *Clinical microbiology reviews* 31(4): e00088-17.
- Partridge, Sally R, Guy Tsafnat, Enrico Coiera, and Jonathan R Iredell. 2009. "Gene Cassettes and Cassette Arrays in Mobile Resistance Integrons." *FEMS microbiology reviews* 33(4): 757–84.
- Pawlowski, Andrew C *et al.* 2016. "A Diverse Intrinsic Antibiotic Resistome from a Cave Bacterium." *Nature communications* 7: 13803.
- Pazda, Magdalena, Jolanta Kumirska, Piotr Stepnowski, and Ewa Mulkiewicz. 2019. "Antibiotic Resistance Genes Identified in Wastewater Treatment Plant Systems—A Review." *Science of The Total Environment* 697: 134023.
- Pehrsson, Erica C. *et al.* 2016. "Interconnected Microbiomes and Resistomes in Low-Income Human Habitats." *Nature* 533: 212–16.
- Pei, Mengke *et al.* 2019. "State of the Art of Tertiary Treatment Technologies for Controlling Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants." *Environment international* 131: 105026.
- Peng, Feng *et al.* 2019. "An Extensively Shared Antibiotic Resistome among Four Seasons Suggests Management Prioritization in a Subtropical Riverine Ecosystem." *Science of the total environment* 673: 533–40.
- Pereda, Olatz *et al.* 2020. "Combined Effects of Urban Pollution and Hydrological Stress on Ecosystem Functions of Mediterranean Streams." *Science of The Total Environment* 753: 141971.
- Perry, Julie Ann, Erin Louise Westman, and Gerard D Wright. 2014. "The Antibiotic Resistome: What's New?" *Current opinion in microbiology* 21: 45–50.
- Perry, Julie, Nicholas Waglechner, and Gerard Wright. 2016. "The Prehistory of Antibiotic Resistance." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6(6): a025197.
- Philippon, Alain, Guillaume Arlet, and George A Jacoby. 2002. "Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(1): 1–11.
- Poirel, Laurent, Nicolas Kieffer, and Patrice Nordmann. 2017. "In Vitro Study of ISAp11-

- Mediated Mobilization of the Colistin Resistance Gene *Mcr-1*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61(7): e00127-17.
- Poirel, Laurent, Marie-Frédérique Lartigue, Jean-Winoc Decousser, and Patrice Nordmann. 2005. "IS Ecp1B-Mediated Transposition of *Bla* CTX-M in *Escherichia Coli*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(1): 447–50.
- Pomba, Constança *et al.* 2017. "Public Health Risk of Antimicrobial Resistance Transfer from Companion Animals." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(4): 957–68.
- Post, Virginia, Peter A White, and Ruth M Hall. 2010. "Evolution of *AbaR*-Type Genomic Resistance Islands in Multiply Antibiotic-Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(6): 1162–70.
- Proia, Lorenzo *et al.* 2018. "Antibiotic Resistance along an Urban River Impacted by Treated Wastewaters." *Science of the total environment* 628: 453–66.
- Puja, Hélène *et al.* 2020. "The Efflux Pump *MexXY/OprM* Contributes to the Tolerance and Acquired Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* to Colistin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Van Puyvelde, Sandra, Stijn Deborggraeve, and Jan Jacobs. 2018. "Why the Antibiotic Resistance Crisis Requires a One Health Approach." *The Lancet Infectious Diseases* 18(2): 132–34.
- Quince, Christopher *et al.* 2017. "Shotgun Metagenomics, from Sampling to Analysis." *Nature biotechnology* 35(9): 833.
- Rådström, P *et al.* 1994. "Transposon Tn5090 of Plasmid R751, Which Carries an Integron, Is Related to Tn7, Mu, and the Retroelements." *Journal of Bacteriology* 176(11): 3257–68.
- Rahman, Supathep Tansirichaiya Ajijur, and Adam P Roberts. 2019. "The Transposon Registry." *Mobile DNA* 10.
- Ramessar, Kerisha, and Ademola O Olaniran. 2019. "Antibiogram and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Recovered from Treated Wastewater Effluent and Receiving Surface Water in Durban, South Africa." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(9): 1–11.
- Ramírez, María Soledad, Silvia Piñeiro, and Daniela Centrón. 2010. "Novel Insights about Class 2 Integrons from Experimental and Genomic Epidemiology." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(2): 699–706.
- Ramsay, Joshua P, and Neville Firth. 2017. "Diverse Mobilization Strategies Facilitate Transfer of Non-Conjugative Mobile Genetic Elements." *Current opinion in microbiology* 38: 1–9.
- Razavi, Mohammad *et al.* 2017. "Discovery of the Fourth Mobile Sulfonamide Resistance Gene." *Microbiome* 5(1): 1–12.
- Reddy, Bhaskar, and Suresh Kumar Dubey. 2019. "River Ganges Water as Reservoir of Microbes with Antibiotic and Metal Ion Resistance Genes: High Throughput

- Metagenomic Approach." *Environmental Pollution* 246: 443–51.
- Rice, Louis B. 2008. "Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE."
- Rice, Louis B, and Lenore L Carias. 1998. "Transfer of Tn 5385, a Composite, Multiresistance Chromosomal Element from *Enterococcus Faecalis*." *Journal of bacteriology* 180(3): 714–21.
- Rieke, Elizabeth Luby, Thomas B Moorman, Elizabeth L Douglass, and Michelle L Soupir. 2018. "Seasonal Variation of Macrolide Resistance Gene Abundances in the South Fork Iowa River Watershed." *Science of The Total Environment* 610: 1173–79.
- Roberts, Marilyn C. 2018. "Antibiotics and Resistance in the Environment." In *Antimicrobial Resistance in the 21st Century*, Springer, 383–407.
- Rouch, Duncan A *et al.* 2011. "Microbial Safety of Air-Dried and Rewetted Biosolids." *Journal of water and health* 9(2): 403–14.
- Rouch, Duncan A, and Ronald A Skurray. 1989. "IS257 from *Staphylococcus Aureus*: Member of an Insertion Sequence Superfamily Prevalent among Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria." *Gene* 76(2): 195–205.
- Rowe, Will P M *et al.* 2017. "Overexpression of Antibiotic Resistance Genes in Hospital Effluents over Time." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(6): 1617–23.
- Rowland, S-J, and K G H Dyke. 1990. "Tn552, a Novel Transposable Element from *Staphylococcus Aureus*." *Molecular microbiology* 4(6): 961–75.
- Roy, Paul H, and Sally R Partridge. 2017. "Genetic Resistance Mechanisms of Transfer of Drug 5." *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*, | 1: 61.
- Rozwandowicz, M *et al.* 2018. "Plasmids Carrying Antimicrobial Resistance Genes in Enterobacteriaceae." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(5): 1121–37.
- Said, Leila Ben *et al.* 2016. "Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-and PAMP C Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae of Water Samples in Tunisia." *Science of The Total Environment* 550: 1103–9.
- San Millan, Alvaro *et al.* 2016. "Multicopy Plasmids Potentiate the Evolution of Antibiotic Resistance in Bacteria." *Nature ecology & evolution* 1(1): 1–8.
- San Millan, Alvaro *et al.* 2018. "Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context." *Trends in microbiology* 26(12): 978–85.
- Sarno, Renee *et al.* 2002. "Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella Pneumoniae* Multiresistance Plasmid PJHCMW1." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(11): 3422–27.
- Savin, Mykhailo *et al.* 2020. "Antibiotic-Resistant Bacteria and Antimicrobial Residues in Wastewater and Process Water from German Pig Slaughterhouses and Their Receiving Municipal Wastewater Treatment Plants." *Science of The Total Environment*: 138788.

- Schindler, Bryan D, and Glenn W Kaatz. 2016. "Multidrug Efflux Pumps of Gram-Positive Bacteria." *Drug Resistance Updates* 27: 1–13.
- Schwarz, Stefan *et al.* 2016. "Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6(11): a027037.
- Sciencedirect. 2021. "Tetracycline." <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/tetracycline> . Web. 19 Feb. 2022
- Shaban, Amin. 2020. "Water Resources of Lebanon." Springer Science Publisher. 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-48717-1>.
- Shaban, Amin, and Mouin Hamzé. 2017. *Shared Water Resources of Lebanon*. Nova Science Publisher's, Incorporated.
- Shendure, Jay *et al.* 2017. "DNA Sequencing at 40: Past, Present and Future." *Nature* 550(7676): 345–53.
- Sib, Esther *et al.* 2020. "Bacteria Isolated from Hospital, Municipal and Slaughterhouse Wastewaters Show Characteristic, Different Resistance Profiles." *Science of The Total Environment* 746: 140894.
- Sidaoui, Fatima. 2017. "The Political Ecology of Water Justice: A Case Study of Tripoli, Lebanon."
- Sidhu, J P S *et al.* 2018. "Comparative Enteric Viruses and Coliphage Removal during Wastewater Treatment Processes in a Sub-Tropical Environment." *Science of the Total Environment* 616: 669–77.
- Siguier, Patricia, Edith Gourbeyre, and Michael Chandler. 2017. "Known Knowns, Known Unknowns and Unknown Unknowns in Prokaryotic Transposition." *Current opinion in microbiology* 38: 171–80.
- Silva, Vanessa *et al.* 2020. "Diversity and Genetic Lineages of Environmental Staphylococci: A Surface Water Overview." *FEMS Microbiology Ecology* 96(12): fiae191.
- Šimatović, Ana, and Nikolina Udiković-Kolić. 2019. "Antibiotic Resistance in Pharmaceutical Industry Effluents and Effluent-Impacted Environments." In *Antibiotic Resistance in the Environment*, Springer, 101–22.
- Singh, Rachna *et al.* 2019. "Antibiotic Resistance in Major Rivers in the World: A Systematic Review on Occurrence, Emergence, and Management Strategies." *Journal of Cleaner Production*.
- Singh, Sheo B, Katherine Young, and Lynn L Silver. 2017. "What Is an 'Ideal' Antibiotic? Discovery Challenges and Path Forward." *Biochemical pharmacology* 133: 63–73.
- Snesrud, Erik *et al.* 2016. "A Model for Transposition of the Colistin Resistance Gene Mcr-1 by IS Apl1." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60(11): 6973–76.
- Snesrud, Erik, Patrick McGann, and Michael Chandler. 2018. "The Birth and Demise of the

- ISAp1-Mcr-1-ISAp1 Composite Transposon: The Vehicle for Transferable Colistin Resistance." *MBio* 9(1): e02381-17.
- Spencer, Sarah J *et al.* 2016. "Massively Parallel Sequencing of Single Cells by EpicPCR Links Functional Genes with Phylogenetic Markers." *The ISME journal* 10(2): 427–36.
- Ssemadaali, Marvin A *et al.* 2016. "Identification of Heterologous Torque Teno Viruses in Humans and Swine." *Scientific reports* 6: 26655.
- Stachler, Elyse *et al.* 2017. "Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement." *Environmental science & technology* 51(16): 9146–54.
- Stachler, Elyse *et al.* 2018. "Correlation of CrAssphage QPCR Markers with Culturable and Molecular Indicators of Human Fecal Pollution in an Impacted Urban Watershed." *Environmental science & technology* 52(13): 7505–12.
- Stalder, Thibault *et al.* 2014. "Quantitative and Qualitative Impact of Hospital Effluent on Dissemination of the Integron Pool." *The ISME journal* 8(4): 768.
- Stalder, Thibault *et al.* 2019. "Linking the Resistome and Plasmidome to the Microbiome." *The ISME journal* 13(10): 2437–46.
- Stevenson, Cagla *et al.* 2017. "Gene Mobility Promotes the Spread of Resistance in Bacterial Populations." *The ISME journal* 11(8): 1930–32.
- Stoesser, Nicole *et al.* 2016. "Colistin Resistance Gene Mcr-1 and PHNSHP45 Plasmid in Human Isolates of Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae." *The Lancet infectious diseases* 16(3): 285–86.
- Stokes, H W t, and Ruth M Hall. 1989. "A Novel Family of Potentially Mobile DNA Elements Encoding Site-specific Gene-integration Functions: Integrons." *Molecular microbiology* 3(12): 1669–83.
- Suhartono, Suhartono, Mary Savin, and Edward E Gbur. 2016. "Genetic Redundancy and Persistence of Plasmid-Mediated Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistant Effluent and Stream Water Escherichia Coli." *Water research* 103: 197–204.
- Sun, Lingyan *et al.* 2017. "Identification of Novel Conjugative Plasmids with Multiple Copies of FosB That Confer High-Level Fosfomycin Resistance to Vancomycin-Resistant Enterococci." *Frontiers in microbiology* 8: 1541.
- Surette, Matthew D, and Gerard D Wright. 2017. "Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome." *Annual review of microbiology* 71: 309–29.
- Tan, Lu *et al.* 2018. "Arctic Antibiotic Resistance Gene Contamination, a Result of Anthropogenic Activities and Natural Origin." *Science of the Total Environment* 621: 1176–84.
- Tchuinte, Pierrette Landrie Simo *et al.* 2016. "Characterisation of Class 3 Integrons with Oxacillinase Gene Cassettes in Hospital Sewage and Sludge Samples from France and Luxembourg." *International journal of antimicrobial agents* 48(4): 431–34.

- Teixeira, Pedro *et al.* 2020. "Occurrence of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in a Portuguese River: BlaNDM, BlaKPC and BlaGES among the Detected Genes." *Environmental Pollution* 260: 113913.
- Terveer, Elisabeth M *et al.* 2017. "Prevalence of Colistin Resistance Gene (Mcr-1) Containing Enterobacteriaceae in Feces of Patients Attending a Tertiary Care Hospital and Detection of a Mcr-1 Containing, Colistin Susceptible E. Coli." *PLoS One* 12(6): e0178598.
- Thapaliya, Dipendra *et al.* 2017. "Prevalence and Characterization of Staphylococcus Aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus on Public Recreational Beaches in Northeast Ohio." *GeoHealth* 1(10): 320–32.
- Thomson, Kenneth S. 2010. "Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues." *Journal of clinical microbiology* 48(4): 1019–25.
- Thornton, Christopher N, Windy D Tanner, James A VanDerslice, and William J Brazelton. 2020. "Localized Effect of Treated Wastewater Effluent on the Resistome of an Urban Watershed." *GigaScience* 9(11): giaa125.
- Tiedje, James M *et al.* 2019. "Antibiotic Resistance Genes in the Human-Impacted Environment: A One Health Perspective." *Pedosphere* 29(3): 273–82.
- Toleman, Mark A, Peter M Bennett, and Timothy R Walsh. 2006. "Common Regions Eg Orf 513 and Antibiotic Resistance: IS 91-like Elements Evolving Complex Class 1 Integrons." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(1): 1–6.
- Tooke, Catherine L *et al.* 2019. " $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century." *Journal of molecular biology* 431(18): 3472–3500.
- Touron, Aurélie *et al.* 2007. "Assessment of Faecal Contamination and the Relationship between Pathogens and Faecal Bacterial Indicators in an Estuarine Environment (Seine, France)." *Marine pollution bulletin* 54(9): 1441–50.
- Trieu-Cuot, Patrick, and Patrice Courvalin. 1984. "Nucleotide Sequence of the Transposable Element IS15." *Gene* 30(1–3): 113–20.
- Tsai, Hsin-Chi *et al.* 2020. "Multidrug-Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Isolated from a Subtropical River Contaminated by Nearby Livestock Industries." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 200: 110724.
- Uhrbrand, Katrine *et al.* 2017. "Assessment of Airborne Bacteria and Noroviruses in Air Emission from a New Highly-Advanced Hospital Wastewater Treatment Plant." *Water research* 112: 110–19.
- Um, Maryse Michèle *et al.* 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 research* 88: 30–38.
- Vandecraen, Joachim, Michael Chandler, Abram Aertsen, and Rob Van Houdt. 2017. "The Impact of Insertion Sequences on Bacterial Genome Plasticity and Adaptability." *Critical*

*reviews in microbiology* 43(6): 709–30.

- Vaz-Moreira, Ivone, Catarina Ferreira, Olga C Nunes, and Célia M Manaia. 2019. “Sources of Antibiotic Resistance: Zoonotic, Human, Environment.” *Antibiotic Drug Resistance*: 211–38.
- Vázquez-Laslop, Nora, and Alexander S Mankin. 2018. “How Macrolide Antibiotics Work.” *Trends in biochemical sciences* 43(9): 668–84.
- Vikesland, Peter *et al.* 2019. “Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World.” *Accounts of chemical research* 52(4): 916–24.
- Vilacoba, Elisabet *et al.* 2013. “Emergence and Spread of Plasmid-Borne Tet (B):: IS CR2 in Minocycline-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57(1): 651–54.
- Voigt, A M *et al.* 2020. “Association between Antibiotic Residues, Antibiotic Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes in Anthropogenic Wastewater—An Evaluation of Clinical Influences.” *Chemosphere* 241: 125032.
- Waglechner, Nicholas, Elizabeth J Culp, and Gerard D Wright. 2021. “Ancient Antibiotics, Ancient Resistance.” *EcoSal Plus* 9(2): eESP-0027.
- Walker, David I *et al.* 2017. “A Highly Specific *Escherichia Coli* QPCR and Its Comparison with Existing Methods for Environmental Waters.” *Water research* 126: 101–10.
- Walsh, Timothy R. 2018. “A One-Health Approach to Antimicrobial Resistance.” *Nature microbiology* 3(8): 854–55.
- Wang, Jinhua *et al.* 2020. “Antibiotic Resistance in Agricultural Soils: Source, Fate, Mechanism and Attenuation Strategy.” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*: 1–43.
- Wang, Minghua *et al.* 2009. “New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, QnrC, Found in a Clinical Isolate of *Proteus Mirabilis*.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53(5): 1892–97.
- Wang, Shanshan *et al.* 2020. “Selectively Enrichment of Antibiotics and ARGs by Microplastics in River, Estuary and Marine Waters.” *Science of The Total Environment* 708: 134594.
- Weigel, Linda M *et al.* 2003. “Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus Aureus*.” *Science* 302(5650): 1569–71.
- WHO, Global Tricycle Surveillance. 2021.
- Willyard, Cassandra. 2017. “The Drug-Resistant Bacteria That Pose the Greatest Health Threats.” *Nature News* 543(7643): 15.
- Wrighton, Christopher J, and Peter Strike. 1987. “A Pathway for the Evolution of the Plasmid NTP16 Involving the Novel Kanamycin Resistance Transposon Tn4352.” *Plasmid* 17(1): 37–45.

- Wu, Dai-Ling *et al.* 2020. "Contamination Profile of Antibiotic Resistance Genes in Ground Water in Comparison with Surface Water." *Science of The Total Environment* 715: 136975.
- Wu, Dong *et al.* 2019. "Urban and Agriculturally Influenced Water Contribute Differently to the Spread of Antibiotic Resistance Genes in a Mega-City River Network." *Water research* 158: 11–21.
- Wu, Ligui *et al.* 2020. "New Parameters for the Quantitative Assessment of the Proliferation of Antibiotic Resistance Genes Dynamic in the Environment and Its Application: A Case of Sulfonamides and Sulfonamide Resistance Genes." *Science of The Total Environment* 726: 138516.
- Wu, Yun *et al.* 2019. "In Silico Serotyping Based on Whole-Genome Sequencing Improves the Accuracy of Shigella Identification." *Applied and environmental microbiology* 85(7): e00165-19.
- Wu, Zhenyu *et al.* 2020. "Comparative Fate of CrAssphage with Culturable and Molecular Fecal Pollution Indicators during Activated Sludge Wastewater Treatment." *Environment International* 136: 105452.
- Wyres, Kelly L, and Kathryn E Holt. 2018. "Klebsiella Pneumoniae as a Key Trafficker of Drug Resistance Genes from Environmental to Clinically Important Bacteria." *Current opinion in microbiology* 45: 131–39.
- Xiang, Qian *et al.* 2018. "Spatial and Temporal Distribution of Antibiotic Resistomes in a Peri-Urban Area Is Associated Significantly with Anthropogenic Activities." *Environmental Pollution* 235: 525–33.
- Xie, Wan-Ying *et al.* 2018. "Long-Term Effects of Manure and Chemical Fertilizers on Soil Antibiotic Resistome." *Soil Biology and Biochemistry* 122: 111–19.
- Xu, Hai, Julian Davies, and Vivian Miao. 2007. "Molecular Characterization of Class 3 Integrons from Delftia Spp." *Journal of Bacteriology* 189(17): 6276–83.
- Xu, Like *et al.* 2016. "High-Throughput Profiling of Antibiotic Resistance Genes in Drinking Water Treatment Plants and Distribution Systems." *Environmental Pollution* 213: 119–26.
- Xu, Yan, Jian Xu, Daqing Mao, and Yi Luo. 2017. "Effect of the Selective Pressure of Sub-Lethal Level of Heavy Metals on the Fate and Distribution of ARGs in the Catchment Scale." *Environmental Pollution* 220: 900–908.
- Yan, Changchun *et al.* 2020. "Integrating High-Throughput Sequencing and Metagenome Analysis to Reveal the Characteristic and Resistance Mechanism of Microbial Community in Metal Contaminated Sediments." *Science of The Total Environment* 707: 136116.
- Yan, Lei *et al.* 2017. "Bacterial Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Aquatic Environments in China." *Scientific reports* 7(1): 1–12.



- Yang, Fengxia *et al.* 2016. "Propagation of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase Genes (Bla NDM-1) from a Wastewater Treatment Plant to Its Receiving River." *Environmental Science & Technology Letters* 3(4): 138–43.
- Yang, Yuyi *et al.* 2019. "Metagenomic Insights into the Abundance and Composition of Resistance Genes in Aquatic Environments: Influence of Stratification and Geography." *Environment international* 127: 371–80.
- Yang, Yuyi, Xinhua Cao, Hui Lin, and Jun Wang. 2016. "Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Sediment of Honghu Lake and East Dongting Lake, China." *Microbial ecology* 72(4): 791–801.
- Yassine, Haytham *et al.* 2015. "Experimental Evidence for IS 1294b-Mediated Transposition of the Bla CMY-2 Cephalosporinase Gene in Enterobacteriaceae." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(3): 697–700.
- Yi, Xinzhu *et al.* 2019. "Expression of Resistance Genes Instead of Gene Abundance Are Correlated with Trace Levels of Antibiotics in Urban Surface Waters." *Environmental Pollution* 250: 437–46.
- Yin, Xiaole *et al.* 2019. "Exploration of the Antibiotic Resistome in a Wastewater Treatment Plant by a Nine-Year Longitudinal Metagenomic Study." *Environment international* 133: 105270.
- Young, Suzanne, Jason R Rohr, and Valerie J Harwood. 2019. "Vancomycin Resistance Plasmids Affect Persistence of Enterococcus Faecium in Water." *Water research* 166: 115069.
- Yu, Zhuofeng *et al.* 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 research* 106: 583–92.
- Yuan, Yuan, Guolu Zheng, Mengshi Lin, and Azlin Mustapha. 2018. "Detection of Viable Escherichia Coli in Environmental Water Using Combined Propidium Monoazide Staining and Quantitative PCR." *Water research* 145: 398–407.
- Zainab, Syeda Maria, Muhammad Junaid, Nan Xu, and Riffat Naseem Malik. 2020. "Antibiotics and Antibiotic Resistant Genes (ARGs) in Groundwater: A Global Review on Dissemination, Sources, Interactions, Environmental and Human Health Risks." *Water Research*: 116455.
- Zarfel, Gernot *et al.* 2017. "Troubled Water under the Bridge: Screening of River Mur Water Reveals Dominance of CTX-M Harboring Escherichia Coli and for the First Time an Environmental VIM-1 Producer in Austria." *Science of the Total Environment* 593: 399–405.
- Zeng, Daina *et al.* 2016. "Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6(12): a026989.
- Zeng, Lu, Stephen M Pederson, R Daniel Kortschak, and David L Adelson. 2018. "Transposable Elements and Gene Expression during the Evolution of Amniotes."

*Mobile DNA* 9(1): 17.

- Zhang, Anyun *et al.* 2019. "β-Lactam Resistance Genes in Bacteriophage and Bacterial DNA from Wastewater, River Water, and Irrigation Water in Washington State." *Water research* 161: 335–40.
- Zhang, Biao *et al.* 2021. "Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Karst River and Its Ecological Risk." *Water Research* 203: 117507.
- Zhang, Guodong *et al.* 2020. "Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes and Their Correlations in Lower Yangtze River, China." *Environmental Pollution* 257: 113365.
- Zhang, L *et al.* 2019. "Novel Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes Associated with Sewage Sludge and Industrial Waste Streams Revealed by Functional Metagenomic Screening." *Environment international* 132: 105120.
- Zhang, Xiaomei, Michael Payne, and Ruiting Lan. 2019. "In Silico Identification of Serovar-Specific Genes for Salmonella Serotyping." *Frontiers in microbiology* 10: 835.
- Zhang, Yan *et al.* 2018. "Cell-Free DNA: A Neglected Source for Antibiotic Resistance Genes Spreading from WWTPs." *Environmental science & technology* 52(1): 248–57.
- Zhang, Yongpeng, Zhiguang Niu, Ying Zhang, and Kai Zhang. 2018. "Occurrence of Intracellular and Extracellular Antibiotic Resistance Genes in Coastal Areas of Bohai Bay (China) and the Factors Affecting Them." *Environmental Pollution* 236: 126–36.
- Zhang, Yu-Jing *et al.* 2019. "Salinity as a Predominant Factor Modulating the Distribution Patterns of Antibiotic Resistance Genes in Ocean and River Beach Soils." *Science of the total environment* 668: 193–203.
- Zhao, Yi *et al.* 2018. "AsChip: A High-Throughput QPCR Chip for Comprehensive Profiling of Genes Linked to Microbial Cycling of Arsenic." *Environmental science & technology* 53(2): 798–807.
- Zhao, Yi *et al.* 2019. "Evidence for Co-Selection of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Metal Polluted Urban Soils." *Science of The Total Environment* 656: 512–20.
- Zhao, Zelong *et al.* 2017. "Nutrients, Heavy Metals and Microbial Communities Co-Driven Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Adjacent Environment of Mariculture." *Environmental Pollution* 220: 909–18.
- Zheng, Ji *et al.* 2017. "High-Throughput Profiling and Analysis of Antibiotic Resistance Genes in East Tiaoxi River, China." *Environmental Pollution* 230: 648–54.
- Zheng, Ji *et al.* 2018. "High-Throughput Profiling of Seasonal Variations of Antibiotic Resistance Gene Transport in a Peri-Urban River." *Environment international* 114: 87–94.
- Zheng, Wanlin *et al.* 2020. "Clinical Class 1 Integron-Integrase Gene—A Promising Indicator to Monitor the Abundance and Elimination of Antibiotic Resistance Genes in an Urban

Wastewater Treatment Plant.” *Environment international* 135: 105372.

Zhou, Zhen-Chao *et al.* 2018. “Prevalence and Transmission of Antibiotic Resistance and Microbiota between Humans and Water Environments.” *Environment international* 121: 1155–61.

Zhu, Lin *et al.* 2019. “Comprehensive Understanding of the Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *Mcr-1* in Aquatic Environments.” *Environmental Science & Technology* 54(3): 1603–13.

Zhu, Yong-Guan *et al.* 2017. “Continental-Scale Pollution of Estuaries with Antibiotic Resistance Genes.” *Nature microbiology* 2(4): 16270.

Zhuang, Mei *et al.* 2021. “Distribution of Antibiotic Resistance Genes in the Environment.” *Environmental Pollution*: 117402.

## Résumé en français

Une approche combinée utilisant des techniques de culture et la qPCR à haut débit pour la détection des gènes de résistance aux agents antimicrobiens (GRAs) et des bactéries résistantes aux agents antimicrobiens (BRAs) a permis l'identification de zones sous forte pression anthropique dans les embouchures et le long des grands fleuves libanais en avril 2017 et janvier 2018. Des bactéries pathogènes Gram négatives multirésistantes (Enterobacterales et *Pseudomonas spp.*) et Gram positives pathogènes ont été isolées. Une forte abondance de certains GRAs (gènes de résistance aux tétracyclines et gènes de transposase) a été détectée dans les estuaires libanais. L'abondance relative des GRAs était plus élevée en hiver et dans les zones à fort impact anthropique en raison de la croissance démographique et de l'afflux de réfugiés. L'analyse du résistome des BRAs et de l'ADN total d'échantillons estuariens a révélé des niveaux critiques de contamination par des bactéries pathogènes et a fourni des informations importantes sur la dissémination des GRAs dans les zones sous forte pression anthropique.

## Résumé en anglais

A combined approach using culture techniques and high-throughput qPCR for the detection of antimicrobial resistance genes (GRAs) and antimicrobial resistant bacteria (BRAs) identified areas under high anthropogenic pressure in rivers' mouths and along the major Lebanese rivers in April 2017 and January 2018. Multidrug-resistant Gram-negative pathogenic bacteria (Enterobacterales and *Pseudomonas spp.*) and Gram-positive pathogenic bacteria were isolated. A high abundance of some GRAs (tetracycline resistance genes and transposase genes) has been detected in Lebanese estuaries. The relative abundance of GRAs was higher in winter and in areas under high anthropogenic pressure due to the population growth and the influx of refugees. ARBs' resistome and total DNA analysis of estuarine samples revealed critical levels of contamination with pathogenic bacteria and provided important information on the dissemination of GRAs in areas under high anthropogenic pressure.

**Mots clés :** BRAs - GRAs - indicateurs - Fleuves - embouchures - Liban - pression anthropique

# Article

## Resistome Diversity and Dissemination of WHO Priority Antibiotic Resistant Pathogens in Lebanese Estuaries

Wadad Hobeika <sup>1,2</sup>, Margaux Gaschet <sup>1</sup>, Marie-Cécile Ploy <sup>1</sup>, Elena Buelow <sup>3,\*</sup>, Dolla Karam Sarkis <sup>2,\*</sup> and Christophe Dagot <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092 Limoges, France; wchobeika@gmail.com (W.H.); margaux.gaschet@unilim.fr (M.G.); marie-cecile.ploy@unilim.fr (M.-C.P.)

<sup>2</sup> Microbiology Laboratory, School of Pharmacy, Saint-Joseph University, 17-5208 Beirut, Lebanon; [dolla.sarkis@usj.edu.lb](mailto:dolla.sarkis@usj.edu.lb) (D.S.)

<sup>3</sup> Université Grenoble Alpes, CNRS, TIMC-IMAG, 38000 Grenoble, France

\* Correspondence: [elena.buelow@gmail.com](mailto:elena.buelow@gmail.com) (E.B.); [christophe.dagot@unilim.fr](mailto:christophe.dagot@unilim.fr) (C.D.)

† These authors contributed equally to this work.

Citation: Hobeika, W.; Gaschet, M.; Ploy, M.-C.; Buelow, E.; Sarkis, D.K. Resistome Diversity and Dissemination of WHO Priority Antibiotic Resistant Pathogens in Lebanese Estuaries. *Antibiotics* 2022, 11, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>  
Academic Editor(s): Choon Kim and Jie Fu

Received: 15 December 2021

Accepted: 22 February 2022

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Anthropogenic pressure is known to be a key driver of antimicrobial resistance (AMR) dissemination in the environment. Especially in lower income countries, with poor infrastructure, the level of AMR dissemination is high. Therefore, we assessed the levels and diversity of antibiotic-resistant bacteria (ARBs) and antibiotic resistance genes (ARGs) in Lebanese rivers at estuaries' sites ( $n=72$ ) of the Mediterranean Sea in spring 2017 and winter 2018. Methods: A combined approach using culture techniques and high throughput qPCR were applied to identify ARBs and ARGs in rivers along the Lebanese coast. Results: Multidrug-resistant Gram-negative (Enterobacterales and *Pseudomonas* spp.) and Gram-positive bacterial pathogens were isolated. Levels of ARGs were highest in the winter campaign and areas with high anthropogenic activities and population growth with an influx of refugees. Conclusion: Qualitative analysis of ARBs and the analysis of the Lebanese estuaries' resistome revealed critical levels of contamination with pathogenic bacteria and provided significant information about the spread of ARGs in anthropogenically impacted estuaries.

**Keywords:** pathogens; resistome; estuaries; Lebanon

### 1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a One Health crisis aggravated by the lack of water and pollution management on a global scale [1,2]. Anthropogenic activities are demonstrated to be the key drivers of AMR dissemination in the environment [3–6], subsequently altering its ecosystems [7–9]. Through discharge of treated or untreated wastewater (WW) effluents into surface water, a high abundance of antibiotic resistance genes (ARGs), antibiotic-resistant bacteria (ARBs), and mobile genetic elements (MGEs) mixed with a cocktail of micropollutants and drug residues are continuously disseminated into the environment [10–13]. Additionally, agricultural practices such as soil fertilization with

manure and sludge, or irrigation with WW effluents, further expand the environmental background levels of pollutants associated with the dissemination of antimicrobial resistance [9,14]. In Lebanon, rules to control the overuse and misuse of antibiotics for treatment, growth promotion, and prophylaxis in agriculture and animal husbandry are not strictly implemented [15,16], which would likely contribute to increasing AMR in the Lebanese and connected environments [17,18].

The surveillance of AMR in the environment is often assessed through ARG quantification [19,20]. High abundances of ARGs were found to be associated with fecal contamination [21–23].

Estuaries are transitional zones between rivers and sea bodies [24,25], exhibiting properties of marine and freshwater and underlining continental–oceanic interactions [26]. Estuaries are also considered as ecosystems that are broadly anthropized [24,27]. Contaminants can reside for prolonged periods in estuarine ecosystems due to the tidal streams [28,29]. The levels of ARB and ARGs and their spatial–temporal dissemination in Lebanese estuaries remains understudied [26]. The Mediterranean coastline is densely populated with a large anthropic footprint, i.e., intensive fishing, shipping, recreational, and industrial activities [30]. Our study aimed to assess the level of AMR dissemination in the Mediterranean Sea through the Lebanese estuaries. The objectives of this study were to monitor in the Lebanese river estuaries, the dissemination of i) ARBs, notably extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing-Enterobacterales (ESBL-E), multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and ii) the resistome through the detection of ARGs and MGEs.

## 2. Results

### 2.1. Bacterial Culture

In total, we isolated 19 different bacterial species in different quantities in spring and winter from the estuarine water samples along the Lebanon coastline (see the Materials and Methods section) (Table 1). From 1 mL of the water samples cultivated on selective media, we obtained 50 and 10,064 CFUs (colony forming units) resistant Enterobacterales and 41 and 43 CFUs resistant *Pseudomonas* spp. in spring and winter, respectively. However, among the 10,064 CFUs in winter,  $10^4$  corresponded to the same bacterial species (*Hafnia alvei*) in the Beirut estuary. A more diverse panel of Enterobacterales species was isolated in spring. Enterobacterales and/or *Pseudomonas* spp. strains were isolated from all samples, except the Bared River. Moreover, Enterobacterales were not detected in the Kaleb River and *Pseudomonas* spp. were not found in the Zahnari river. MRSA isolates were detected only in spring.

**Table 1.** Gram-negative bacterial species and Gram-positive MRSA isolated in the rivers' estuaries.

River	Enterobacterales		<i>Pseudomonas spp.</i>		MRSA In spring (CFU/mL)
	Species in Spring (CFU/mL)	Species in Winter (CFU/mL)	Species in Spring (CFU/mL)	Species in Winter (CFU/mL)	
Janoubi		<i>Escherichia coli</i> (7)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10) <i>Pseudomonas putida</i> (10)  <i>Pseudomonas fluorescens</i> (5)	
Aarqa	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)  <i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)  <i>Hafnia alvei</i> (2)  <i>Serratia marcescens</i> (1) <i>Serratia liquefaciens</i> (2)  <i>Salmonella choleraesuis</i> (1)  <i>Providencia rettgeri</i> (1)  <i>Serratia rubidaea</i> (1)  <i>Klebsiella oxytoca</i> (1)  <i>Pantoea spp.</i> (16)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (50)	<i>Pseudomonas luteola</i> (14)  <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)  <i>Pseudomonas putida</i> (1)		(11)
Damour	<i>Escherichia coli</i> (2)		<i>Pseudomonas luteola</i> (1)		
Ostuene	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)  <i>Hafnia alvei</i> (2)		<i>Pseudomonas luteola</i> (7) <i>Pseudomonas putida</i> (1)		(1)
Zahrani	<i>Serratia liquefaciens</i> (3)				
Kaleb			<i>Pseudomonas luteola</i> (2)		

			<i>Pseudomonas horizihabitans</i> (1)	
Bared			<i>Pseudomonas putida</i> (3)	
			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1)	
Beirut	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (2)	<i>Serratia marcescens</i> (1)	<i>Pseudomonas luteola</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
		<i>Hafnia alvei</i> (10 <sup>4</sup> )		
		<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)		
Qadicha	<i>Serratia marcescens</i> (2)		<i>Pseudomonas luteola</i> (1)	
		<i>Hafnia alvei</i> (1)		
		<i>Cedecea lepagei</i> (1)		
Awali		<i>Enterobacter amnigenus</i> (5)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (3)	(12)
		<i>Escherichia coli</i> (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10)	

## 2.2. Susceptibility Profiles

We performed susceptibility testing for a panel of Enterobacterales (33) and *Pseudomonas* (39) strains. The results are shown in Table 2. We found 16 out of the 33 Enterobacterales and 6 out of the 39 *Pseudomonas* strains tested that expressed an ESBL phenotype detected with the double-disk synergy test according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) v8 guidelines.

**Table 2.** Resistance of the tested Enterobacterales and *Pseudomonas* species: numbers indicate the number of strains resistant out of the strains tested (%).

	Enterobacterales		<i>Pseudomonas</i>	
	Spring	Winter	Spring	Winter
Cefepime	16/27 (59%)	6/6 (100%)	6/31 (19%)	5/8 (63%)
Imipenem	2/27 (7%)	0/6 (0)	3/31 (10%)	0/8 (0)
Ceftazidime	17/27 (63%)	5/6 (83%)	6/31 (19%)	5/8 (63%)
Piperacillin-tazobactam	6/27 (22%)	4/6 (67%)	3/31 (10%)	4/8 (50%)
Gentamicin	5/27 (19%)	6/7 (17%)	0/31 (0)	1/8 (13%)
Amikacin	2/27 (7%)	1/6 (17%)	2/31 (6%)	1/8 (13%)
Aztreonam	21/27	6/6	27/31	8/8



---

---

(78%)

(100%)

(87%)

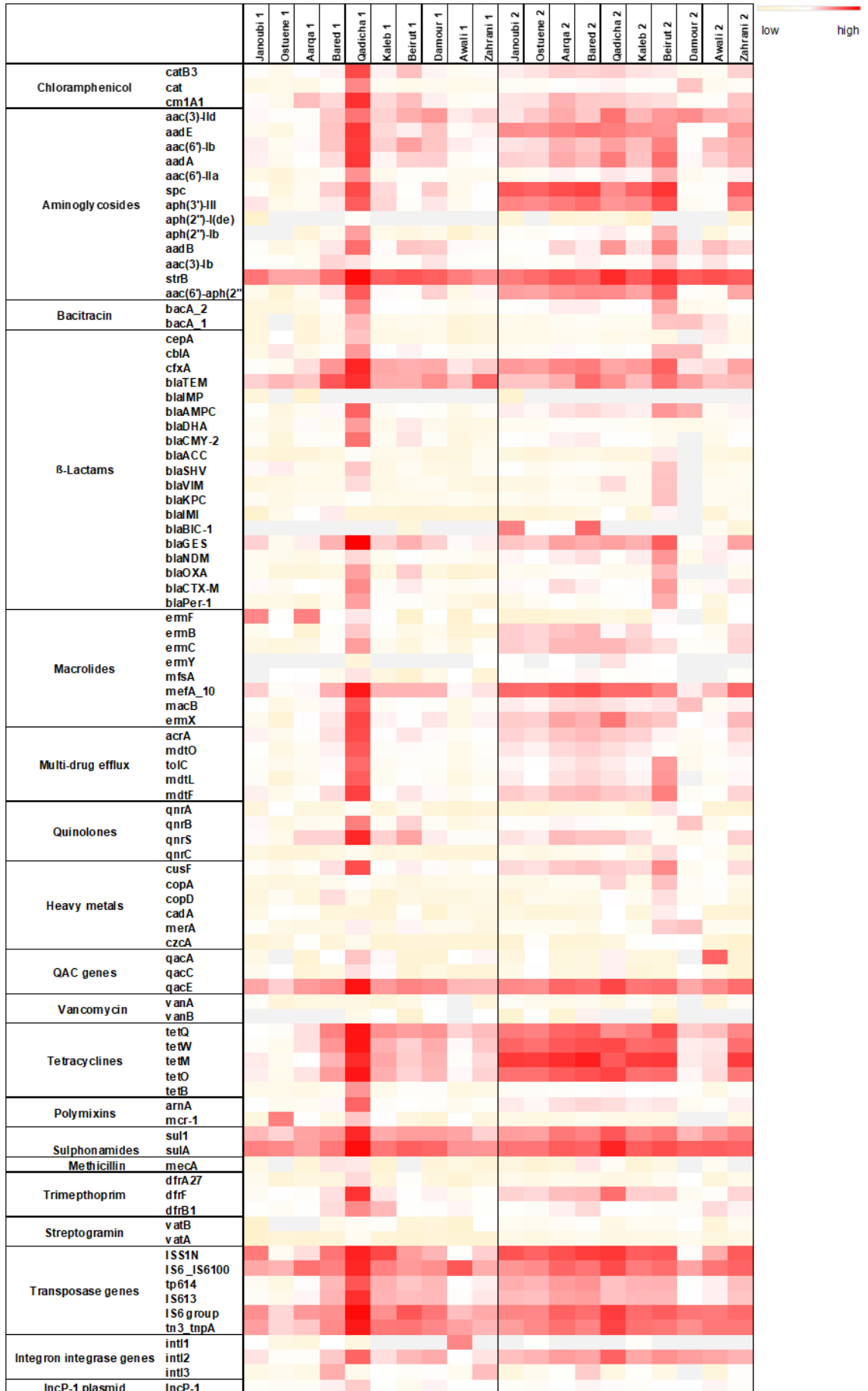
(100%)

---

Resistance towards the tested antibiotics was broadly disseminated. All tested strains of *Pseudomonas* in spring were susceptible to gentamicin. In winter, we detected two *Pseudomonas aeruginosa* strains with an ESBL synergy test, one in Janoubi and one in Beirut. We detected five strains resistant to imipenem in spring, three ESBL-positive *Pseudomonas luteola* strains (two in Aarqa and one in Beirut), and two Enterobacterales strains (one ESBL *Klebsiella oxytoca* in Aarqa and one *Serratia marcescens* in Qadicha). No resistant strains to imipenem were detected in winter.

### 2.3. Targeted Resistome Assessment by High-Throughput qPCR

Total DNA was extracted from triplicate river samples collected at the 12 estuaries of the major Lebanese rivers. The resistome analysis could only be performed on 10 rivers during both sampling campaigns since for 2 rivers DNA concentration was not sufficient. Figure 1 depicts the abundance of each targeted gene normalized to the 16S rRNA encoding gene.



**Figure 1.** Heat map depicting the normalized abundances to the 16S rRNA gene of each targeted gene in spring (1) and in winter (2) in the 10 estuarine Lebanese river samples. Three-color legend with red: high normalized abundance, white: medium normalized abundance, and light yellow: low normalized abundance. Grey fields: gene undetectable. qac genes: genes conferring resistance to quaternary ammonium compounds.

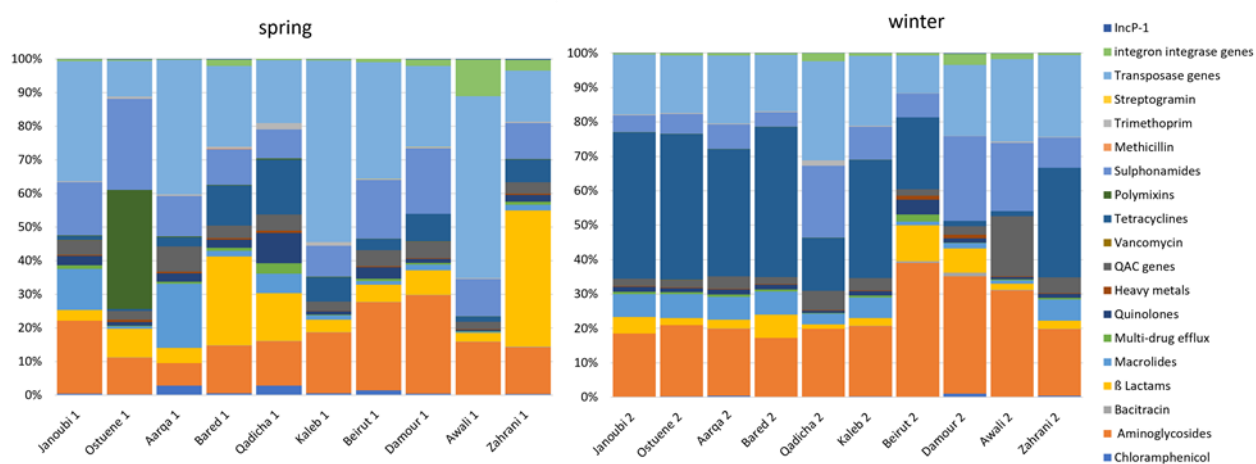
Overall, a higher normalized abundance of the targeted resistome was detected during the winter sampling campaign (Figure 1). Normalized abundance of individual ARGs was markedly high for the Qadicha estuarine during both sampling campaigns, compared with all other estuaries.

The marker IncP-1 was detected in all river estuaries. IncP-1 plasmids are highly promiscuous and considered as anthropogenic markers in the environment. They frequently carry multiple ARGs and are suggested to be important vectors of ARGs and integrons [31].

Noticeably, transposase genes that are associated with the dissemination of ARGs amongst bacteria were detected in high normalized abundance in most river samples, especially during the winter sampling campaign. Individual resistance genes such as the *strB*, *spc* (conferring resistance to streptomycin, spectinomycin), the *mefA* gene (conferring resistance to macrolides), the tetracycline resistance gene *tetM*, and the resistance gene *sulA* conferring resistance to sulphonamides, were also detected in higher normalized abundance in different rivers during the winter sampling campaign.

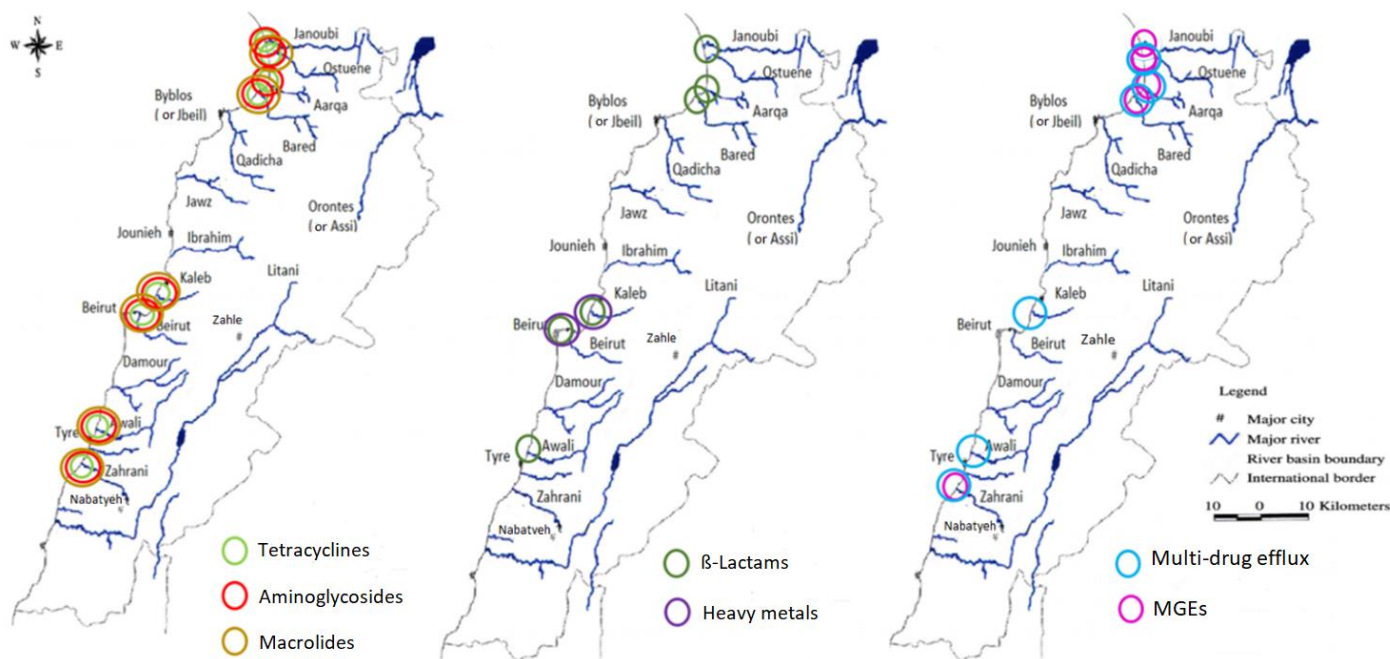
Figure 2 exhibits different resistome signatures between the two sampling campaigns, with a higher diversity between individual rivers in spring than in winter. The resistome signature is less variable and remarkably similar between the northern sampled estuaries (Janoubi, Ostuene, Aarqa, and Bared) during the winter campaign.

Variation in normalized abundance for the different gene families in the estuaries during the two sampling campaigns in winter and spring was assessed using the non-parametric Wilcoxon's test. Figure 3 depicts the estuaries where a significant difference in the mean normalized abundance was observed between spring and winter. The *p* values corresponding to all the significant variations are available in Supplementary Table S2.



**Figure 2.** Proportional abundances of targeted genes grouped into gene families according to their function per river in spring and in winter in 10 estuarine

Lebanese rivers samples. *qac* genes: genes conferring resistance to quaternary ammonium compounds.



**Figure 3.** Graphical representation showing the estuaries where an increase in the mean normalized abundances of the ARGs families and MGEs (transposase genes, integron integrase genes, and the IncP-1 gene were grouped together as mobile genetic elements) from spring (2017) to winter (2018) was significant ( $p < 0.05$ ).

Although we observed a significant increase for most ARG families in all samples from spring to winter, the mean normalized abundances of tetracyclines and beta-Lactams, decreased from spring to winter in the Qadicha and Damour estuaries. In Qadicha, the aminoglycoside, macrolide, tetracycline, multidrug efflux, and transposase genes decreased significantly from spring to winter.

### 3. Discussion

Here we show that high levels of ARB and ARGs could be detected in all studied Lebanese rivers during all time points. Previous studies underlined the contamination of Lebanese rivers with fecal bacteria, especially *Escherichia coli* and coliforms, reaching 70.4% of the rivers in the North and 60% in the Bekaa region, which was above the acceptable threshold according to the French SEQ-EAU-2003 recommendations for irrigation water [32].

In our study, we showed that the levels of ARBs and ARGs varied according to the location.

The Lebanese coastal belt from Tripoli to Tyre is an urbanized zone with significant agricultural activities [33][34]. The highest bacterial counts, (Enterobacterales (*Hafnia alvei* ( $10^4$ )) in winter and *Pseudomonas luteola* ( $10^4$ ) in spring) were detected in the estuary of the capital Beirut. The highest normalized abundance of ARGs was observed in the Qadicha estuary in spring. The Qadicha river is a small river impacted by population growth, high industrial activities, and a chronic default of wastewater treatment. It has been shown that the estuary of this river was highly contaminated with pollutants [35], which may explain the high

levels of ARGs and ARB detected here. The highest diversity of Enterobacterales was isolated from the Aarqa estuary in spring 2017, while a higher bacterial count was observed in winter (*Klebsiella pneumoniae* 50 CFU). The Aarqa estuary is located on the northern rural coast, inhabited by local and refugee communities with high agricultural activities.

Interestingly, we observed particularly high levels of ARGs in the North (Figure 3), which corresponds to the area with the highest number of inhabitants and with a high density of refugees' camps (Figure 4). Lebanon hosts the largest number of refugees per capita worldwide. The Syrian crisis in the year 2011 has escalated river water pollution, particularly on the northern coast, following the migratory inflow of displaced persons searching for water points and settling to find refuge while infrastructure is lacking [36]. This inflow has contributed to sustaining extreme hot spots of water stress in urban areas in informal settlements (the Northern coast or in the Bekaa region), while water networks and governance are already insufficient [32]. In addition to the efforts from humanitarian organizations such as the UNHCR and the UNICEF to improve the sanitary of a fraction of the displaced people by the implementation of water and wastewater facilities, local initiatives to strengthen and/or rehabilitate existing infrastructure also exist and must be continued to alleviate the vulnerability of displaced communities and to reduce the water stress in the country [37,38].

River water levels in Lebanon increase during spring due to the rise of underground water and the snowmelt [39]. The difference in water levels between seasons may contribute to the observed lower normalized abundances of the targeted resistome in spring compared with the winter season (Figure 1). Notably, we observed a higher diversity of ARB and ARGs in the spring sampling campaign (Figure 2). The observed diversity for the targeted resistome and ARB in spring may also reflect an impact due to higher recreational activities in spring compared with winter.

Most bacteria that were isolated from the river estuaries were highly resistant to  $\beta$ -Lactams, with 16/33 Enterobacterales strains and 6/39 *Pseudomonas* strains expressing an ESBL phenotype. The targeted resistome analysis of the river water samples detected a panel of ESBL-encoding genes, including a high abundance of ESBL-encoding genes that were specifically detected in the Mediterranean Sea [40,41], such as *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>GES</sub>* in most river samples during both seasons.

The high normalized abundance detected for transposase genes in the estuaries in both sampling campaigns might be indicative of an increased dissemination of ARGs among the bacteria in Lebanese estuaries. Transposons in rivers have been suggested to drive the dissemination of ARGs [42]. It was recently shown that transfer between resistance plasmids and bacterial chromosomes is mediated by insertion sequences, mainly those belonging to the IS6 family, IS26, and IS6100 [43]. The clinically relevant *IS6*-group and *IS6100* genes were detected in high abundance in the estuaries studied.

The high prevalence of the tetracycline resistance genes (*tetQ*, *tetW*, *tetM*, and *tetO*) might be the result of antibiotic selective pressure, considering that tetracyclines persist for a long time in the environment and are used frequently in human and veterinary medicine and aquacultural and agricultural practices [44–46].

Studies in lower income countries with lack of sanitation measures and operational wastewater treatment systems have shown high levels of

ARBs and ARGs that were significantly correlated with human gut bacteria and pathogens [23,47,48]. Inversely, resistant Enterobacterales in the urbanized San Francisco Bay were absent from near-shore sediments, suggesting that urbanized estuaries may not constitute a major human exposure hazard when secondary and tertiary treatment operations and control measures for all wastewaters that drain into the studied environment are implemented [49]. Altogether, the presence of ESBL and carbapenemase-producing pathogens and corresponding ARGs in the Lebanon estuaries raises concerns and warrants further attention [50].

The presence of MRSA in Aarqa, Ostuene, and Awali estuaries detected in spring should be closely monitored since studies have clearly shown that *Staphylococcus aureus* and MRSA persist in anthropized river samples, presenting a potential source of the dissemination and transmission of resistant bacteria [51–53].

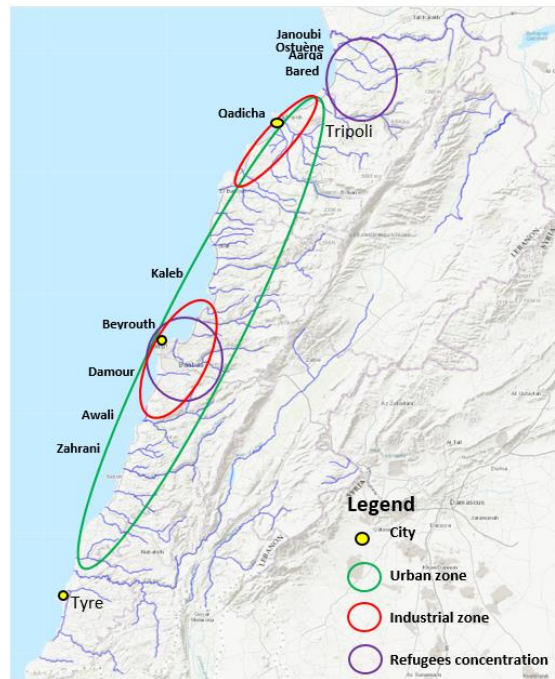
Currently, wastewater treatment plants (WWTP) in Lebanon mainly use secondary systems, although their status of operability is undetermined [36].

Here, we confirmed the estuaries of Lebanon as putative host-spots for the dissemination of ARGs and resistant bacteria into the Mediterranean Sea. Recreational waters such as rivers and beaches have gained increased attention as having a central role in the persistence, dissemination, and emergence of antibiotic resistance [54]. Specific surveillance systems should be put in place that trace urban movements, contact with recreational waters, pollution levels, and WW treatment levels and management to trace the actual dissemination of antimicrobial resistance through recreational waters [55].

#### 4. Materials and Methods

Lebanon is located in the eastern Mediterranean area along a coastal length of 220 km [30] and is characterized by a short, cold, and wet winter season from January to March, with annual rainfall ranging between 850 mm and 1800 mm/year, and by a dry summer [56,57]. The surface waters in Lebanon are under increased pressure from anthropic activities, i.e., urban, industrial, and recreational. Agriculture in the coastal zone in Lebanon requires irrigation with surface and groundwater, causing the depletion of water resources while increasing pollution according to the Food and Agriculture organization report of the year 2016 [36].

Figure 4 marks anthropogenic impact on the different geographic locations of Lebanon by indicating important urban zones, industrial zones, and activity, as well as zones with high population densities due to the influx of refugees.



**Figure 4.** High anthropogenic impact locations. A map from “Rivers, Lebanon, 2012. <https://maps.princeton.edu/catalog/stanford-wn533df2039>”. Web. 22 Feb. 2022 representing the Lebanese rivers, modified to show locations on the Lebanese coast of the largest industrial zones (Beirut and Tripoli), the highest urbanized area, and the location of refugees, according to the UNHCR, UN-habitat 2014, and the UNRWA 2021 organizations.

Fifteen Lebanese rivers spread through or at the extension of the Mount of Lebanon for a dozen of km eastward before discharging in small catchment areas leading to the Mediterranean Sea [58]. The rivers spread over the territory, making it a dense network of watercourses at a less than 10 km distance from each other and sharing similar basin characteristics [58]. To evaluate the seasonal impact on the presence and abundance of ARBs and ARGs, sampling campaigns were performed at two different periods.

Among the rivers’ estuaries, twelve estuaries or mouths were sampled in triplicate in sterile cups in April 2017 and January 2018, resulting in  $n = 72$  river water samples: 36 in spring and 36 in winter (3 samples of 60 mL each taken one after the other per river) (Figure 5). The samples from two rivers (Litani and Ibrahim) did not contain sufficient biomass and were excluded from the study. Weather conditions in terms of temperature with slight or no precipitation were similar, along with the month duration for each of the two sampling campaigns. Samples were transported on ice directly to our Lebanese laboratory for further analysis within 2 h. The exact coordinates registered for each sampling location as well as the temperatures are available in Supplementary Table S1.



**Figure 5.** Sampling sites are represented as blue triangles on the map of the Lebanese rivers. Figure adapted from Hourri and El Jeblawi (2007).

The water samples were analyzed by the spread-plate method, culturing a  $V = 1\text{ ml}$  volume, using sterile rakes on MacConkey and Mannitol Salt agar selective of Gram-negative bacteria and *Staphylococcus spp.*, respectively, with and without antibiotics. For Gram-negative enteric bacteria, we used ceftriaxone (2 mg/L), cefepime (4 mg/L), or ertapenem (0.5 mg/L). For *Staphylococcus aureus*, we used oxacillin (4 mg/L). All media were incubated at 37 °C for 48 h. For Gram-negative bacteria, species identification was performed with API® 20 NE (for *Pseudomonas*) or API® 20 E (for Enterobacterales) galleries (Biomérieux). For *S. aureus*, we used three phenotypic tests: catalase, DNase, and coagulase.

The susceptibility testing was performed on Mueller–Hinton agar according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) v8 guidelines. Antibiotic Bio-Rad® discs used were: amoxicillin–clavulanic acid (20 µg–10 µg), cefepim 30 µg, ceftazidim (10 µg), aztreonam (30 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), piperacillin–tazobactam (30 µg–6 µg), and imipenem (10 µg) for Gram-negative bacteria, and fusidic acid (10 µg), cefoxitin (30 µg), trimethoprim–sulfamethoxazole (1.25–23.75 µg), gentamicin (10 µg), and ciprofloxacin (5 µg) for *S. aureus*.

For molecular analysis, the three water samples per river were filtered (total volume of water filtered = 180 mL), using a filtration ramp (Sartorius, Göttingen, Germany) on a sterile 47 mm diameter filter with a pore size of 0.45 µm (Sartorius, Göttingen, Germany). Microorganisms were recovered from filters and subject to DNA extraction for downstream analysis using the DNeasy PowerWater® (Qiagen) adapted to water samples. All DNA samples were diluted or concentrated to a final concentration of 10 ng/µL for downstream qPCR and 16S rRNA analysis.



The Litani and Ibrahim rivers estuaries were excluded from the analysis, as the respective water samples contained insufficient biomass even after an additional 2 L water volume sampling and DNA extraction.

We targeted 71 ARGs, 6 heavy metal resistance genes, and 3 genes encoding resistance to quaternary ammonium compounds, 9 MGEs (transposases ISSW1, ISS1n, IS6100, IS613, IS6 group, Tn3, ISCEc9, tp614), and integron integrase genes (*intI1*, *intI2*, and *intI3*) [10]. The list of all the primers is published [10]. The 16S rRNA encoding genes were targeted to allow normalizing the abundance of individual resistance genes.

The targeted genes are grouped according to their function [10] with, in addition, the added environmental resistance marker: IncP-1 [31].

High throughput real-time PCR was performed using the Biomark microfluidic system from Fluidigm, in which every sample–gene combination is quantified using a 96.96 Dynamic Array™ IFCs (BMK-M-96.96, Fluidigm), as described previously [59]. A mean normalized abundance for each ARGs' family and each estuary in spring and winter was calculated by dividing the cumulated abundance by the number of ARGs constituting the ARG family. The mean abundance of the ARGs families was then compared between spring and winter to assess a possible variation between the seasons. The estuaries where a significant variation was observed are listed in Supplementary Table S2.

## 5. Conclusions

To date, this is the first study to provide an accurate assessment and comparison of the targeted resistome in ten estuaries on the Lebanese coast. A combined approach using culture-based techniques and high throughput qPCR for the detection of ARBs and ARGs identified Lebanese river estuaries as hotspots for antimicrobial resistance. This study highlights the need to implement regular antimicrobial resistance surveillance and improvement in wastewater management, in addition to the enforcement of regulations and guidelines stringency for sewage sludge or wastewater reuse, as per the new EU 2020/741 legislation of the European parliament.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Table S1: The exact coordinates of the sampling locations and the temperature recorded at the time of sampling, Table S2: Significant variations ( $p < 0.05$ ) in ARGs families in the rivers between spring and winter.

**Author Contributions:** Conceptualization, W.H., D.S., and C.D.; methodology, W.H., M.G., and E.B; software, W.H. and E.B.; validation, E.B., D.S., and C.D.; formal analysis, W.H., E.B., and M-C.P.; investigation, W.H.; resources, D.S. and M-C.P.; data curation, E.B. and M-C.P.; writing—original draft preparation, W.H.; writing—review and editing, W.H., E.B., C.D., and M-C.P.; visualization, E.B. and M-C.P.; supervision, E.B. and C.D.; project administration, D.S. and C.D.; funding acquisition, D.S., C.D., and M-C.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by The National Council for Scientific Research Lebanon CNRS-L, the Inserm Research Institute and French Ministry of Research, and the Research Council of the Saint-Joseph University of Beirut.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Collignon, P.; Beggs, J.J.; Walsh, T.; Gandra, S.; Laxminarayan, R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: A univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet. Heal.* **2018**, *2*, e398–e405. [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(18)30186-4).
2. Pieri, A.; Aschbacher, R.; Fasani, G.; Mariella, J.; Brusetti, L.; Pagani, E.; Sartelli, M.; Pagani, L. Country income is only one of the tiles: The global journey of antimicrobial resistance among humans, animals, and environment. *Antibiotics* **2020**, *9*, 473.
3. Iskandar, K.; Molinier, L.; Hallit, S.; Sartelli, M.; Catena, F.; Coccolini, F.; Hardcastle, T.C.; Roques, C.; Salameh, P. Drivers of Antibiotic Resistance Transmission in Low- and Middle-Income Countries from a “One Health” Perspective—A Review. *Antibiotics* **2020**, *9*, 372. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070372>.
4. Kumar, S.B.; Arnipalli, S.R.; Ziouzenkova, O. Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance. *Antibiotics* **2020**, *9*, 688. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100688>.
5. Goulas, A.; Belhadi, D.; Descamps, A.; Andremont, A.; Benoit, P.; Courtois, S.; Dagot, C.; Grall, N.; Makowski, D.; Nazaret, S.; et al. How effective are strategies to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review. *Environ. Evid.* **2020**, *9*, 4. <https://doi.org/10.1186/s13750-020-0187-x>.
6. Hernando-Amado, S.; Coque, T.M.; Baquero, F.; Martínez, J.L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>.
7. Chatterjee, A.; Modarai, M.; Naylor, N.; Boyd, S.E.; Atun, R.; Barlow, J.; Holmes, A.H.; Johnson, A.; Robotham, J. Quantifying drivers of antibiotic resistance in humans: A systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e368–e378. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30296-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30296-2).
8. Dickinson, A.; Power, A.; Hansen, M.; Brandt, K.; Piliposian, G.; Appleby, P.; O'Neill, P.; Jones, R.; Sierocinski, P.; Koskella, B.; et al. Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. *Environ. Int.* **2019**, *132*, 105117. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105117>.
9. Xiang, Q.; Chen, Q.-L.; Zhu, D.; An, X.-L.; Yang, X.-R.; Su, J.-Q.; Qiao, M.; Zhu, Y.-G. Spatial and temporal distribution of antibiotic resistomes in a peri-urban area is associated significantly with anthropogenic activities. *Environ. Pollut.* **2018**, *235*, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.119>.
10. Buelow, E.; Rico, A.; Gaschet, M.; Lourenço, J.; Kennedy, S.P.; Wiest, L.; Ploy, M.-C.; Dagot, C. 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. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100045>.
11. Pazda, M.; Kumirska, J.; Stepnowski, P.; Mulkiewicz, E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems—A review. *Sci. Total Environ.* **2019**, *697*, 134023.
12. Aubertreau, E.; Stalder, T.; Mondamert, L.; Ploy, M.-C.; Dagot, C.; Labanowski, J. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Sci. Total Environ.* **2017**, *579*, 1387–1398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136>.
13. Pärnänen, K.M.M.; Narciso-Da-Rocha, C.; Kneis, D.; Berendonk, T.U.; Cacace, D.; Do, T.T.; Elpers, C.; Fatta-Kassinos, D.; Henriques, I.; Jaeger, T.; et al. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaau9124. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>.
14. Buelow, E.; Ploy, M.-C.; Dagot, C. Role of pollution on the selection of antibiotic resistance and bacterial pathogens in the environment. *Curr. Opin. Microbiol.* **2021**, *64*, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.10.005>.
15. Dandachi, I.; Chaddad, A.; Hanna, J.; Matta, J.; Daoud, Z. Understanding the Epidemiology of Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacilli in the Middle East Using a One Health Approach. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1941. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01941>.
16. Jammoul, A.; El Darra, N. Evaluation of Antibiotics Residues in Chicken Meat Samples in Lebanon. *Antibiotics* **2019**, *8*, 69. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020069>.
17. Vaz-Moreira, I.; Ferreira, C.; Nunes, O.C.; Manaia, C.M. Sources of Antibiotic Resistance: Zoonotic, Human, Environment. *Antibiot. Drug Resist.* **2019**, *10*, 211–238.
18. Lundborg, C.S.; Tamhankar, A.J. Antibiotic residues in the environment of South East Asia. *BMJ* **2017**, *358*, j2440. <https://doi.org/10.1136/bmj.j2440>.
19. Triggiano, F.; Calia, C.; Diella, G.; Montagna, M.T.; De Giglio, O.; Caggiano, G. The Role of Urban Wastewater in the Environmental Transmission of Antimicrobial Resistance: The Current Situation in Italy (2010–2019). *Microorganisms* **2020**, *8*, 1567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101567>.
20. Cacace, D.; Fatta-Kassinos, D.; Manaia, C.M.; Cytryn, E.; Kreuzinger, N.; Rizzo, L.; Karaolia, P.; Schwartz, T.; Alexander, J.; Merlin, C.; et al. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Res.* **2019**, *162*, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>.

21. Huijbers, P.M.; Flach, C.-F.; Larsson, D.J. A conceptual framework for the environmental surveillance of antibiotics and antibiotic resistance. *Environ. Int.* **2019**, *130*, 104880. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.074>.
22. An, X.-L.; Wang, J.-Y.; Pu, Q.; Li, H.; Pan, T.; Li, H.-Q.; Pan, F.-X.; Su, J.-Q. High-throughput diagnosis of human pathogens and fecal contamination in marine recreational water. *Environ. Res.* **2020**, *190*, 109982. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109982>.
23. Karkman, A.; Pärnänen, K.; Larsson, D.G.J. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 80. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>.
24. Guo, X.; Feng, C.; Gu, E.; Tian, C.; Shen, Z. Spatial distribution, source apportionment and risk assessment of antibiotics in the surface water and sediments of the Yangtze Estuary. *Sci. Total Environ.* **2019**, *671*, 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.393>.
25. Zhang, Y.; Li, A.; Dai, T.; Li, F.; Xie, H.; Chen, L.; Wen, D. Cell-free DNA: A Neglected Source for Antibiotic Resistance Genes Spreading from WWTPs. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *52*, 248–257. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04283>.
26. Guo, X.-P.; Liu, X.; Niu, Z.-S.; Lu, D.-P.; Zhao, S.; Sun, X.-L.; Wu, J.-Y.; Chen, Y.-R.; Tou, F.-Y.; Hou, L.; et al. Seasonal and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the sediments along the Yangtze Estuary, China. *Environ. Pollut.* **2018**, *242*, 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.099>.
27. Wu, Y.; Lau, H.K.; Lee, T.; Lau, D.K.; Payne, J. In Silico Serotyping Based on Whole-Genome Sequencing Improves the Accuracy of Shigella Identification. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e00165-19. <https://doi.org/10.1128/aem.00165-19>.
28. Wu, D.; Su, Y.; Xi, H.; Chen, X.; Xie, B. Urban and agriculturally influenced water contribute differently to the spread of antibiotic resistance genes in a mega-city river network. *Water Res.* **2019**, *158*, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.010>.
29. Wang, S.; Xue, N.; Li, W.; Zhang, D.; Pan, X.; Luo, Y. Selectively enrichment of antibiotics and ARGs by microplastics in river, estuary and marine waters. *Sci. Total Environ.* **2020**, *708*, 134594.
30. Kazour, M.; Jemaa, S.; Issa, C.; Khalaf, G.; Amara, R. Microplastics pollution along the Lebanese coast (Eastern Mediterranean Basin): Occurrence in surface water, sediments and biota samples. *Sci. Total Environ.* **2019**, *696*, 133933.
31. Plaza, J.J.G.; Blau, K.; Milaković, M.; Jurina, T.; Smalla, K.; Udiković-Kolić, N. Antibiotic-manufacturing sites are hot-spots for the release and spread of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in receiving aquatic environments. *Environ. Int.* **2019**, *130*, 104735. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.007>.
32. Dagher, L.A.; Hassan, J.; Kharroubi, S.; Jaafar, H.; Kassem, I.I. Nationwide Assessment of Water Quality in Rivers across Lebanon by Quantifying Fecal Indicators Densities and Profiling Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 883. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070883>.
33. Verner, D.; Ashwill, M.; Christensen, J.; McDonnell, R.; Redwood, J.; Jomaa, I.; Saade, M.; Massad, R.; Chehade, A.; Bitar, A.; et al. *Droughts and Agriculture in Lebanon*; World Bank: Washington, DC, USA, **2018**. <https://doi.org/10.1596/30595>.
34. Council for Development & Reconstruction. National Physical Master Plan of the Lebanese Territory; Chapter, 2005.
35. Merhabi, F.; Gomez, E.; Amine, H.; Rosain, D.; Halwani, J.; Fenet, H. Occurrence, distribution, and ecological risk assessment of emerging and legacy contaminants in the Kadicha river in Lebanon. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 62499–62518. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15049-0>.
36. Salman, M.; Abukhalaf, M.; del Lungo, A. *Assessment of Treated Wastewater for Agriculture in Lebanon*; FAO, Rome, Italy, 2016.
37. WHO. *Lebanon Water Quality Survey*; WHO/UNICEF: Geneva, Switzerland, 2019.
38. Yassin, N. 101Facts & Figures, Issam Fares Institute for Public Policy and International Affairs, American University of Beirut, Lebanon, 2018
39. Fayad, A. Evaluation of the Snow Water Resources in Mount Lebanon Using Observations and Modelling; Université Paul Sabatier-Toulouse III, France, 2017.
40. Aujoulat, F.; Ragot, R.; Toubiana, M.; Bancon-Montigny, C.; Monfort, P.; Salles, C Masnou, A.; Delpoux, S.; Rio, M.; Tournoud, M. et al., “Environmental antimicrobial resistance in a small urban Mediterranean river: a focus on endemic beta-lactamases in clinically relevant bacteria,” *Water*. **2021**, *13*, 2010.
41. Blanco-Picazo, P., Roscales, G., Toribio-Avedillo, D., Gómez-Gómez, C., Avila, C., Ballesté, E., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. “Antibiotic resistance genes in phage particles from antarctic and mediterranean seawater ecosystems,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 9, p. 1293, 2020.
42. Zhang B.; Qin S.; Guan X.; Jiang K.; Jiang M.; and Liu F. “Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Karst River and Its Ecological Risk,” *Water Res.*, **2021**, *203*, 117507

43. Che, Y., Yang, Y., Xu, X., Břinda, K., Polz, M. F., Hanage, W. P., & Zhang, T. "Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 118, no. 6, 2021.
44. Yoo K. and Lee G., "Investigation of the Prevalence of Antibiotic Resistance Genes According to the Wastewater Treatment Scale Using Metagenomic Analysis," *Antibiotics (Basel)*. **2021**, *10*, 188.
45. Scienedirect, "Tetracycline," 2021. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/tetracycline>. Web. 19 Feb. 2022
46. F. Granados-Chinchilla and C. Rodríguez, "Tetracyclines in food and feedingstuffs: from regulation to analytical methods, bacterial resistance, and environmental and health implications," *J. Anal. Methods Chem.* **2017**, *2017*, 1315497
47. Nadimpalli, M.; Delarocque-Astagneau, E.; Love, D.C.; Price, L.B.; Huynh, B.-T.; Collard, J.-M.; Lay, K.S.; Borand, L.; Ndir, A.; Walsh, T.; et al. Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower- and Middle-Income Countries. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 963–969. <https://doi.org/10.1093/cid/cix879>.
48. McInnes, R.S.; Uz-Zaman, H.; Alam, I.T.; Ho, S.F.S.; Moran, R.A.; Clemens, J.D.; Islam, S.; van Schaik, W. Metagenome-Wide Analysis of Rural and Urban Surface Waters and Sediments in Bangladesh Identifies Human Waste as a Driver of Antibiotic Resistance. *mSystems* **2021**, *6*, e0013721. <https://doi.org/10.1128/msystems.00137-21>.
49. Moritz, C.F.; Snyder, R.E.; Riley, L.W.; Immke, D.W.; Greenfield, B.K. Antimicrobial Drug-Resistant Gram-Negative Saprophytic Bacteria Isolated from Ambient, Near-Shore Sediments of an Urbanized Estuary: Absence of  $\beta$ -Lactamase Drug-Resistance Genes. *Antibiotics* **2020**, *9*, 400. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070400>.
50. Morris, S.; Cerceo, E. Trends, Epidemiology, and Management of Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospitalized Setting. *Antibiotics* **2020**, *9*, 196. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040196>.
51. Silva, V.; Caniça, M.; Capelo, J.L.; Igrejas, G.; Poeta, P. Diversity and genetic lineages of environmental staphylococci: A surface water overview. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2020**, *96*, fiae191.
52. Tsai, H.-C.; Tao, C.-W.; Hsu, B.-M.; Yang, Y.-Y.; Tseng, Y.-C.; Huang, T.-Y.; Huang, S.-W.; Kuo, Y.-J.; Chen, J.-S. Multidrug-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from a subtropical river contaminated by nearby livestock industries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *200*, 110724. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110724>.
53. Ramessar, K.; Olaniran, A.O. Antibioqram and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 142. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2715-9>.
54. Hammer-Dedet, F.; Jumas-Bilak, E.; Licznar-Fajardo, P. The Hydric Environment: A Hub for Clinically Relevant Carbapenemase Encoding Genes. *Antibiotics* **2020**, *9*, 699. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100699>.
55. Singh, R.; Singh, A.P.; Kumar, S.; Giri, B.S.; Kim, K.-H. Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *J. Clean. Prod.* **2019**, *234*, 1484-1505.
56. Andraos, C.; Najem, W. Multi-model Approach for Reducing Uncertainties in Rainfall-Runoff Models. In *Advances in Hydroinformatics*; Springer: Singapore, 2020; pp. 545–557. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5436-0\\_43](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5436-0_43).
57. Baalbaki, R.; Nassar, J.; Salloum, S.; Shihadeh, A.L.; Lakkis, I.; Saliba, N.A. Comparison of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three urban areas in Lebanon. *Atmospheric Environ.* **2018**, *179*, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.02.028>.
58. Shaban, A. *Water Resources of Lebanon*, Springer Science Publisher. 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-48717-1>.
59. Buelow, E.; Bayjanov, J.R.; Majoor, E.; Willems, R.; Bonten, M.J.M.; Schmitt, H.; van Schaik, W. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy087>.