UNIVERSITE DES ANTILLES

Faculté des Sciences Exactes et Naturelles

École doctorale ED589

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Antilles, spécialité Microbiologie

Matthieu POT

Echanges de gènes de résistance entre bactéries de différents biotopes

Réalisée à l'Institut Pasteur de la Guadeloupe et soutenue le 1er décembre 2021

Rapportrices	Dr Maria-Halima LAABERKI Université de Lyon – VetAgro Sup, CIRI – CNRS UMR 5308
	Pr Marie-Cécile PLOY Université de Limoges, INSERM UMR 1092, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges
Examinateurs	Dr Benoit GARIN Centre Hospitalier Universitaire de la Guadeloupe, Pôle mutualisé de biologie, Service de microbiologie
	Pr Olivier GROS Université des Antilles, ISYEB UMR 7205
Directeur de thèse	Dr Antoine TALARMIN Directeur de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe
Co-encadrante de thèse	Dr Stéphanie GUYOMARD-RABENIRINA Co-responsable Unité LEMic, Institut Pasteur de la Guadeloupe

Remerciements

Mes remerciements à Madame la **Professeure Marie-Cécile PLOY** et au **Docteur Maria-Halima LAABERKI** pour avoir évalué ce travail de recherche. Merci au **Professeur Olivier GROS** et au **Docteur Benoit GARIN** pour avoir participé à ce jury en qualité d'examinateurs. Un grand merci pour votre disponibilité et l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Avant d'aborder le sujet de mon mémoire de thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné pendant ce long cursus et qui m'ont beaucoup apporté, autant sur le plan personnel que professionnel, à commencer par l'ensemble des collaborateurs qui m'ont accueilli au sein de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe et que j'ai pu côtoyer depuis 2017.

Au **Docteur Antoine TALARMIN**, directeur de l'établissement, pour son accueil, et qui par la confiance accordée à mon égard m'a permis d'effectuer ce projet au sein du laboratoire sous sa responsabilité avec une grande autonomie. Merci pour vos encouragements bienveillants. Merci pour votre disponibilité malgré les nombreuses autres responsabilités qui vous incombent et votre emploi du temps chargé dans la gestion de l'épidémie de COVID-19. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez apporté et notamment tous ces moments passés en dehors du travail ! Je remercie au passage le reste de la **famille TALARMIN** que j'ai pu côtoyer : **Micheline, Gilles, Gabrielle** et **Arnaud**. Merci pour l'aventure digne de Mike Horn que nous avons passé ensemble sur les mers et qui m'a définitivement conforté à l'idée que je n'ai pas le pied marin...

Je tiens à exprimer ma gratitude envers la **Docteure Stéphanie GUYOMARD-RABENIRINA**, ma maître de stage en 2017 et qui a co-encadrée cette thèse. Merci de m'avoir conseillé tout au long de ces 4 années, et d'avoir eu les mots pour me redonner confiance lors des phases plus difficiles…

A tous les deux, je suis très reconnaissant pour tout ce savoir que vous avez partagé durant ce projet. Merci pour vos relectures assidues de ce gros pavé. Merci pour votre attention à mon égard afin que ce tout se déroule sous les meilleurs auspices malgré les quelques péripéties rencontrées.

Un remerciement spéciale à mes amis et collègues **Célia DUCAT**, **Antoine BOULLIS, Lyza HERY, Syndia SADIKALAY** qui m'ont soutenue au laboratoire et m'ont permis de m'aérer l'esprit en dehors. Merci pour votre soutien et votre présence !

Je remercie aussi le **Professeur Sébastien BREUREC**, pour ton aide pendant la rédaction des articles qui composent cette thèse, pour ta disponibilité et les conseils que tu m'as apporté.

Un grand Merci au **Docteure Séverine FERDINAND** pour les discussions très enrichissantes tout au long de l'évolution de ce projet, et surtout ton aide pour le séquençage MinION ! Merci aux **Docteures Anubis VEGA-RUA**, **Isabel MARCELINO** et **Elodie CALVEZ** pour votre regard extérieur, vos précieux conseils, et les nombreux moments et looonnngues discussions extra-professionnelles.

Merci à la team bio-informatique et particulièrement aux **Docteurs Yann REYNAUD** et **David COUVIN** pour m'avoir initié à ce vaste domaine, et répondu présent lorsque j'étais bloqué ou en détresse dans « la matrix ». Merci aussi à **Alexis DEREEPER** pour tes conseils et ton aide dans l'analyse génomique. Longue vie au KaruBioNet et à sa plateforme Galaxy ! Merci aux collaborateurs de la **Plateforme de Microbiologie Mutualisée** de l'Institut Pasteur de Paris pour les séquençages toujours impeccables. Je remercie aussi les **Docteurs François GUERIN** et **François GRAVEY** pour votre collaboration et votre aide pour mieux comprendre le complexe *Enterobacter cloacae*. Il y en a des choses à explorer chez *cloacae* !

Merci infiniment à la communauté d'agglomération Cap Excellence pour leur collaboration et à l'ensemble des employés que j'ai pu côtoyer au sein de la station d'épuration de Jarry Pointe-à-donne, notamment **Mr Gilbert HARAL**. Ma reconnaissance à **Mr Bernard VITALIS** pour sa confiance, et qui m'a permis d'élargir mon périmètre d'analyse. J'espère que les résultats de ce projet seront utiles à toutes les parties prenantes ! Ces travaux n'auraient pas pu être aussi complets sans la collaboration active du personnel hospitalier que j'ai pu côtoyer au CHU de Pointe-à-Pitre / Les Abymes. Je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de microbiologie. Merci aux **docteures Sylvaine BASTIAN**, **Tania FOUCAN** ainsi qu'à **Mme Malika JEAN-PIERRE** pour votre aide dans la récupération des métadonnées associées au fonctionnement de l'hôpital. Merci à **Mme France-Lise JEREMIE** pour ton aide dans la préparation des milieux de culture tout au long de ce projet. Je remercie au passage tous les collègues du Laboratoire d'Hygiène et de l'Environnement impliqués dans le processus d'échantillonnage. Merci à tous les stagiaires qui ont pu participer de près ou de loin à l'élaboration de ces résultats. Enfin merci à **Mme Elisabeth HESELTINE** pour l'assistance éditoriale effectuée sur les différents articles associés à ce manuscrit, et je souhaite un bon courage à **Mme Degrâce BATANTOU** pour la suite de ce projet.

Je remercie l'ensemble de **l'équipe pédagogique** qui m'a accompagné jusqu'à ce manuscrit. Je remercie les collaborateurs l'Université des Antilles que j'ai pu côtoyer, et notamment le service informatique pour l'aide matérielle afin de mener à terme les analyses bio-informatiques.

Une pensée à **Adrien, Gladys, Mayenna et sa famille, la famille GUYOMARD-RABENIRINA et à Sully**, merci pour ces moments agréables que nous avons passé ensemble. Et je n'oublie pas **La team Acapulco, Les membres du groupe Masko et Le Zion !** Merci aussi à tous mes amis, **Les POTOS**, que je n'ai malheureusement pas pu mettre dans mes bagages avant de m'installer à « L. A. » en 2017… Il me tarde de tous vous revoir !

Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement **mes parents** sans qui je n'aurai pas pu faire ce premier voyage en 2017 et qui m'ont toujours soutenu dans mon parcours. Merci à **toute ma famille, tous ceux qui me sont chers, mes sœurs, cousins, oncles, tantes, grands-parents**, présents malgré les kilomètres qui nous séparent. Vous revoir pendant mes courts séjours « au pays » m'a fait beaucoup de bien.

Ce projet très riche en ouverture n'aurait pu être possible sans la gentillesse, la spontanéité et la bienveillance de chacune des personnes que j'ai pu côtoyer et pour toutes ces raisons, j'en garderai un bon souvenir. Je remercie toutes les personnes que j'ai pu oublier mais qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse, merci de m'avoir soutenu, et d'avoir été là pour moi.

Je tiens à dédicacer cette thèse **à la mémoire de Jeanne QUERE, ma mamie**. Ton départ brusque alors que j'étais si loin m'a fait prendre conscience du temps qui passe si vite et de l'importance de la famille et de l'entourage. J'aurais tellement aimé être là et surtout te revoir, et partager encore des moments avec toi après cette longue péripétie. Je te savais si fière de ton petit fils et sans aucun doute tu aurais lu avec grand plaisir et bienveillance ce manuscrit (en corrigeant les fautes et ma syntaxe au passage…).

Mèsi onpil

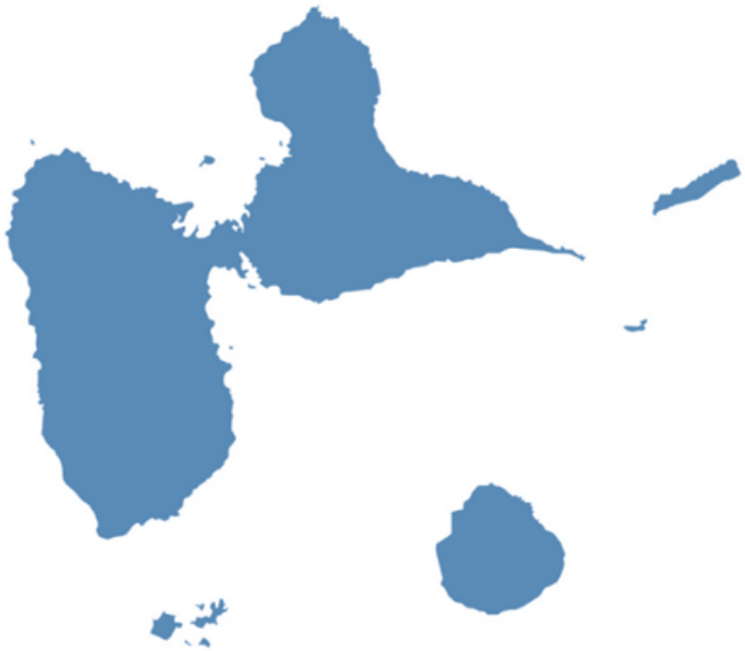


Image : https://www.vectorstock.com

Table des matières

Liste des figures 9
Liste des tableaux 12
Travaux associés 14
Abréviations 16
Introduction 18
Revue de la littérature 20
I. Les entérobactéries, focus sur les espèces étudiées : *E. coli*, *E. cloacae* complex et *K. pneumoniae* complex 21
A) *Escherichia coli* 21
1. Commensalisme et pathovars 21
2. Méthodes de typage et de caractérisation de l'espèce 23
3. Analyse par typage, le cas pratique du ST131 24
4. Importance clinique 25
5. Plasticité du génome et adaptabilité 26
B) *Enterobacter cloacae* complex 26
1. Méthodes de typage et d'identification des membres du complexe 26
2. Importance clinique et données épidémiologiques 28
C) *Klebsiella pneumoniae* complex 30
1. Méthodes de typage et d'identification des membres du complexe 30
2. Virulences spécifiques et lignées hypervirulentes 31
3. Importance clinique et données épidémiologiques 32
II. Les antibiotiques et le développement de la résistance 35
A) Vue d'ensemble des antibiotiques et mode d'action 35
B) Développement des résistances et principaux mécanismes 37
1. Un coût humain et économique 37
2. Les mécanismes bactériens mis en place 38
C) Les différents types de résistance 41
1. La résistance acquise par mutation du génome, exemple approfondi de la céphalosporinase hyperproduite chez *E. cloacae* complex 41
2. La résistance acquise par transfert de matériel exogène : les BLSE et le succès mondiale des CTX-M 45
D) Les mécanismes de diffusion de la résistance 57
1. La conjugaison 57
2. La transduction 58
3. La transformation 59
4. Les vésicules membranaires et les nanotubes : de nouvelles alternatives pour les bactéries dans la diffusion horizontale ? 60

E) Les éléments génétiques associés à la diffusion de la résistance 61
1. Les éléments transposables : séquences d'insertion et transposons 61
2. Les intégrons 63
3. Les éléments intégratifs et conjugatifs 66
4. Les plasmides 66
III. L'approche One-Health et les compartiments associées 80
A) Principes et application à la lutte contre l'antibiorésistance 80
B) Le compartiment environnemental : focus sur la faune sauvage 84
C) Les stations d'épuration des eaux usées : la principale interface entre les compartiments homme et environnement 88
1. Importance de l'hygiène et du traitement des eaux usées 88
2. Principe de fonctionnement des stations d'épuration à boues activées 89
3. Principaux risques biologiques et points d'exposition au sein d'une station d'épuration 92
4. Rôle des stations d'épuration dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques 94
IV. L'antibiorésistance en Guadeloupe 105
A) Focus sur le secteur hospitalier 105
B) Données au niveau communautaire et agricole 107
C) Données sur la situation de la faune sauvage en Guadeloupe 108
1. Une très grande richesse à protéger 108
2. Une prévalence limitée de l'antibiorésistance au sein de ce compartiment 109
D) Situation du traitement des eaux usées et filières associées en Guadeloupe 111
1. Vue d'ensemble du réseau d'assainissement guadeloupéen 111
2. Une filière en difficulté et une pollution environnementale palpable 112
3. Développement d'une valorisation locale des déchets d'assainissement 115
4. Une diffusion de l'antibiorésistance dans l'environnement aquatique 115
5. Une limitation des indicateurs de la résistance après compostage des boues 116
6. Antibiorésistance et environnement : une situation générale peu connue du grand public 116
Objectifs et description de l'étude 117
Matériel et méthode 120
I. Caractéristiques et description des sites étudiés, projet ECHANGENE 121
A) Le Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre / Les Abymes 121
B) La station d'épuration de Jarry Pointe-à-donne 122
C) Prélèvement des échantillons 126
1) Sélections des souches humaines 126
2) Prélèvements des eaux usées 126
3) Prélèvements des fèces d'animaux 127
D) Culture et isolement sélectif des souches d'intérêt 129
1) Culture Initiale 129

2) Isolement des bactéries d'intérêt 129
3) Identification des bactéries 130
E) Caractérisation du phénotype de résistance par antibiogramme 131
F) Biologie moléculaire, approche globale 132
1) Extraction de l'ADN bactérien 132
2) Évaluation de la concentration et de la pureté des ADN extraits 132
G) Séquençage complet des souches d'intérêt 133
H) Vision globale de l'analyse des ADN 133
I) Localisation prédictive des contigs portant les gènes codant pour une BLSE. 136
J) Conservation des échantillons 136
Résultats 137
Partie I. Projet *Enterobacter* : Appréciation de la distribution et de la diversité d'*E. cloacae* complex résistant ou non aux antibiotiques dans les 3 compartiments de l'approche One-Health, dans un contexte « naturel » et de pression de sélection limitée.» et de pression de sélection limitée. 138
Partie II. Projet ECHANGENE : Appréciation de la dissémination de gènes d'antibiorésistance et des supports génétiques associés dans un contexte de pollution anthropique importante. 156
Chapitre 1 : prévalence et distribution des entérobactéries productrices de BLSE au sein des différents compartiments de l'étude ECHANGENE. 157
I. Souches productrices de BLSE chez l'homme 158
A) Vision globale de la situation pendant la période d'étude 158
B) Collection ECHANGENE pour le compartiment humain 160
II. Présence des souches productrices de BLSE le long du continuum des eaux usées 162
III. Prévalence des entérobactéries productrices de BLSE au sein du compartiment animal. 164
IV. Circulation de résistances en lien avec les BLSE le long du continuum des eaux usées 166
Chapitre 2 : Signatures chromosomiques / plasmidiques et patterns de gènes de résistance chez les entérobactéries productrices de BLSE 171
I. Diversité des populations bactériennes et distribution entre les compartiments. 172
II. Distribution des gènes de résistance aux antibiotiques 174
A) Variations entre les compartiments 174
B) Focus sur les gènes associés aux profils BLSE. 175
C) Localisation prédictive des contigs portant les gènes codant pour une BLSE chez *E. coli* et *K. pneumoniae* complex 176
III. Distribution des structures plasmidiques 177
IV. Focus sur la virulence au sein de la population d'*E. coli* 179
Chapitre 3 : Diffusion de germes producteurs de BLSE à travers le continuum des eaux usées, focus sur la collection d'*E. cloacae* complex 181
Chapitre 4 : *E. cloacae* complex, diversité et résistance aux antibiotiques dans un contexte clinique 196
Chapitre 5 : Analyse approfondie de la collection d'*E. coli* BLSE et phylogénie 215
I. Analyse phylogénétique 216

A) Contexte clinique initial 216
B) Sérotypes, phylogroupes et séquence types entre compartiments 219
II. Focus sur la résistance aux antibiotiques 224
A) Gènes de résistance et compartiments associés 224
B) Contexte plasmidique 226
III. Focus sur *E. coli* ST38 229
Chapitre 6 : Analyse approfondie de la collection de *K. pneumoniae* complex BLSE et phylogénie 233
I. Analyse phylogénétique de la collection 234
II. Focus sur la résistance aux antibiotiques 240
A) Gènes de résistance et compartiments associés 240
B) Contexte plasmidique 242
Chapitre 7 : Apport du séquençage « long-reads » et analyse approfondie d'une collection de plasmides 245
I. Focus sur le plasmide IncHI2/ST1/$bla_{CTXM-15}$ 246
II. Séquençage MinION et intégration chromosomique d'une CTX-M chez *E. coli : f*ocus sur *E. coli* ST3580 en Guadeloupe et à l'échelle mondiale 250
Discussion 255
I. Un contexte hospitalier original 256
A) Des taux d'incidence de bactéries mulirésistantes non représentatifs des données de l'hexagone 256
B) Infections à ECC BLSE : des clones bien implantés au niveau nosocomial 257
C) *E. coli* ST131 et ST1193 : deux lignées incontournables 259
D) Une présence de nombreuses lignées de *K. pneumoniae* complex BLSE à haut risque en Guadeloupe 260
E) Un environnement nosocomial favorisant probablement le maintien et la diffusion de clones multirésistants 262
II. Des eaux usées hospitalières et urbaines associées à la diffusion des résistances 262
A) Une expansion dans le continuum des eaux usées : focus sur *Enterobacter* 263
B) *E. coli* : un marqueur des BLSE retrouvées chez l'homme 263
C) Une expansion de clones de *K. pneumoniae* complex peu décrite à l'international 264
III. Des bactéries multirésistantes au sein de la faune sauvage évoluant près des STEP 265
A) Un portage important chez les animaux de cet écosystème 265
B) Une dichotomie dans la diversité des gènes de résistance retrouvés 266
C) *E. coli* : une importante diversité chez les animaux 268
D) Une circulation de lignées clinique de *K. pneumoniae* complex 270
E) Un écosystème spécifique au détriment de la santé des animaux 271
F) Une possible persistance environnementale de la résistance 272
G) Virulence d'*E. coli* et hypervirulence chez *K. pneumoniae* complex : une future problématique au sein des STEP ? 274

IV. Une diffusion secondaire chez les animaux domestiques 275
A) Des similarités dans le voisinage des zones de traitement des eaux usées 275
B) Séquençage complet de souches animales : un partage de clones entre la faune sauvage et les animaux domestiques 276
1. *Enterobacter* ST114 : l'exemple type d'un possible clone multirésistant à haut risque. 276
2. L'implantation des *E. coli* productrices de BLSE 277
C) Des spécificités au sein de l'élevage informel 277
V. Un plasmide de résistance épidémique adapté à l'environnement 279
VI. Les eaux usées et les animaux, des « outils » incontournables dans la surveillance de l'antibiorésistance 284
A) Limitations et perspectives de l'utilisation des effluents dans le suivi local 284
B) La faune sauvage : un autre indicateur de la résistance à mieux prendre en considération. 285
C) Perspectives de limitation de la diffusion environnementale des gènes de résistances aux antibiotiques 287
VII. Station d'épuration, employés et riverains : perspectives 288
A) Les bioaérosols une autre piste dans la diffusion de germes BLSE pour les employés ? ... 289
B) Germes BLSE dans l'environnement des STEP et risque de portage chez les riverains..... 290
C) Perspectives de recherche et questionnement sanitaire aux alentours des stations 291
D) Un élargissement des vigilances environnementales pour limiter les points de diffusion .. 292
1. Une prise de conscience globale nécessaire 292
2. Bactéries multirésistantes et environnement aquatique : le rôle de l'assainissement à mieux considérer 293
3. Le cas de la zone humide de Jarry et de la mangrove guadeloupéenne : des zones totalement protégées ? 294
E) Une autre pollution durable et moderne de l'environnement aquatique : les plastiques 295
Conclusion générale du projet 297
Annexes 299
1. Poster présenté lors du Caribbean Science and Innovation Meeting du 20 au 23 octobre 2019 à l'Université des Antilles, Guadeloupe……..... 300
2. Poster présenté au 15e Congrès National de la Société Française de Microbiologie à Paris du 30 Septembre 2019 au 2 octobre 2019……..…. 301
3. Détails des indicateurs qualité Scope Santé du CHU de Pointe-à-Pitre/Les Abymes…… 302
4. Courrier d'alerte transmis par la mairie de Ste-Anne à la police de l'eau suite à des morts suspectes de poissons dans un cours d'eau en 2021…….. 303
5. Expérimentation annexe n°1 : Prélèvements environnementaux effectués en parallèle du projet ECHANGENE au sein de la station de Point-à-donne…….. 304
6. Expérimentation annexe n°2 : élevage de cafards et suivi du portage d'entérobactéries C3G-R.…. 308
Références 313

Liste des figures

Figure 1. Distribution des scores de résistance et de virulence parmi les principales lignées de *K. pneumoniae* isolées à travers le monde (Kp1)…… 34

Figure 2. Distribution des principaux séquences types (ST) de *Klebsiella pneumoniae* (Kp1) résistants aux céphalosporines de 3ème génération……...……... 34

Figure 3. Principaux mécanismes d'action des molécules antibiotiques et modes d'adaptation des bactéries.…...…… 36

Figure 4. Chronologie du développement des antibiotiques et de l'émergence des principales résistances chez les bactéries...…...……...……. 36

Figure 5. Estimation des coûts de la résistance aux antibiotiques aux Etats-Unis en 2017……..… 37

Figure 6. Représentation simplifiée du système de régulation de la céphalosporinase chromosomique (AmpC) chez *E. cloacae* complex...……...……..… 44

Figure 7. Evolution des données de surveillance des souches d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération en Europe en secteur hospitalier...…...…….. 47

Figure 8. Prévalence de la colonisation fécale par des entérobactéries productrices de BLSE au sein de la population générale (2015)…..…...……..… 49

Figure 9. Arbre phylogénétique représentant la similarité des gènes de type CTX-M….……...… 51

Figure 10. Tendances de la distribution des gènes de type CTX-M chez l'homme en milieu communautaire et hospitaliser entre 2005 et 2017..…...……...…... 52

Figure 11. Evolution des données de surveillance de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases en Europe en secteur hospitalier..…...……...…….. 57

Figure 12. Représentation schématique des transferts horizontaux de gènes chez les bactéries....…. 60

Figure 13. Vue d'ensemble des éléments génétique mobiles…….. 62

Figure 14. Structure d'un intégron et acquisition d'un gène……... 65

Figure 15. Structure schématique d'un plasmide transmissible…….. 66

Figure 16. Liste des principaux PTU mobilisables et conjugatifs retrouvés chez les *Enterobacterales* selon les travaux de Redondo-Salvo S. *et al*…… 69

Figure 17. Répartition des principaux groupes d'incompatibilité de plasmide (Inc) présentant des gènes de résistance au sein des entérobactéries, selon les compartiments et les continents……..… 70

Figure 18. Histoire évolutive simplifiée des clades d'*E. coli* ST131, et association aux principales formules FAB du groupe d'incompatibilité plasmidique IncF…….…… 72

Figure 19. Caractéristiques des principales *Enterobacteriaceae* d'intérêt clinique…….…… 82

Figure 20. Voies de dissémination possibles des gènes de résistance aux antibiotiques selon différentes échelles..…...……...……..…..…….. 83

Figure 21. Phylogénie d'*E. coli* productrices de BLSE issues de différents compartiments et distribution plasmidique..…...……...…….……..……... 83

Figure 22. Voies de transmission possibles de la résistance aux antibiotiques entre la faune sauvage et les autres compartiments..…...……...…….. 87

Figure 23. Prédiction du portage de bactéries résistantes aux antibiotiques chez différentes espèces d'animaux sauvages selon la pression anthropique de l'environnement considéré et les habitudes alimentaires observées……..…..…..……...……...… 87

Figure 24. Estimation du pourcentage de la population pratiquant la défécation en plein air…….... 89

Figure 25. Représentation schématique du process de traitement des effluents……..… 92

Figure 26. Diagramme de Venn des principaux agents retrouvés dans l'air autour des employés de station d'épuration à différentes étapes du process de traitement…….…… 94

Figure 27. Estimations mondiales de l'abondance de la résistance aux antimicrobiens……... 96

Figure 28. Représentation schématique d'une station d'épuration des eaux usées en tant que « bioréacteur » dans le développement et le maintien de la résistance aux antibiotiques……. 99

Figure 29. Densités d'incidence nationales des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline et des *Enterobacteriaceae* productrices de *β*-lactamase à spectre étendu pour 1 000 journées d'hospitalisation entre 2002 et 2017..…..…..……...…….. 106

Figure 30. Densités d'incidence nationales des principales *Enterobacteriaceae* productrices de *β*-lactamase à spectre étendu pour 1 000 journées d'hospitalisation entre 2002 et 2017…….... 106

Figure 31. Consommation nationale des antibiotiques en secteur de ville et dans les établissements de santé en 2018..…..…..……...……..…… 107

Figure 32. Carte d'occupation du territoire guadeloupéen..…..…..…….. 109

Figure 33. Arbre phylogénétique d'isolats d'*E. coli* BLSE de Guadeloupe retrouvés chez des animaux sauvages en comparaison avec une collection de souches humaines (2013 – 2014)……..… 110

Figure 34. Statut de l'ensemble des stations d'épuration des eaux usées recensées en Guadeloupe (n=128) vis-à-vis de la législation en vigueur pour l'année 2018…….. 111

Figure 35. Localisation et statut des 18 plus grandes stations d'épuration des eaux usées de l'archipel guadeloupéen en 2018..…..…..……...…… 112

Figure 36. Illustration des défaillances dans les process d'assainissement et de collecte des eaux usées en Guadeloupe..…..…..……...…… 113

Figure 37. Illustration de la pollution aquatique aux Antilles et au Mexique……...… 114

Figure 38. Estimation du taux de traitement actuel des eaux usées domestiques dans les territoires caribéens..…..…..…….……...……..… 114

Figure 39. Représentation schématique des différents types de prélèvements effectués sur le projet ECHANGENE..…..…..……...…… 124

Figure 40. Disposition des différents points de prélèvements sur le continuum des eaux usées….. 124

Figure 41. Disposition des différents bassins de traitement des eaux usées au sein de la station d'épuration (STEP) de Jarry Pointe-à-donne…….. 125

Figure 42. Vue d'ensemble du processus d'analyse de l'ADN……..… 135

Figure 43. Prévalence globale des principales entérobactéries productrices de BLSE à l'origine d'infection nosocomiale à l'hôpital de Pointe-à-Pitre / les Abymes……...… 158

Figure 44. Prévalence globale des souches d'entérobactéries productrices de BLSE à l'origine d'une infection nosocomiale (n=330) selon le type de prélèvement associé entre avril 2018 et août 2019. 159

Figure 45. Prévalence globale des souches d'entérobactéries BLSE à l'origine d'une infection nosocomiale (n=330) selon le secteur d'activité entre avril 2018 et août 2019……..… 159

Figure 46. Distribution et origine des souches productrices de BLSE à l'origine d'infections chez l'homme de la collection ECHANGENE (n=243)…….. 161

Figure 47. Prévalence de souches résistantes chez l'homme selon l'antibiotique considéré……. 161

Figure 48. Distribution des souches productrices de BLSE isolées des eaux usées (n=218) selon l'espèce et le point de prélèvement considéré..…..…..……...……...… 162

Figure 49. Prévalence de la résistance à différents antibiotiques parmi les souches BLSE isolées du compartiment des eaux usées selon le point de prélèvement……...… 163

Figure 50. Prévalence d'animaux présentant 1, 2 ou 3 espèce(s) d'entérobactérie productrice de BLSE……...… 164

Figure 51. Prévalence de la résistance à différents antibiotiques parmi les souches BLSE isolées du compartiment animal……...…..…..……...… 165

Figure 52. Distribution des séquences types de l'ensemble des souches séquencées selon les compartiments…..…..……...……...… 171

Figure 53. Nombre de gènes de résistance aux antibiotiques par souche et par compartiment…..… 174

Figure 54. Distribution des types de BLSE parmi la collection ENCHANGENE (n=270)…….…….. 175

Figure 55. Localisation la plus probable des gènes codants pour une BLSE dans la population d'*E. coli* (n=137)……...…….……..… 176

Figure 56. Nombre de réplicons par souches et par compartiment…….. 177

Figure 57. Prévalence d'isolats présentant les types de réplicons majoritaires…… 178

Figure 58. Nombre de gènes de virulence par compartiment au sein de la collection d'*E. coli*…...… 179

Figure 59. Distribution of 136 *E. cloacae* complex (ECC) members isolated from clinical samples.. 206

Figure 60. Maximum likelihood phylogenetic tree of clinical ESBL-producing *E. cloacae* complex (ECC) isolated between 2018 and 2019 in Guadeloupe…….... 207

Figure 61. Syntenic analysis of 5 clinical IncHI2/ST1/CTX-M-15 plasmids……. 208

Figure 62. Maximum likelihood phylogenetic tree of *E. cloacae* complex (ECC) clade L – "Taxon 4" isolated in Guadeloupe (n=19) and worldwide (n=13)…… 209

Figure 63. Répartition des principaux sérotypes d'*E. coli* BLSE dans la collection ECHANGENE... 219

Figure 64. Distribution des séquences types retrouvés entre plusieurs compartiments…….. 222

Figure 65. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des souches d'*E. coli* (n=137) BLSE isolées autour du continuum des eaux usées et en clinique…….. 223

Figure 66. Distribution des principaux schémas FAB du groupe d'incompatibilité IncF chez *E. coli*. 226

Figure 67. Types de plasmide portés par les souches BLSE…… 227

Figure 68. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance d'*E. coli* ST38 (n=16) BLSE isolées près du continuum des eaux usées et en clinique……. 231

Figure 69. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des *K. pneumoniae* complex BLSE cliniques et non-cliniques…….……...……..… 234

Figure 70. Distribution des Séquences Types (ST) des 58 *Klebsiella pneumoniae* complex séquencées selon l'origine du prélèvement…..……...……. 235

Figure 71. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance de *Klebsiella pneumoniae sensu stricto* BLSE (KP1, n=47)…..……...…….…. 236

Figure 72. Répartition des principaux sérotypes -O de KPNC dans la collection ECHANGENE…. 237

Figure 73. Distribution des schémas FAB du groupe d'incompatibilité IncF chez *Klebsiella*…… 243

Figure 74. Comparaison des assemblages..…..……...……...… 246

Figure 75. Alignement Mauve des 15 séquences plasmidiques IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTXM-15}}$……. 247

Figure 76. Comparaison BRIG des plasmides IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ avec pGENC414…… 248

Figure 77. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des plasmides IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ du projet ECHANGENE…….. 249

Figure 78. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance d'*E. coli* ST3580…… 252

Figure 79. Comparaison de l'environnement génétique autour du gène codant pour la BLSE…… 253

Figure 80. Aspect des bactéries recherchées sur le milieu chromogénique CCA…… 263

Figure 81. Diagramme de Venn représentant les gènes de résistance aux antibiotiques identifiés parmi les souches *E. coli* BLSE du projet ECHANGENE (n=99), et d'une précédente étude sur la faune sauvage de Guadeloupe (n=27)……. 267

Figure 82. Distribution mondiale de la lignée *E. coli* ST38……. 269

Figure 83. Réseaux de plasmides de type IncF isolés au Royaume-Uni……. 282

Figure 84. Présence et circulation d'animaux domestiques sur un site de traitement des eaux usées urbaines en Guadeloupe……... 291

Figure S1. Points de prélèvement de l'air et du sol au sein de la station d'épuration de Jarry Pointe-à-donne……..……...……...… 306

Figure S2. Illustrations du petit élevage de cafards……. 310

Figure S3. Nombre de cafards présentant une entérobactérie C3G-R au cours du temps…… 311

Liste des tableaux

Tableau 1. Distribution des clusters *hsp60* et des clades d'*Enterobacter cloacae* complex selon les travaux de Sutton *et al.* (mars 2020)……..……...…… 29

Tableau 2. Schéma de classification des *β*-lactamases d'après les travaux de réactualisation de Bush K. et Jacoby G. A…..……...…… 40

Tableau 3. Exemples d'outils utilisés dans l'analyse de séquences pour la prédiction plasmidique.…79

Tableau 4. Résumé de la littérature sur la capacité des stations d'épuration des eaux usées à influencer la résistance aux antibiotiques…..……...……..... 99

Tableau 5. Détails des échantillonnages non-humains et prévalence des souches productrices de *β*-lactamase à spectre étendu (BLSE)…..……...……. 167

Tableau 6. Détails des principaux antibiotypes partagés entre les compartiments……..... 168

Tableau 7. Détails des souches productrices de BLSE séquencées dans la collection ECHANGENE……. 172

Tableau 8. Nombre de séquences types par espèce et par compartiments……. 173

Tableau 9. Caractéristiques des souches BLSE de la collection ECHANGENE……... 178

Tableau 10. Analyse du polymorphisme au sein des souches humaines associées au clade C du ST131…….……...……... 217

Tableau 11. Analyse du polymorphisme au sein des souches humaines associées au ST1193…….. 217

Tableau 12. Caractéristiques des 25 souches d'*E. coli* du complexe clonal 131……. 218

Tableau 13. Répartition des souches séquencées d'*E. coli* BLSE en fonction des phylogroupes…… 220

Tableau 14. Clonalité entre isolats de différents compartiments…… 222

Tableau 15. Abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques chez *E. coli* selon le compartiment…..……...……...… 225

Tableau 16. Abondance relative des réplicons associés aux groupes d'incompatibilité plasmidique chez *E. coli* selon le compartiment (schéma PBRT)…..……...……... 227

Tableau 17. Caractéristiques génétiques des isolats d'*E. coli* présentant un réplicon de type IncHI2. 228

Tableau 18. Détails des antibiotypes des souches du ST38…..……..... 230

Tableau 19. Clonalité entre isolats de *Klebsiella* de différents compartiments…..……. 235

Tableau 20. Analyse du polymorphisme au sein des souches associées à *K. pneumoniae sensu stricto* ST307…..……...…….…….. 239

Tableau 21. Abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae* complex selon le compartiment…..……...…….. 241

Tableau 22. Abondance relative des réplicons associés aux groupes d'incompatibilité plasmidique au sein du complexe *K. pneumoniae* selon le compartiment (schéma PBRT)……. 242

Tableau 23. Caractéristiques génétiques des isolats de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KP4) présentant un réplicon de type IncHI2…..……...…….. 243

Tableau 24. Comparaison des prévalences d'animaux porteurs d'*E. coli* BLSE entre deux projets guadeloupéens (2013 – 2014 et 2018 – 2019)…..…….……...…… 266

Tableau 25. Présence d'un gène de l'opéron *terZABCDEF* dans les isolats guadeloupéens……. 283

Tableau S1. Conditions météorologiques lors des prélèvements d'air……...… 305

Travaux associés

Les travaux en lien avec cette thèse et les activités menées en parallèle au laboratoire ont fait l'objet des publications et des communications suivantes :

Articles dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture

- **Articles acceptés**

Guyomard-Rabenirina S, Reynaud Y, **Pot M**, Albina E, Couvin D, Ducat C, Gruel G, Ferdinand S, Legreneur P, Le Hello S, Malpote E, Sadikalay S, Talarmin A, Breurec S. 2020. **Antimicrobial resistance in wildlife in Guadeloupe (French West Indies): distribution of a single *bla*$_{CTX-M-1}$/Incl1/ST3 among humans and wild animals**. Front Microbiol. 11(1524):1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01524

Pot M, Guyomard-Rabenirina S, Couvin D, Ducat C, Enouf V, Ferdinand S, Gruel G, Malpote E, Talarmin A, Breurec S, Reynaud Y. 2021. **Dissemination of extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex from a hospital to the nearby environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 lineage coding for a successful IncHI2/ST1 plasmid.** Antimicrob Agents Chemother. 65:e02146-20. https://doi.org/10.1128/AAC.02146-20 **(Chapitre 3)**

Gruel G, Sellin A, Riveiro H, **Pot M**, Breurec S, Guyomard-Rabenirina S, Talarmin A, Ferdinand S. 2021. **Antimicrobial use and resistance in *Escherichia coli* from healthy food-producing animals in Guadeloupe.** BMC Veterinary Research. 17:116. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02810-3

Pot M, Reynaud Y, Couvin D, Ducat C, Ferdinand S, Gravey F, Gruel G, Guérin F, Malpote E, Breurec S, Talarmin A, Guyomard-Rabenirina S. 2021. **Wide distribution and specific resistance pattern to third-generation cephalosporins of *Enterobacter cloacae* complex members in humans and in the environment in Guadeloupe (French West Indies).** Front Microbiol. 12(628058): 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628058 **(Partie I)**

Pot M, Ducat C, Reynaud Y, Couvin D, Ferdinand S, Breurec S, Talarmin A, Guyomard-Rabenirina S. (2021). **Draft genome sequence of *Enterobacter oligotrophicus*, isolated from the microbiome of a lizard in the Caribbean.** Microbiol Resour Announc. 10:e00602-21. https://doi.org/10.1128/MRA.00602-21

- **Article en cours de finalisation**

Nosocomial extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex members in Guadeloupe (French West Indies): emerging of a novel lineage and large spread of a bla$_{CTX-M-15}$/IncHI2/ST1 plasmid (Chapitre 4)

Communications orales et posters en congrès nationaux

Communication orale sur le projet ECHANGENE lors de la journée d'échange scientifique du pôle Guadeloupe le 11 décembre 2017.

Communication orale sur les résultats de l'article **Dissemination of extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex from a hospital to the nearby environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 lineage coding for a successful IncHI2/ST1 plasmid**, lors du meeting KaruBioNet le jeudi 21 janvier 2021.

Présentation d'un poster au 15eme Congrès National de la Société Française de Microbiologie à Paris du 30 septembre 2019 au 2 octobre 2019. **Circulation of antibiotic resistance genes between bacteria from different origins** (**Annexe 2**).

Présentation de 2 posters : **Environmental reservoirs of ECC cluster VIII in Guadeloupe, French West Indies** et **Circulation of antibiotic resistance genes between bacteria from different origins**, lors du Caribbean Science and Innovation Meeting du 20 au 23 octobre 2019 à l'Université des Antilles, Guadeloupe (**Annexe 1**).

Activités d'Enseignement

Cours Master II – Biologie Santé en Milieu tropical, année 2019 : **La diffusion de l'antibiorésistance, focus sur les stations d'épuration dans un contexte One-Heath.**

Cours Master I – Biologie Santé en Milieu tropical, année 2020 : **Mécanismes de diversification génétique des bactéries.**

Mémoires de stagiaires associés à ce projet

Orlane MELICINE (L2 Biologie Université des Antilles 2019) : **Diffusion et maintien de la résistance aux antibiotiques dans un environnement anthropisé** (principaux résultats en **Annexe 5**).

Hélène RIVEIRO (M2 Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université Pierre et Marie Curie, 2018) : **Comparaison de souches d'entérobactéries multirésistantes isolées de différents biotopes et caractérisation des éléments génétiques mobiles et des gènes de résistance** (principaux résultats en **Annexe 2**).

Abréviations

AIEC	*E. coli* adhérents-invasif
ANI	Average Nucleotide Identity
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARP	Antibiotic-resistance profils
ARS	Agence régionale de santé
APEC	*E. coli* pathogène aviaire
BCP	Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol
BLSE	*β*-lactamase à spectre étendu
C3G	Céphalosporine de 3ème génération
C3G -S/-R	-Sensible / -Résistant aux céphalosporines de 3ème génération
CCA	Chromogenic coliform agar
CG / CC	Groupe clonal / complexe clonal
CHUG	Centre hospitalier universitaire de la Guadeloupe
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRO4	Ceftriaxone à 4 mg/L
CSDU	Centre de stockage des déchets ultimes
DAEC	*E. coli* à adhérence diffuse
DBO5	Demande biochimique en oxygène (mesurée au bout de 5 jours)
DCO	Demande chimique en oxygène
dDDH	digital DNA–DNA hybridization
DEAL	Direction de l'environnement, de l'aménagement et du logement
DPMT	Degenerate primer MOB typing
EAEC	*E. coli* entéro-agrégatif
EAHEC	*E. coli* entéro-agrégatif-hémorragique
ECC	*Enterobacter cloacae* complex
EH	Equivalent habitant
EHEC	*E. coli* entéro-hémorragique
EIEC	*E. coli* entéro-invasif
EPEC	*E. coli* entéro-pathogènes
ESKAPE	*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.
ETEC	*E. coli* entéro-toxinogène
ExPEC	*E. coli* pathogène extra-intestinale

FADUEG	Fédération des associations des usagers de l'eau de Guadeloupe
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FFOM	Fraction fermentescible des ordures ménagères
GMS	Gramme de matière sèche
GWAS	Genome-wide association study
hsp60	Heat-shock protein 60 (gène groEL)
ICPE	Installation classée pour la protection de l'environnement
InPEC	*E. coli* pathogène intra-intestinale
Insee	Institut national de la statistique et des études économiques
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
KP1	*Klebsiella pneumoniae* (*sensu stricto*)
KPNC	*Klebsiella pneumoniae* complex
LEE	Locus d'effacement des entérocytes
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization, time of flight
MCO	Médecine, chirurgie, gynécologie-obstétrique
MES	Matières en suspension
MLST	Multilocus sequence typing
MPF	Mating-pair formation
OGRI	Overall genome related index
OIE	Organisation mondiale pour la santé animale
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBRT	PCR based replicon typing
PLP	Protéines de liaison aux pénicillines
PMQR	Plasmid-mediated quinolone resistance
PTU	Unité taxonomique plasmidique
QRDR	Quinolone resistance-determining region
RST	Replicon typing scheme
SARM	*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
ST	Séquence type
STEC	*E. coli* producteur de shiga-toxine (**ou VTEC** pour vérocytotoxine)
STEP	Station d'épuration des eaux usées
T3SS / T4SS	Système de sécrétion de type 3 ou 4
UFC	Unités formant colonie
UV	Ultraviolet

Introduction

Le développement des résistances aux antibiotiques et l'impasse thérapeutique

Depuis leur découverte puis leur utilisation à partir des années 1940, les antibiotiques ont permis de maîtriser un large panel de maladies infectieuses d'origine bactérienne en santé humaine et médecine vétérinaire. En contrepartie, ces molécules exercent une pression de sélection qui engendre le développement et l'expansion de phénotypes résistants au sein de ces micro-organismes. Ce phénomène naturel de défense et d'adaptation des bactéries, connu dès le développement des antibiotiques, a été grandement facilité par une surconsommation et un mésusage parfois peu réglementé de ces agents antimicrobiens. Malheureusement, la découverte et le développement de molécules ont aujourd'hui fortement ralenti. Une raréfaction de nouveaux antibiotiques sur le marché devient problématique en sécurité sanitaire, car *a contrario* l'évolution de souches résistantes reste croissante et tend même à s'accélérer depuis le début des années 2000 sur l'ensemble de la planète. Ce revers de la médaille a pour conséquence de générer des hospitalisations prolongées et parfois des échecs thérapeutiques. C'est pourquoi la problématique posée par l'antibiorésistance est devenue un point important en recherche scientifique mais aussi en politique et dans les systèmes de santé, afin d'anticiper au mieux ces impasses thérapeutiques et d'éviter une catastrophe sanitaire mondiale.

L'adaptation de la population bactérienne et le partage de gènes de résistance

Les mécanismes de défense adoptés par les bactéries face aux antibiotiques sont variés et se déclinent selon différents modes d'action. En plus des mutations intrinsèques qui peuvent survenir en réponse à une pression de sélection au sein de leur environnement, les recherches actuelles ont souligné l'importance des échanges génétiques entre ces micro-organismes dans un contexte d'adaptation. Le transfert et l'acquisition de résistances se font classiquement de la cellule mère aux cellules filles. Un second mode d'échange dit « horizontal » par opposition à l'échange « vertical » peut aussi s'opérer. Dans ce cas, la bactérie qui présente une résistance spécifique va pouvoir la partager à sa descendance mais aussi aux cellules voisines par le biais d'éléments génétiques mobiles. Ces échanges complexes peuvent avoir lieu entre bactéries de différentes espèces et dans de nombreux biotopes. Les progrès technologiques et de séquençage de l'ADN permettent aujourd'hui d'étudier en détail ces flux génétiques.

Le concept One-Health

Le concept du programme « One-Health » a pour principal objectif de revoir notre façon de penser les problématiques de santé afin de les appréhender de façon plus globale. Ainsi, en plus d'une vision communautaire et clinique, la santé animale et la gestion de l'environnement sont amenées à former une seule et même entité. En effet, lorsqu'on s'intéresse aux maladies infectieuses, notre santé dépend en partie de la santé des animaux et d'un bon équilibre au sein de l'environnement qui nous entoure. Dans le cas de ce projet, de nombreuses bactéries n'ont en effet pas de frontière et les points d'échanges possibles sont nombreux entre les trois grands compartiments que sont : l'homme, l'environnement et l'animal. Ce concept peut s'appliquer aux agents infectieux ou non, et résistants aux antimicrobiens dans l'optique de préserver notre

panel de molécules. Comme le soulignent l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale pour la santé animale (OIE), « chacun a un rôle à jouer » **(1)**. L'environnement et la faune sauvage qui le compose restent peu explorés. Ces compartiments requièrent aujourd'hui une plus grande attention car ils pourraient être des réservoirs secondaires de souches multirésistantes.

Des activités humaines pourvoyeuses de résistances

Les avancées technologiques ont permis d'augmenter la qualité de vie des sociétés et d'allonger l'espérance de vie. C'est notamment le cas des procédés d'épurations des eaux usées. En effet, la bonne gestion des effluents est associée à une réduction drastique des maladies associées au péril fécal comme le choléra. Dans une optique environnementale, les systèmes de santé illustrés par les centres de soins et les hôpitaux font initialement parties des secteurs associés à la libération de bactéries multirésistantes *via* leurs effluents. Par ailleurs, à cause de l'expansion du portage de ce type de bactéries dans la communauté, les eaux usées urbaines sont aussi concernées. Les avancées technologiques actuelles ne permettent pas de supprimer totalement ces bactéries lors du traitement en station d'épuration. Le devenir des résistances dans l'environnement est aujourd'hui une préoccupation au centre de nombreux projets scientifiques. Les infrastructures associées sont considérés comme des « hot-spots » dans le maintien et le développement de résistances. Il convient donc de mieux décrire ces flux de bactéries afin de limiter au maximum une expansion environnementale.

REVUE DE LA LITTERATURE

INSTITUT PASTEUR

I. Les entérobactéries, focus sur les espèces étudiées : *E. coli*, *E. cloacae* complex et *K. pneumoniae* complex

Les *Enterobacteriaceae* font partie de la classe des *γ-Proteobacteria* et de l'ordre des *Enterobacterales*. Ce sont des bacilles à Gram –, aéro-anaérobies facultatifs et à mobilité variable selon les espèces. Les bactéries *E. cloacae* complex (ECC) et le complexe d'espèces *K. pneumoniae* (noté *K. pneumoniae* complex dans le manuscrit ; KPNC) sont considérées comme ubiquistes **(2,3)**. À l'inverse, la troisième espèce analysée : *E. coli* reste initialement un commensal du tube digestif de l'homme et de nombreuses espèces animales généralement à sang chaud **(4)**. Ces bactéries ont été isolées dans l'environnement, au niveau du sol, dans l'eau ou encore les eaux usées. On peut aussi retrouver ces germes dans la chaine alimentaire à travers les fruits et les légumes, mais aussi la viande **(5–8)**. Ce premier chapitre introduit les notions de taxonomie, de diversité et d'importance clinique pour ces 3 micro-organismes.

A) Escherichia coli

Cette première espèce reste la plus étudiée parmi les entérobactéries. Elle est notamment utilisée comme indicateur de contamination fécale récente. Sa présence dans un échantillon va en effet suggérer que d'autres micro-organismes liés au péril fécal et potentiellement plus pathogènes évoluent en même temps. Son implication centrale dans les infections chez l'homme en a aussi fait un des principaux modèles d'étude dans l'analyse du développement et de la diffusion de résistance aux antibiotiques **(9–16)**.

1. Commensalisme et pathovars

La population d'*E. coli* peut-être scindée en deux fractions, la plus importante sera considérée comme commensale. La seconde fraction correspond aux lignées pathogènes. Ces pathogènes sont généralement regroupés selon la localisation des infections et les interactions mises en place avec l'hôte. Ces infections peuvent être extra-intestinales (ExPEC) ou intra-intestinales (InPEC). On distingue généralement chez l'homme au moins 10 pathovars/pathotypes selon les syndromes que ces lignées vont engendrer et les gènes de virulence associés. Tout d'abord, parmi les ExPEC on retrouve les UPEC responsables d'infections urinaires ou encore les MNEC associées à des méningites. Les InPEC vont engendrer divers syndromes diarrhéiques **(4)** :

- Les *E. coli* entéro-pathogènes (**EPEC**) sont principalement associés à des diarrhées chez l'enfant. Ils vont entrainer la destruction des villosités intestinales grâce à la présence d'un îlot de pathogénicité permettant leur attachement sur les cellules épithéliales de l'hôte et l'effacement des lésions produites. Ce facteur d'adhérence codé au niveau du chromosome bactérien correspond au locus d'effacement des entérocytes (LEE). Un îlot similaire est identifiable chez d'autres genres comme *Citrobacter* **(17)**.

- Les *E. coli* entéro-hémorragiques (**EHEC**) sont notamment représentés par le sérotype O157:H7. Ces pathogènes possèdent le facteur d'adhérence LEE et vont sécréter une shiga-toxine (*stx*). Les infections associées aux EHEC ont généralement une origine alimentaire. En plus de diarrhées, ces infections peuvent engendrer des complications

graves comme un syndrome hémolytique et urémique. Ce syndrome est associé à la dispersion de la toxine dans l'organisme **(5,17–19)**. Les *E. coli* producteurs de shiga-toxine (**STEC ou VTEC** pour vérocytotoxine) ne présentent pas le facteur d'adhérence LEE **(20)**.

- Les *E. coli* entéro-toxinogènes (**ETEC**) vont présenter à leur surface des facteurs de colonisation « fimbriae » permettant leur adhésion à l'épithélium intestinal. Ils vont aussi produire des entérotoxines thermolabiles et/ou thermostables (ST/LT). Ce pathovar est associé à des diarrhées aqueuses que l'on retrouve typiquement chez les voyageurs **(21)**.

- Les *E. coli* entéro-agrégatifs (**EAEC**) sont responsables de diarrhées persistantes. Ces pathogènes restent phylogénétiquement très variés au sein de cette espèce. Ils présentent cependant tous une structure plasmidique semblable associée aux gènes *aaf-agg* et *aggR*. Ces derniers codent pour des adhésines fimbriales et un régulateur de la transcription. Ils vont permettre aux bactéries d'adhérer et de s'agréger à l'épithélium de l'intestin. Les adhésines fimbriales sont aussi associées à la production de biofilm et certaines lignées d'EAEC excrètent en plus des toxines **(4,22)**.

- Les infections à *E. coli* entéro-invasifs (**EIEC**) présenteront la même symptomatologie que celles associées aux lignées de *Shigella* spp. pathogènes chez l'homme (syndrome dysentérique). Ces bactéries portent un plasmide de virulence spécifique : pINV. Ce dernier présente un îlot de pathogénicité qui code notamment pour un système de sécrétion de type 3 (T3SS). Il va permettre une infection des cellules épithéliales, une multiplication intracellulaire, une diffusion vers les cellules adjacentes et la destruction des macrophages. Contrairement aux autres pathovars, les EIEC sont retrouvés uniquement chez l'homme **(4,23)**.

- Les *E. coli* à adhérence diffuse (**DAEC**) peuvent aussi être associés à des infections urinaires. Au niveau intestinal, ces pathogènes vont interagir avec les cellules épithéliales. Ils vont se lier à ces dernières par le biais d'adhésines fimbriales spécifiques. Cette liaison sera à l'origine d'une modification de la structure des cellules infectées **(4)**.

- Les *E. coli* adhérents-invasifs (**AIEC**) sont associés à des inflammations chroniques de l'intestin. Ces pathogènes sont présents en nombre dans les intestins des patients atteints de la maladie de Crohn par exemple. Ils vont adhérer aux cellules épithéliales et les envahir. Les AIEC sont aussi capables de se développer dans les macrophages. Contrairement aux autres pathovars, il n'existe pas de marqueurs spécifiques pour différencier les AIEC. Les principales lignées associées sont les séquence types (ST)95 et ST135 **(4,24)**.

2. Méthodes de typage et de caractérisation de l'espèce

Différentes approches, selon l'avancée technique, ont été proposées afin de mieux caractériser et classer les souches appartenant à cette espèce. Le but est de permettre une distinction entre les lignées pathogènes et commensales. On retrouve tout d'abord le sérotypage fondé sur les travaux de Kauffmann et généralement centré sur 2 antigènes de la structure bactérienne : -O (lipopolysaccharide, surface), et -H (flagellaire). Un troisième antigène noté -K (capsulaire) est aussi annoté pour ce schéma mais reste moins utilisé car retrouvé de manière hétérogène au sein de ce genre. On compte actuellement sur l'outil de typage *in silico* SeroTypeFinder, plus de 188 sérogroupes O et 53 épitopes H **(25)**. L'un des sérotypes les plus connus au niveau sanitaire et suivi alimentaire est l'O157:H7. Celui-ci a été initialement décrit à la fin du XX^{ème} siècle. Il a été associé à des colites hémorragiques chez des patients ayant tous consommé dans la même chaine de restaurant (EHEC). Ce sérotype, initialement retrouvé chez les bovins et les caprins, a depuis largement diffusé à travers le monde **(4,18)**.

À l'image de l'O157:H7, seul un petit nombre de sérotypes sont classiquement associés à des infections graves et des épidémies chez l'homme. Pour affiner ce typage, Karmali *et al.* ont proposé une classification plus spécifique des EHEC et des STEC. Celle-ci est fondée sur la fréquence d'implication dans des épidémies internationales et la sévérité des infections. Cette classification en séropathotypes (A à E) inclut le sérotype O157:H7 dans la classe la plus à risque d'engendrer une épidémie chez l'homme et d'aboutir à des complications graves (*i.e.* syndrome hémolytique et urémique ; séropathotype A). Les sérotypes et sérogroupes O26:H11, O103:H2, O121:H19, O111, et O145 peuvent aussi engendrer des complications mais sont généralement moins retrouvés dans des épidémies (séropathotype B). Les autres séropathotypes sont très rarement reliés à des épidémies (C et D), et le dernier comprend uniquement des souches non associées à des infections chez l'homme (E) **(20)**.

Par ailleurs, une importante infection alimentaire a eu lieu en 2011 en Allemagne avec plus de 3 300 cas. Celle-ci a été associée à une souche d'*E. coli* de sérotype O104:H4. L'analyse des syndromes types chez les patients et le séquençage des souches ont mis en évidence une lignée « hybride », et ont souligné les possibles limites de la classification par pathovars. En effet, ce pathogène présentait le gène associé à la production d'une shiga-toxine typique des souches EHEC et STEC. Cependant, aucun îlot de pathogénicité caractéristique des EHEC n'a été mis en évidence. Les isolats présentaient à la place l'opéron *aaf-agg* associé au système d'adhésion des EAEC. L'analyse phylogénétique a aussi révélé que ces isolats étaient associés aux EAEC. Pour le distinguer des autres pathovars, les auteurs de l'étude ont proposé de le nommer : *E. coli* entéro-agrégatif-hémorragique (EAHEC) **(5,19)**.

L'espèce *E. coli* peut aussi être divisée en phylogroupes (A, B1, B2, C, D, E et F) et clades (I à V), dont les principaux représentants sont distinguables par une PCR quadruplex développée par Clermont O. *et al.* **(26)**. Il est aujourd'hui admis que les souches commensales du tube digestif chez l'homme sont généralement liées au phylogroupe A. Dans une logique de continuum ce phylogroupe peut aussi être prédominant dans les eaux usées urbaines **(27–29)**. Les isolats qui proviennent du groupe phylogénétique B2 étant généralement plus virulents, ils

sont plus fréquemment associés à des infections chez l'homme et principalement extra-intestinales (ExPEC). Il en va de même pour le phylogroupe D **(4,30,31)**. Chez l'animal, sauvage ou domestique, on retrouve notamment le phylogroupe B1 **(32)**. À noter que les séropathotypes majoritaires sont aussi associés au phylogroupe B1 à l'exception d'O145 et d'O157:H7 (phylogroupe E) **(4,20)**. Cette approche de classement reste l'une des plus utilisées dans les données de la littérature jusqu'à présent. La caractérisation de ces groupes et le typage de souches permettent d'avoir une première information en ce qui concerne la génétique des populations. Ces données sont importantes à prendre en compte dans une optique épidémiologique et de recherche de réservoirs. Ainsi au Royaume-Uni, l'analyse des phylogroupes entre des souches isolées d'animaux d'élevage étaient globalement distinctes d'une seconde collection d'isolats multirésistants provenant d'infection chez l'homme **(31)**. Par ailleurs, la répartition commensale des souches d'*E. coli* reste difficile à formaliser. Elle pourrait varier selon l'hôte, le régime alimentaire, mais aussi des facteurs environnementaux, socioéconomiques, géographiques, la présence de résistances ou encore l'année des analyses **(27)**. En 2016 par exemple, des souches multirésistantes productrices de *β*-lactamase à spectre étendu (BLSE) du phylogroupe B2 étaient majoritaires chez des patients mais aussi au niveau communautaire au Cambodge. Le phylogroupe A était quant à lui principalement retrouvé chez des animaux **(6)**.

Différents schémas MLST (multilocus sequence typing) avec un degré de discrimination variable ont aussi été proposés pour classer ce genre (Michigan, Pasteur, Warwick). Ils sont fondés sur trois combinaisons différentes de gènes relativement bien conservés au sein du génome bactérien **(33)**. Ces schémas sont particulièrement utilisés dans les épidémies afin de mieux comprendre la dispersion de certaines lignées **(4)**. À ce jour, le schéma MLST Warwick compte plus de 11 000 profils (https://pubmlst.org) ! Dans une approche plus spécifique, le typage du gène *fimH* a été mis en place pour affiner les analyses clonales avant l'avènement du séquençage complet. Le gène *fimH* fait partie d'un opéron qui code pour des fimbriae. Retrouvées notamment chez les ETEC et les AIEC, ces appendices lorsqu'elles sont présentes, permettent aux bactéries de faciliter leur fixation aux tissus de l'hôte (*i.e.* facteur de virulence). Le gène associé est connu pour présenter de petites variations qui sont la base de ce typage. Cette approche complémentaire du schéma MLST s'est notamment révélée utile dans la compréhension de l'émergence et de l'évolution de lignées résistantes aux antibiotiques **(24,34,35)**.

3. Analyse par typage, le cas pratique du ST131

Parmi les isolats à l'origine d'infections extra-intestinales récurrentes chez l'homme, le ST131 fait partie des clones à haut risque ayant largement diffusé à travers le monde au début des années 2000 **(36)**. Cette lignée appartient au phylogroupe B2. Elle est associée à deux sérotypes distincts : O16:H5 et O25b:H4 **(37)**. Le sérotype O25b:H4 est aujourd'hui dominant chez l'homme au sein de ce complexe clonal. Ce ST peut être divisé en différentes lignées spécifiques distribuées en 3 clades nommés A, B et C, avec une sous-division pour le dernier clade (C0, C1, C1-M27 et C2). Comme évoqué précédemment, ce regroupement et ces sous-divisions tiennent compte du gène *fimH* et des différents allèles associés, mais aussi de la

présence de mutations spécifiques et de gènes de résistance aux antibiotiques. L'allèle prédominant pour le clade A (-O16) est *fimH41*, tandis que le clade B (-O25b) est généralement associé à l'allèle *fimH22*, et le clade C (-O25b) à *fimH30*. Les analyses approfondies de ce ST ont permis de mettre en exergue une expansion clonale de résistances aux antibiotiques et une émergence temporelle de ces clades. En effet, les deux premiers clades ne présentent historiquement que peu de résistances aux traitements, tandis que le clade C est notamment associé à des résistances aux fluoroquinolones et aux *β*-lactamines **(34)**. Les sous-groupes qui le composent sont aussi nommés *fimH30-S* (C0), *fimH30-R* (C1) et *fimH30-Rx* (C2). Les suffixes *-S* et *-R* indiquent un phénotype sensible ou résistant face aux fluoroquinolones **(38)**. Tandis que les isolats *-Rx* présentent une extension de la résistance aux céphalosporines de 3ème génération (C3G) qui sont des *β*-lactamines couramment utilisées pour traiter les infections à *E. coli*. La lignée ST131 C2 est notamment associée au gène de résistance $bla_{\text{CTX-M-15}}$, conférant la production d'une BLSE. La lignée émergente ST131 C1-M27 présente, quant à elle, une autre BLSE associée au gène $bla_{\text{CTX-M-27}}$ **(37)**. Ces gènes et leur diffusion rapide sont l'une des principales préoccupations des secteurs de soins et des organisations sanitaires.

4. Importance clinique

Cette espèce reste l'une des causes majeures d'infections en clinique. Elle est notamment la plus fréquente dans les infections urinaires. Ces infections restent cependant liées à des phénotypes non-BLSE dans la plupart des cas notamment en milieu communautaire **(13,39)**. Par ailleurs, cet agent est aussi surveillé au niveau alimentaire car il a été à l'origine de nombreuses épidémies ou toxi-infections alimentaires collectives **(18–20)**. Parmi les ST et les complexes clonaux les plus représentés chez l'homme lors d'infections extra-intestinales on retrouve en plus du complexe clonal ST131, les complexes ST69, ST73 et ST95 **(4)**. Au niveau des producteurs de BLSE se sont surtout les ST38, ST131, ST405, ST410, ST648 et ST1193 qui sont identifiés **(40)**. Il n'est cependant pas possible de clairement associer un pathovar à un phylogroupe, un ST ou à un sérotype. Plusieurs lignées distinctes peuvent présenter des caractéristiques cliniques semblables et porter les mêmes gènes de virulence rendant la classification de ces pathogènes difficile **(4)**.

En ce qui concerne le ST131, son origine reste difficile à apprécier mais il est fortement lié à l'homme. On le retrouve dans diverses infections en clinique à travers le monde, mais aussi en portage au sein de la communauté avec de nombreux gènes de résistance aux traitements antibiotiques **(31,37,41–46)**. Ce ST est aussi largement représenté dans les établissements de soins de longue durée **(36)**. Il est aujourd'hui présent dans le compartiment environnemental comme l'eau, les effluents, les fruits et les légumes **(28,41,47–49)**. Le compartiment animal est aussi représenté avec des isolats chez les animaux domestiques (compagnie et rente) **(50,51)**. Il en va de même si l'on s'intéresse au compartiment faune sauvage avec par exemple comme « indicateur » les oiseaux **(32,52,53)**. Cette circulation à l'interface entre l'homme, l'animal et l'environnement suggère une large adaptation de ce pathogène. Enfin, les nouvelles lignées continuent leur expansion comme par exemple le clade C1-M27 qui a initialement émergé au Japon au début des années 2000 et que l'on a aussi isolé en Guadeloupe dès 2013 dans des isolats de bactériémies **(43,54)**.

5. Plasticité du génome et adaptabilité

L'espèce *E. coli* est capable d'acquérir de nombreux gènes comme l'illustre l'émergence des pathovars hybrides **(4,19)**. Les analyses génomiques approfondies des différents phylogroupes ont confirmé cette importante plasticité génomique qui facilite l'adaptation de cette espèce à différents biotopes **(55)**. En effet, initialement retrouvée dans les intestins (habitat primaire), cette bactérie peut avoir une survie et une concentration limitées après excrétion *via* les fèces. D'un point de vue général, on considère que l'environnement « secondaire » est défavorable à sa survie comme c'est le cas dans l'eau, mais aussi dans l'air ou au niveau du sol. Cette caractéristique est utilisée comme indicateur de contamination fécale récente. Les facteurs qui vont influencer sa survie en dehors de son hôte peuvent être classés en 2 groupes : biotiques et abiotiques. Parmi les facteurs abiotiques ont compte notamment la température, le soleil et les radiations, la présence de matière en suspension dans l'eau, la pluviométrie, le pH, la présence de nutriment ou encore la dessiccation et la pression osmotique. Les facteurs biotiques sont la prédation exercée par d'autres micro-organismes (protozoaires, bactériophages), les phénomènes de compétitions avec la flore du milieu secondaire et la capacité de la bactérie à produire du biofilm **(56)**.

Par la mise en évidence de biomarqueurs spécifiques selon l'origine des souches d'*E. coli,* une équipe Japonaise avait évoqué la possibilité d'identifier l'origine d'une contamination fécale dans des échantillons d'eau de rivière. Ces premiers travaux de screening ont permis de souligner qu'une majorité des isolats identifiables dans leurs échantillons étaient associés à l'homme et non aux animaux. Par ailleurs cette approche restait limitée par l'exhaustivité des biomarqueurs et la capacité de cette bactérie à coloniser différents types d'hôtes. Une partie de ces souches n'avait pas pu être reliée à un hôte prédéfini, ce qui soulignait la possible présence de lignées naturalisées spécifiques de cette matrice **(57)**. Dans ces conditions, l'eau ne sert alors plus de simple véhicule et devient aussi un réservoir. L'apport de la génétique sur des collections plus importantes et des approches par association pan-génomique (genome-wide association study ; GWAS) ont permis de mettre en évidence cette capacité d'adaptation locale au sein de l'espèce dans des habitats secondaires comme l'eau **(11,55)**. Par ces observations en milieu naturel, Zhi S. et son équipe ont aussi émis l'hypothèse de développement de lignées bien spécifiques au sein des eaux usées de STEP. Celles-ci pourraient être discriminées des autres compartiments notamment par des biomarqueurs de tolérance aux traitements de désinfection qui sont utilisés **(29)**.

B) Enterobacter cloacae complex **(58)**

La création du genre *Enterobacter* date de 1960, ce dernier comprenait alors les espèces *E. cloacae* et *E. aerogenes,* renommée depuis *Klebsiella aerogenes* **(2)**. La désignation « *Enterobacter cloacae* complex » fait suite aux différents remaniements de la distribution taxonomique de ce genre associé à l'avènement de la génétique.

1. Méthodes de typage et d'identification des membres du complexe

L'identification en routine par l'utilisation de tests biochimiques conventionnels (galerie API20E), ou l'approche par spectrométrie de masse (Maldi-TOF, développée dans la section

Matériel et méthode) ne permettent pas actuellement de différencier avec certitude *E. cloacae* des membres apparentés **(2)**. Cette lacune technique engendre une sous-estimation de la diversité de ces espèces et sous-espèces ainsi qu'une mauvaise compréhension de leur épidémiologie. Une des techniques de typage développée et permettant une première différentiation des membres du complexe est fondé sur l'amplification et le séquençage partiel du gène codant pour la heat-shock protein 60 (hsp60 ; gène *groEL*). Cette méthode de typage correspond à « l'approche *hsp60* », et a été mise en place par Hoffmann H. et Roggenkamp A. Couplée à des données phénotypiques elle a permis de distinguer initialement 13 clusters génétiques formant l'ECC, dont un regroupant des séquences variables et différentes espèces (*i.e.* C-xiii) **(59)**. Cette approche par PCR est notamment utilisée dans les publications hospitalières mais pas en routine **(60–62)**. Par la suite, l'espèce *E. nimipressuralis* (anciennement cluster X) a été reclassée dans le genre *Lelliota*. Cette première classification a aussi été mise à jour puisqu'un nouveau cluster a pu être distingué (*i.e.* C-XIV) **(63,64)**. Une équipe chinoise a récemment développé une PCR multiplex avec des primers spécifiques pour 4 espèces du complexe d'importance clinique pour passer outre le séquençage de l'approche *hsp60* (*E. cloacae, E. hormaechei, E. kobei* et *E. roggenkampii*) **(65)**.

Contrairement à *E. coli* où l'utilisation du sérotypage (-O ;-H) est largement répandue dans l'analyse des épidémies, cette approche n'a que peu été exploitée pour *Enterobacter* jusqu'à présent **(25,66)**. En parallèle, le typage MLST a été quant à lui adapté pour ce genre par Miyoshi-Akiyama T. et ses collègues. Ce typage est bien plus discriminant que les PCR présentées précédemment car centré sur une combinaison de 7 gènes (*dnaA* ; *fusA* ; *gyrB* ; *leuS* ; *pyrG* ; *rplB ; rpoB*) **(67)**. Enfin, une approche innovante par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a récemment été proposée pour identifier les membres de ce complexe sans passer par des étapes d'extraction d'ADN et de séquençage. Cette approche à l'instar du MALDI-TOF permet d'obtenir en temps réel un spectre spécifique pour un isolat bactérien donné. Il découle d'une analyse de l'absorption de la lumière infrarouge de l'ensemble des composés de l'échantillon et sera comparé à une base de données de spectre IRTF de référence. En plus d'avoir une meilleure profondeur d'analyse que le MALDI-TOF, les auteurs ont mis en évidence que l'identification jusqu'à la sous espèce était possible pour ce genre, et que les spectres bactériens apparentés étaient regroupés en cluster selon leur ST. Cette approche pourrait faciliter une identification rapide d'une possible lignée épidémique et présenterait un avantage considérable notamment en clinique **(68)**.

Enfin, l'approche la plus discriminante par séquençage complet sur des sets de données plus conséquents a révélé une plus grande diversité avec 22 clades (A-V), aussi nommées espèces génomiques. Elle a aussi souligné les limites de l'approche *hsp60* pour discriminer certains clusters comme le C-xiii. Ces clades comprennent les précédents clusters comme l'illustre le **Tableau 1**, et le C-VI a été scindé en deux **(69)**. On retrouve actuellement dans ce complexe les espèces *E. asburiae, E. bugandensis, E. cloacae, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii,* et *E. roggenkampii* **(2,69)**. À noter que d'autres espèces sont regroupées dans le genre *Enterobacter* mais ne font pas partie du complexe comme par exemple *E. gergoviae* et *E. amnigenus* **(2)**. La taxonomie de ce genre est toujours modifiable par l'apport croissant de

nouveaux génomes complets sur les bases de données, et reste à harmoniser selon les approches **(70)**.

En effet, de façon générale la taxonomie et la catégorisation des espèces bactériennes est initialement liée à des caractères phénotypiques et une hybridation en laboratoire de deux ADN afin de délimiter leur affiliation. Cette approche « gold-standard » pour l'analyse de l'ADN a cependant ses limites en termes de méthodologie et a été remplacée par le séquençage complet et des analyses bio-informatiques. Ces analyses fondées sur des modèles statistiques apportent un indice de relation entre les deux génomes analysés aussi nommé « overall genome related index » (OGRI). La première méthode est « l'average nucleotide identity » (ANI) avec un index devant être ≥ 96% pour que deux génomes soient considérés comme faisant partie de la même espèce. La seconde est la « digital DNA–DNA hybridization » (dDDH) pour laquelle la valeur seuil est ≥ 70% **(71–73)**. Sans rentrer dans le détail de ces approches et les différentes formules possibles, il n'existe pas actuellement un consensus clair sur l'approche à adopter pour les assignations, et notamment la délimitation des sous-espèces **(73)**. Les premiers travaux sur les clades d'*Enterobacter* réalisés par Sutton G. *et al.* ont été effectués selon une approche de type ANI et sont utilisés actuellement dans la taxonomie présente sur la base du NCBI (mars 2020 ; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) **(69)**. Une autre publication plus récente concentre les valeurs ANI et dDDH. Cette approche serait plus robuste. Les auteurs de cette seconde étude ont proposé des réarrangements dans la classification actuelle pour les 1 960 souches du complexe identifiées sur les bases de données génomiques. En effet, les résultats de leur analyse phylogénétique suggèrent une plus grande diversité, avec plus d'espèces que les 22 clades initiaux (n=36). Ils ont par ailleurs rediscuté la désignation de sous-espèce pour *E. hormaechei* **(70)**.

2. Importance clinique et données épidémiologiques

Une identification précise de chacun des membres du complexe reste aujourd'hui primordiale afin de mieux appréhender leur potentiel infectieux respectif, et d'apporter une meilleure évaluation des épidémies, les différences régionales, et un possible tropisme infectieux spécifique **(60–62)**. En effet, le genre *Enterobacter* a pris de l'importance ces dernières années en santé humaine. Toutes les espèces apparentées font partie du groupe « ESKAPE pathogens ». Cette dénomination correspond à l'acronyme d'*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp. Les bactéries de ce groupe sont à l'origine d'infections nosocomiales et d'épidémies hospitalières multirésistantes pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients infectés **(74)**.

Les *Enterobacter* sont généralement des pathogènes opportunistes. Ils infectent notamment les immunodéprimés, et sont retrouvés dans les unités de soins intensifs et de longue durée, de grands brulés ou encore en néonatalogie avec les prématurés. Ils peuvent être à l'origine d'infections du système urinaire, de diverses plaies, du système respiratoire, d'implants orthopédiques, de bactériémie ou encore de méningite **(2,60–62,75)**. Ces bactéries peuvent coloniser les dispositifs médicaux et persister dans l'environnement hospitalier. Selon leur pouvoir pathogène elles présenteront un risque important pour les patients les plus vulnérables **(76)**.

Depuis l'avènement de la résistance aux antibiotiques des épidémies hospitalières liées à ECC ont été soulignées. *E. hormaechei* se distingue du complexe par sa prévalence dans les infections chez l'homme **(60,77,78)**. En effet, ce sont généralement les clusters *hsp60* III, VI, et VIII, associés à cette espèce que l'on retrouve (**Tableau 1**) **(60)**. Une meilleure adaptation à l'environnement hospitalier pourrait expliquer cette prévalence **(77)**. Des variations géographiques sont par ailleurs soulignées comme par exemple en Chine avec une forte prévalence d'infection à *E. kobei* (cluster II) au niveau communautaire **(61)**. L'approche MLST a quant à elle permis de souligner la diffusion de lignées spécifiques de cette espèce à travers le monde, et notamment les ST66, ST78, ST108 et ST114 **(67,79,80)**. Une autre espèce nommée *E. bugandensis* (cluster IX, clade R) présente actuellement un intérêt particulier notamment par son caractère virulent jusqu'alors peu étudié au sein du genre **(81)**. Enfin, les membres de ce complexe sont aussi identifiés en médecine vétérinaire dans divers infections à travers le monde chez des animaux domestiques mais aussi sauvages **(82–86)**.

Tableau 1. Distribution des clusters *hsp60* et des clades d'*Enterobacter cloacae* complex selon les travaux de Sutton *et al.* (mars 2020) (59,63,64,69,87). Cluster non-attribué : na ; * 2 sous-espèces d'*E. hormaechei* sont distinguables pour le cluster VI uniquement par séquençage complet ; ** le cluster xiii regroupe plusieurs espèces qui sont pour le moment non séparables par la méthode *hsp60*.

Espèce ou sous-espèce	Cluster *hsp60*	Clade associé
E. asburiae	I	J
E. kobei	II	Q
E. hormaechei subsp. *hoffmannii*	III	D
E. roggenkampii	IV	M
E. ludwigii	V	I
E. hormaechei subsp. *xiangfangensis*	VI*	A
E. hormaechei subsp. *oharae*	VI*	C
E. hormaechei subsp. *hormaechei*	VII	E
E. hormaechei subsp. *steigerwaltii*	VIII	B
E. bugandensis	IX	R
E. cloacae subsp. *cloacae*	XI	G
E. cloacae subsp. *dissolvens*	XII	H
E. cloacae complex	xiii**	na
E. quasihormaechei	XIV	S
E. mori	na	F
E. cloacae complex clade K	na	K
E. cloacae complex clade L	na	L
E. cloacae complex clade N	na	N
E. cloacae complex clade P	na	P
E. cloacae complex clade O	na	O
E. cloacae complex clade T	na	T
E. cancerogenus	na	U
E. soli	na	V

C) Klebsiella pneumoniae complex

1. Méthodes de typage et d'identification des membres du complexe

À l'instar d'ECC, l'avènement de la génétique et du séquençage complet ont permis de mettre en évidence une plus grande diversité d'espèces et de sous-espèces initialement identifiées comme *Klebsiella pneumoniae* par les méthodes classiques **(88)**. En effet on compte à ce jour 5 espèces associées au complexe *K. pneumoniae* qui sont réparties en 7 phylogroupes identifiables par analyse génomique **(3,89,90)** :

- *K. pneumoniae sensu stricto* (phylogroupe Kp1)
- *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2)
- *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp3)
- *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4)
- *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5)
- *K. quasivariicola* (Kp6)
- *K. africana* (Kp7)

KPNC présente un génome plus grand que les espèces ECC et *E. coli* (moyenne de 5,7 Mpb contre 5,0 et 5,1 Mpb respectivement) **(8)**. Il existe de nombreuses niches écologiques pour ce genre. En plus d'être retrouvées chez l'homme ces espèces sont présentes dans l'environnement (plante, rivière, sol, faune sauvage) et chez les animaux (domestiques et de rente) **(8,91–93)**. La distribution des espèces est très variable, par exemple *K. variicola* a initialement été isolée de plante et on la retrouve aussi dans l'environnement aquatique. Chez l'homme cette espèce est moins représentée comme *K. quasipneumoniae* **(3,91)**. *A contrario* la lignée *K. africana* (Kp7) n'a été retrouvée que chez l'homme en Afrique sub-saharienne pour le moment **(89,94)**. En plus de ce complexe d'espèces, on compte aussi *K. oxytoca* complex ou encore *K. aerogenes* au sein de ce genre. Elles représentent cependant moins de 5% des séquences de *Klebsiella* sur les bases génomiques actuellement **(94)**. De très rares clones sont aussi observables chez Kp1 : *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* et *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Ils restent associés à des infections bien spécifiques chez l'homme **(94,95)**.

Une précédente approche pour distinguer les principaux membres de ce complexe par rapport à d'autres espèces du genre était fondée sur les séquences de deux gènes chromosomiques *gyrA* et *parC* associées à l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV. Ces deux enzymes sont essentielles dans les processus de réplication de l'ADN bactérien. L'étude initiale soulignait déjà la présence de différents clusters au sein de ce complexe **(95,96)**. D'autres approches de typage ont été développées depuis plusieurs années et ont permis de distinguer et de suivre les souches les plus pathogènes chez KPNC. Comme pour *E. coli*, il existe des comparaisons par sérotypage. L'étude de l'antigène -K découle des travaux de l'équipe de Brisse S. Le typage de la capsule a en premier lieu été associé à l'analyse du polymorphisme d'un gène associé à la protéine liant cette structure à la surface de la bactérie (*wzi*) **(97)**. Au vu de la grande variabilité et des avancées techniques, le locus *cps* (capsule polysaccharide synthesis) qui englobe ce gène peut aussi être analysé dans sa totalité pour définir le type de capsule. Ensuite, différents sérotypes -O ont été mis en évidence grâce à l'analyse du locus *rfb* (ou O) **(98)**. Ces deux cibles font partie du logiciel de typage Kaptive développé pour KPNC,

et comme chez *E. coli* un ST peut présenter différentes combinaisons **(99)**. Au total, il est possible de distinguer actuellement plus de 80 *loci* -K et 10 *loci* -O **(94)**. En plus d'un intérêt épidémiologique certain, l'analyse de ces antigènes et notamment celui de surface pourrait être une piste dans la création de vaccin **(98)**.

Une approche MLST a également été adaptée sur une combinaison de 7 gènes spécifiques (*rpoB, gapA, mdh, pgi, phoE, infB, tonB*) **(100)**. En 2021 on dénombre plus de 5 000 schémas pour ce complexe sur la base de données BIGSdb (https://bigsdb.web.pasteur.fr). À l'image des pathovars d'*E. coli*, il existe deux types de clone à haut-risque chez KPNC : multirésistant ou hypervirulent. Par la combinaison d'une analyse MLST et la recherche de caractères spécifiques il est possible de délimiter 14 groupes clonaux (CG). Parmi ces derniers on retrouve par exemple le CG23 (ST23, ST57) chez les hypervirulents et le CG258 (ST258, ST512) chez les multirésistants **(101)**. En 2021, un impressionnant travail d'analyse de la quasi-totalité des séquences de Kp1 disponibles sur NCBI (n=9 705) a mis en évidence que l'hypervirulence reste propre à certains clones et lignées à haut risque comme les ST25, ST65 et ST86, et que ces derniers sont généralement non-multirésistants (**Figure 1**) **(90,94)**. De plus, à l'instar des séropathotypes chez *E. coli*, la majeure partie des souches hypervirulentes présentent un profil capsulaire spécifique. En effet, une première étude de séroépidémiologie a clairement mis en évidence une corrélation entre la présence de l'antigène -K2 et des infections invasives chez l'homme. L'antigène -K1 est généralement associé à une acquisition dans la communauté **(20,98)**. Ces souches hypervirulentes présentent généralement un antigène de surface de type O1 ou O2 **(3)**. Enfin, les récentes avancées techniques permettent aujourd'hui de mieux distinguer ces principaux membres par spectrométrie de masse (*K. pneumoniae* précision : 88%) **(91)**. Dans cette optique l'Institut Pasteur de Paris a proposé en 2021 un outil prometteur pour améliorer cette précision en comparant rapidement les spectres à une première base de données dédiée à ce genre (*Klebsiella* MALDI TypeR) **(102)**.

2. Virulences spécifiques et lignées hypervirulentes

La pathogénicité des souches de KPNC a largement été étudiée. La capacité à causer une infection grave dépend de la présence de différents facteurs qui ont été acquis par des transferts de gènes. Elle n'est donc pas toujours spécifique à une lignée. Un des facteurs de virulence majeurs chez les souches de KPNC pathogènes est la capacité à puiser le fer nécessaire à leur métabolisme au sein de leur environnement (hôte). Ces systèmes de capture sont les sidérophores et peuvent être sécrétés par de nombreux genres bactériens lors d'une carence en fer (ex : ExPEC). Pendant une infection, ils vont rentrer en compétition avec les mécanismes de ségrégation mis en place par l'hôte car ils présentent une plus grande affinité pour les ions Fe^{3+}. Ils vont former avec ces ions un nouveau complexe qui sera ensuite capté par le micro-organisme **(3,4,103)**. Ces différents sidérophores ont apporté un avantage sélectif dans l'expansion de certaines lignées et clades de KPNC **(104)**. Différents types de structure ont été décrits chez les entérobactéries pathogènes et correspondent notamment à l'entérobactine (Ent), l'aérobactine (Iuc), et à la yersiniabactine (Ybt) **(4,81,105,106)**. Le sidérophore Ent est retrouvé chez toutes les souches de *K. pneumoniae* et présente la plus haute affinité pour Fe^{3+} **(3)**. Cependant, les cellules de l'hôte ont mis en place des stratégies qui visent à contrer l'action de cet élément. L'une d'entre elles est la production par les polynucléaires

neutrophiles d'une protéine : la Lcn2. Cette dernière a la capacité de se lier et de séquestrer les complexes Ent–fer néo-formés. La bactérie sera alors incapable de capturer le fer de ces structures. Chez certains pathogènes, des formes alternatives d'entérobactine ont été développées pour s'adapter à cette réponse, elles correspondent aux salmochelines (Iro) **(103,106)**. La yersiniabactine n'est pas sensible à la Lcn2 tout comme Iuc. Elle est généralement codée au niveau du chromosome des *Klebsiella*, tandis que les sidérophores Iuc et Iro sont acquis *via* des plasmides spécifiques **(105,106)**. La yersiniabactine est retrouvée dans plus de 44% des Kp1 **(94)**. Les sidérophores Iuc et Iro sont aussi principalement retrouvés chez Kp1, et dans moins de 10% de cette population **(106)**. Ils sont reconnus comme d'importants prédicteurs de l'hypervirulence **(3,107)**.

Certaines lignées vont aussi produire une colibactine (clb). Ce métabolite présente une activité génotoxique. De façon générale, chez d'autres entérobactéries sa production est associée à une meilleure colonisation intestinale et une plus grande capacité de diffusion dans l'organisme **(3)**. On retrouve cet élément chez les ExPEC notamment **(55)**. Chez KPNC les ST retrouvés dans les infections hépatiques sont les principaux producteurs de colibactine. Le ST258 peut aussi être clb+, cependant dans la majorité des cas les gènes associés sont tronqués et non fonctionnels (**Figure 1**) **(94,105)**. Enfin, l'un des facteurs généralement associés au pathotype hypervirulent est le phénotype hypermucoïde. Il est le résultat de la présence d'un plasmide porteur des gènes *rmpA*/*rmpA2*. Il a été démontré que l'acquisition de pLVPK avec ces gènes régulateurs était liée à une forte augmentation de la production de la capsule et à cet aspect muqueux de ces *Klebsiella* sur la gélose (sérotype K1 ou K2) **(101,107–109)**. Ce phénotype est clairement associé à la virulence de la souche mais n'est pas toujours observable chez les souches hypervirulentes et inversement certaines souches non-hypervirulentes présentent aussi cet aspect **(3)**. Au laboratoire ce phénotype est mis en évidence par l'épreuve du « string-test » correspondant à un étirement des colonies (> 5 mm). La spécificité de ce test reste variable, un récent projet centré sur l'identification des biomarqueurs de l'hypervirulence a estimé que cette analyse apportait une précision de 0,90 (sensibilité : 0,89 ; spécificité : 0,91) **(107)**. En résumé, il existe une virulence graduelle chez les *Klebsiella*. Les souches les plus virulentes vont présenter un plasmide de virulence codant pour les gènes *rmpA*/*rmpA2/Iuc* et une insertion chromosomique du sidérophore Ybt et d'une colibactine (score 5 ; **Figure 1**) **(94)**.

3. Importance clinique et données épidémiologiques

K. pneumoniae sensu stricto (Kp1) reste le principal agent pathogène retrouvé en clinique et en portage chez l'homme **(90,110)**. Une récente revue de la littérature indique qu'il représente 85% des isolats identifiés comme KPNC **(3)**. Le portage intestinal dans la communauté varie beaucoup entre les pays et notamment en fonction du niveau socio-économique. Ce portage peut aller de 6% à plus de 60% de la population analysée selon les études **(90)**. On retrouve KPNC dans des plaies, des infections urinaires et de l'appareil respiratoire, ou encore des bactériémies **(88,92,110–112)**. La grande majorité de ces infections sont opportunistes et restent associées aux soins **(3)**. Ce membre du groupe « ESKAPE pathogens » est à l'origine d'infections nosocomiales dans des services comme la néonatalogie ou les soins intensifs, avec un risque plus important lorsqu'un portage intestinal est avéré **(74,88,113)**. Dans environ 50% des infections à KPNC le patient va, en effet, développer une

infection avec des germes associés à son microbiote intestinal **(88)**. Comme chez ECC, la production de biofilm chez ce genre permet une meilleure résistance aux traitements antibiotiques et facilite la colonisation de l'environnement hospitalier et du matériel médical. Cette caractéristique accentue le risque de circulation de souches entre patients, d'infections graves et d'épidémies dans des services **(3,92,104,114,115)**. Des lignées C3G-R à haut risque ont largement diffusé comme les ST11, ST15, ST147 ou encore ST258 et ST307. La distribution de ces dernières varie selon les régions comme l'illustre la **Figure 2 (3,90,108)**.

L'une des particularités de ce complexe en comparaison des deux genres précédents est la propension de certains groupes clonaux caractérisés comme hypervirulents à causer des abcès hépatiques à pyogène. Contrairement aux infections nosocomiales avec des germes multirésistants, les infections par des souches hypervirulentes sont rencontrées au niveau communautaire et peuvent affecter des patients en bonne santé. Elle ont été signalées à travers le monde mais le continent asiatique reste le principal foyer **(107,108,116)**. Ces infections du foie ont initialement été décrites à Taiwan au début des années 1980. Dans ces premiers cas, les abcès hépatiques ont évolué vers des complications graves (*i.e.* endophtalmie septique et cécité) **(117)**. On estime que dans plus de 10% des cas des complications de ce type peuvent survenir et le taux de mortalité a été évalué à 8,2% **(118)**. À Taiwan, l'incidence de ces infections reste l'un des plus importants dans le monde et augmente d'année en année. En effet, celle-ci était de 11,5 cas pour 100 000 habitants en 1996 et a atteint 15,45 cas en 2011. Les principaux patients infectés restent des hommes de plus de 50 ans **(117,118)**. Le diabète pourrait aussi être un facteur de risque dans ce type d'infection. En effet, une étude rétrospective de la patientèle Taiwanaise a souligné que 35% d'entre eux étaient considérés comme diabétiques **(118)**.

Aux Antilles françaises depuis 2016 et dans le reste des territoires caribéens des cas associés à ces infections graves ont été soulignés **(110,119)**. Dans des échantillons au Canada et au Royaume-Uni, la prévalence de ce type de germe était 0,9% et 5,8% respectivement parmi les KPNC **(107)**. Cette émergence dans d'autres pays à travers le monde nécessite une recherche plus globale pour identifier les possibles niches écologiques et pour mieux comprendre cette expansion **(3)**. Dans ce cadre, un important projet de prospection a été mis en place en Italie pour détecter de possibles relations entre des souches non-humaines et des infections à KPNC. Les résultats restent pour l'heure non concluants. En effet, l'équipe a souligné que parmi les échantillons environnementaux et animaux analysés, les germes très virulents étaient très rares. À l'exception de quelques souches virulentes avec un sidérophore aérobactine chez des cochons et deux autres chez des chiens, aucun autre isolat ne pouvait être considéré comme préoccupant **(91)**. La même observation avait été faite au Royaume-Uni en ce qui concerne la possible diffusion d'isolats multirésistants des animaux de rente à l'homme **(92)**. Enfin, la crainte actuelle est la possible généralisation des infections par des souches hypervirulentes et multirésistantes. Ces cas restent pour le moment sporadiques mais inquiètent beaucoup la communauté scientifique **(116)**. Pour mieux comprendre cette évolution inquiétante, de nombreuses études génomiques ont été publiées et des plateformes comme PathogenWatch (https://pathogen.watch/) ou BIGSdb-Kp permettent de centraliser les données épidémiologiques relatives aux clones hautement pathogènes et d'observer leur possible expansion **(101)**.

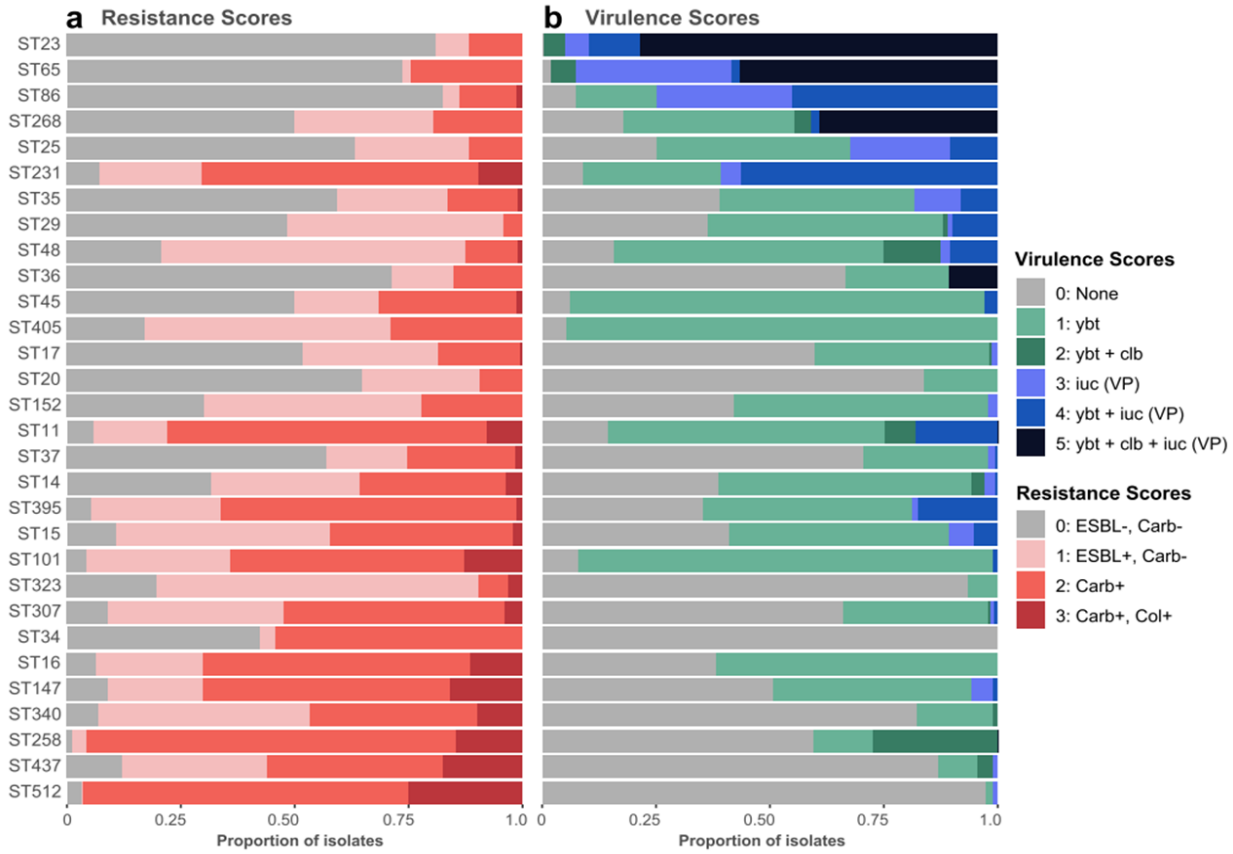


Figure 1. Distribution des scores de résistance et de virulence parmi les principales lignées de *K. pneumoniae* isolées à travers le monde (Kp1) (94). Les données présentées résument les résultats du logiciel Kleborate sur 9 705 génomes ; le nombre minimum de génomes par ST est de 50 ; ybt : yersiniabactine, clb : colibactine, iuc : aérobactine, VP : plasmide de virulence, carb : carbapénémase, col : résistance à la colistine.

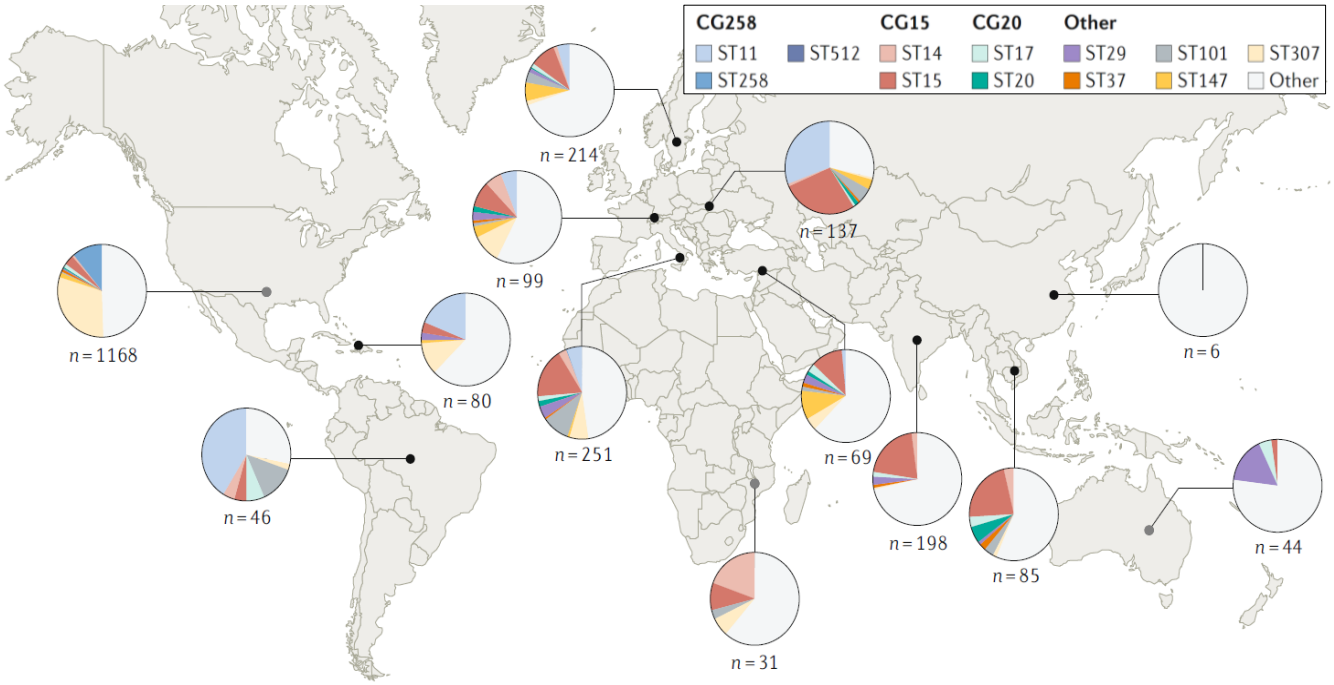


Figure 2. Distribution des principaux séquences types (ST) de *Klebsiella pneumoniae* (Kp1) résistants aux céphalosporines de 3ème génération (3). CG : groupe clonal, ST : séquence type.

II. Les antibiotiques et le développement de la résistance

A) Vue d'ensemble des antibiotiques et mode d'action

Les différentes espèces étudiées font partie de notre quotidien avec une forte proportion de commensalisme **(4)**. Elles présentent aussi un rôle majeur dans des infections plus ou moins graves en communauté et au niveau nosocomial. En plus d'une importante augmentation de la qualité de vie, le XX^{ème} siècle a aussi été associé à la découverte et la création d'un panel de molécules antibiotiques permettant de traiter de nombreuses infections autrefois mortelles **(120)**. Grâce à cette avancée majeure, les épidémies bactériennes restent aujourd'hui bien plus limitées et maitrisées **(18,19)**. En effet, il n'est plus fait mention d'épidémie dévastatrice associée à ces micro-organismes comme la deuxième pandémie de peste (*Yersinia pestis*) apparue en 1346 et qui a décimé près de 60% de l'humanité **(121)**.

Les antibiotiques sont considérés comme la base de la médecine moderne et peuvent être d'origine naturelle, semi-synthétique, ou synthétique. Ces molécules sont regroupées selon les similitudes en termes de structure chimique du composé actif mais aussi selon le mode d'action et le spectre d'activité qui en découle (large ou étroit). Elles sont considérées comme bactéricides si elles détruisent les bactéries (*β*-lactamines, fluoquinolones…). En revanche, si elles engendrent un simple arrêt de la multiplication et de la prolifération bactérienne elles seront définies comme bactériostatiques (tétracyclines, macrolides…). C'est le système immunitaire de l'hôte qui se charge alors de détruire les germes. L'efficacité d'un traitement antibiotique dépend à la fois de ses propriétés mais aussi de la réponse immunitaire du patient traité. Si l'on se concentre sur les mécanismes d'action des antibiotiques ces derniers sont généralement classés en 5 groupes selon les cibles moléculaires. Ces cibles sont spécifiques des bactéries et associées à la paroi, le génome bactérien, la membrane interne, les voies de synthèse des protéines et celles issues du folate (vitamine B9 ; **Figure 3**) **(120,122–124)**.

Parmi les classes les plus utilisées contre les infections bactériennes on retrouve les *β*-lactamines. Ces molécules se caractérisent par une structure centrale semblable (noyau *β*-lactame). Elles ont toutes le même mécanisme d'action. Elles présentent en effet une similitude structurelle avec un des composés précurseurs de la paroi cellulaire (dipeptide D-alanyl-D-alanine). Lorsqu'elles vont traverser la membrane externe de la cellule elles seront reconnues dans le périplasme par les protéines de liaison aux pénicillines (PLP) qui catalysent la formation du peptidoglycane. En détournant ces enzymes, la dernière étape de polymérisation sera bloquée ce qui va modifier l'intégrité de cette protection, arrêter la croissance cellulaire, et aboutir à la mort de la bactérie. Le spectre d'action de ces antibiotiques dépend de leur affinité avec les différentes PLP, ainsi que de leur capacité à traverser la membrane externe et la sensibilité aux enzymes de défenses pouvant être produites par la bactérie (**Tableaux 2) (123)**. On retrouve dans cette classe d'antibiotiques les dérivés de la pénicilline (oxacilline, cloxacilline, ampicilline, amoxicilline...) qui est l'une des premières molécules découvertes et synthétisées à grande échelle au début des années 1920 **(125)**. Viennent ensuite les céphalosporines de la 1ère à la 5ème génération (céfazoline, cefuroxime, cefotaxime, céfépime, ceftaroline…), les monobactames comme l'aztréonam, et les carbapénèmes (ertapénème, imipénème, méropénème…) qui présentent un spectre d'action plus large (à l'exception des deux premières générations de céphalosporine) **(123)**.

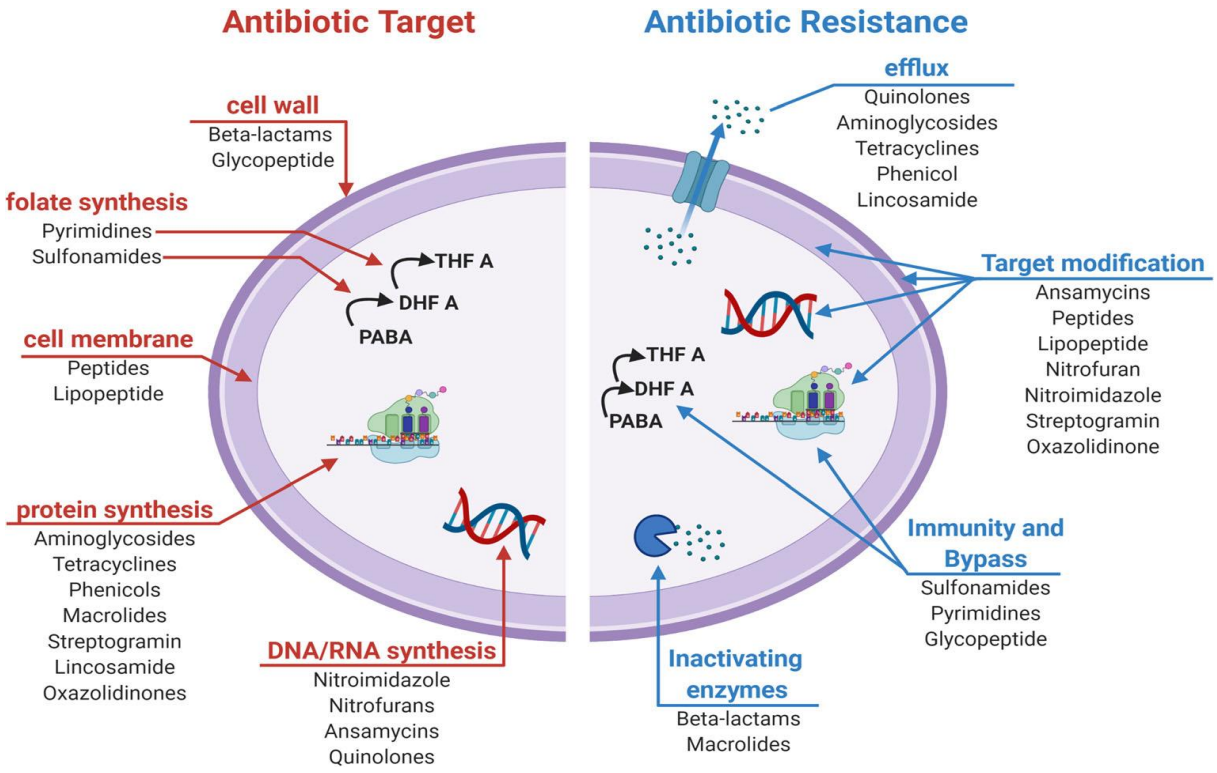


Figure 3. Principaux mécanismes d'action des molécules antibiotiques et modes d'adaptation des bactéries (120). PABA : acide 4-aminobenzoïque, DHF A : acide dihydrofolique, THF A : acide tétrahydrofolique ; figure initiale de Wright G. D. adaptée par Cardoso P. *et al.* : https://doi.org/10.1007/s12551-021-00784-y.

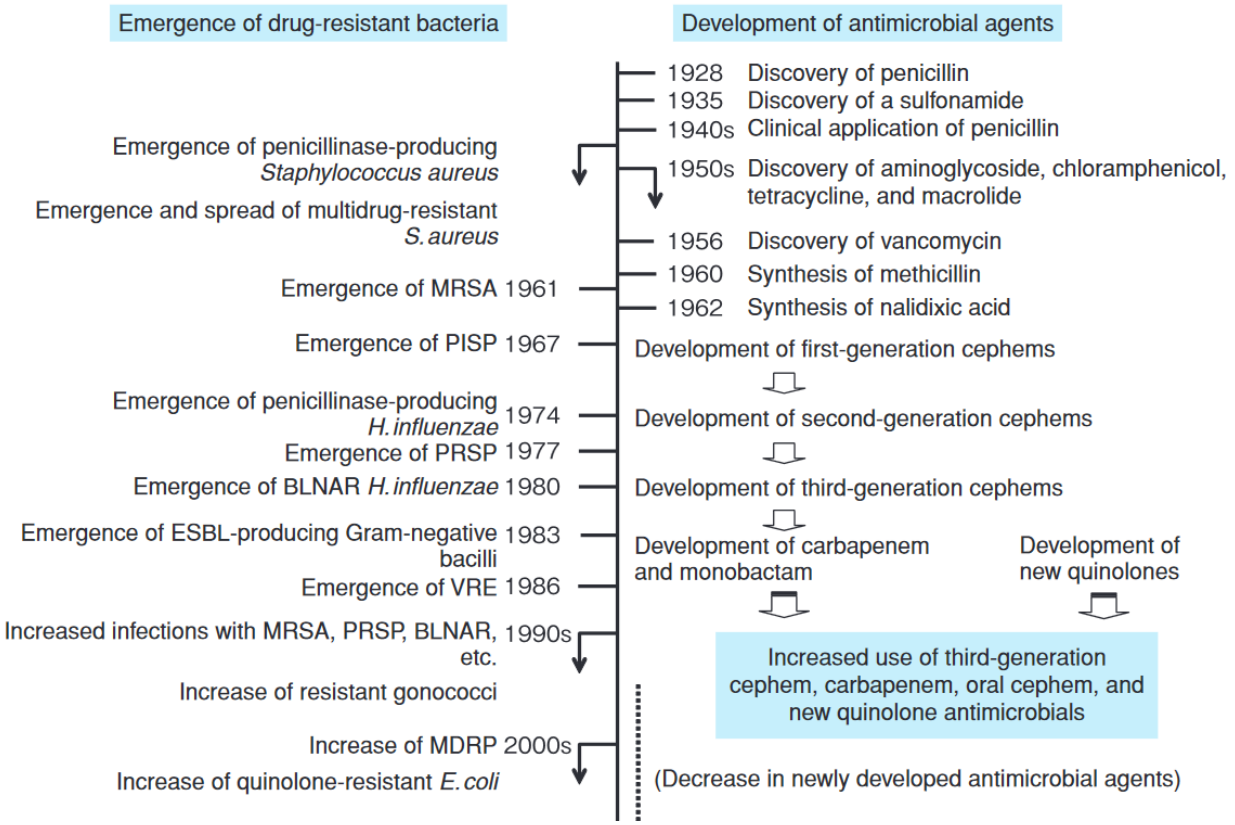


Figure 4. Chronologie du développement des antibiotiques et de l'émergence des principales résistances chez les bactéries (125). MRSA : methicillin-resistant *S. aureus* ; PISP : penicillin-intermediate-resistant *S. pneumoniae* ; PRSP : penicillin-resistant *S. pneumoniae* ; BLNAR : *β*-lactamase-negative ampicillin-resistant ; ESBL : extended-spectrum *β*-lactamase ; VRE : vancomycin-resistant enterococci ; MDRP : multidrug-resistant *P. aeruginosa*.

B) Développement des résistances et principaux mécanismes

1. Un coût humain et économique

Face à la mise en place des traitements thérapeutiques pour endiguer une infection, ces micro-organismes, quelle que soit l'espèce, ont aussi su rapidement « innover » et mettre à profit leurs ressources génétiques pour développer et diffuser des mécanismes de résistances (**Figure 4**) **(125)**. Malgré l'effort apporté dans la recherche de ces antimicrobiens qui tend à être moins prolifique aujourd'hui, le risque d'échecs thérapeutiques et d'infections longues avec des germes multirésistants est de plus en plus élevé **(74,115,116)**. L'utilisation incorrecte et excessive des molécules antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire sont les principales causes du développement et de l'accélération de ce phénomène **(126)**. Si on prend l'exemple de l'élevage, certains secteurs et pratiques sont associés à une importante consommation de molécules (intensif, filières porcine et avicole). La consommation mondiale d'antimicrobiens chez l'animal a été estimée à 63 151 tonnes en 2010. Par ailleurs, des inégalités persistent selon le niveau de développement du pays avec un cadre législatif et de surveillance des utilisations plus ou moins établies (*i.e.* restrictions, promoteur de croissance…). Cette consommation pourrait augmenter en 2030 de plus de 50% en association avec la demande croissante de protéines animales **(126,127)**. Chez l'homme, le coût de la résistance en santé humaine a été estimé à 4,6 milliards de dollars pour l'année 2017 aux Etats-Unis pour les principaux pathogènes, avec un plus fort impact des infections communautaires **(128)**. Les pathogènes les plus couteux était le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM ; 1 744 673 408 $) suivi par les entérobactéries productrices de BLSE (1 222 944 982 $; **Figure 5**). Pour l'Union européenne, l'OMS a souligné que ces résistances sont à l'origine de près de 25 000 décès par an. La « résistance aux antimicrobiens est [donc] une crise qui doit être gérée de toute urgence » **(129)**. C'est dans ce contexte posé par l'OMS que l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a publié en France une liste des antibiotiques particulièrement générateurs de résistance. Parmi ces molécules dont l'utilisation est encadrée, on retrouve l'association amoxicilline-acide clavulanique, les céphalosporines, la témocilline et les fluoroquinolones **(130)**.

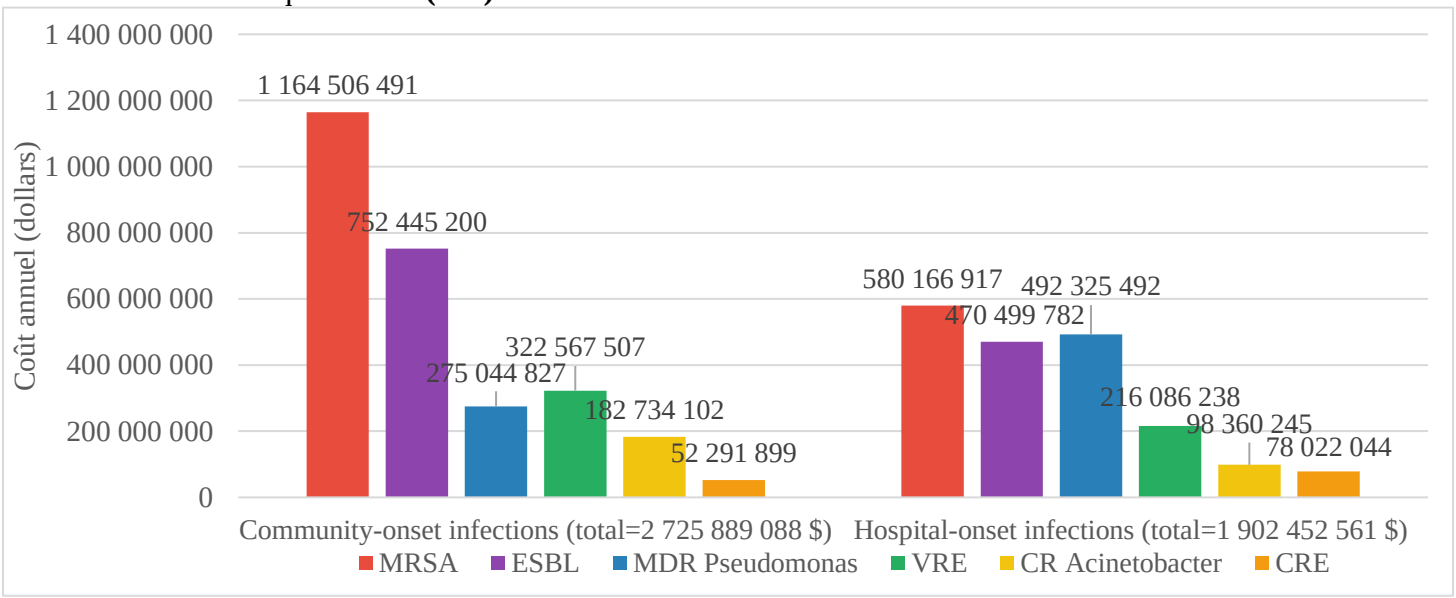


Figure 5. Estimation des coûts de la résistance aux antibiotiques aux Etats-Unis en 2017 (128).
Le total a été estimé à 4 628 341 649 $ dans l'étude ; MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ESBL : extended-spectrum *β*-lactamase, MDR : multidrug-resistant, VRE : vancomycin-resistant *Enterococcus*, CR : carbapenem-resistant, CRE : carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*.

2. Les mécanismes bactériens mis en place

L'antibiorésistance est inévitable et il n'existe pas d'antibiotique sans au moins un des mécanismes de contournement ci-dessous (**Figure 3**) **(120)**. Ces mécanismes peuvent affecter plusieurs antibiotiques d'une même classe.

L'altération de la cible de l'antibiotique est notamment décrite pour les entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones. Chez *E. coli* ou encore KPNC des modifications interviennent principalement au sein de deux gènes de structure (*gyrA* / *parC*) qui codent pour les enzymes ciblées par ces molécules (ADN gyrase / topo-isomérase IV). Ces gènes sont désignés et analysés comme étant les « quinolone resistance-determining regions » (QRDR). L'altération des enzymes bactériennes qui en découle ne modifie pas leur activité métabolique mais va limiter l'action des antibiotiques par défaut d'affinité, et aboutir à un phénotype résistant. Ce type de résistance a pris une grande importance chez les entérobactéries au début des années 2000 (**Figure 4**) **(34,94,125)**.

La modification ou la dégradation enzymatique de la molécule antibiotique est le principal mécanisme de résistance retrouvé chez les entérobactéries face aux *β*-lactamines. Les enzymes produites par les germes résistants seront présentes dans l'espace périplasmique et vont s'attaquer au noyau *β*-lactame de la molécule avant qu'elle puisse se lier aux PLP. Au total plus de 7 200 *β*-lactamases ont été référencées (BLDB ; sept. 2021 ; http://bldb.eu/). Ces enzymes de défense peuvent être différenciées selon 3 points. Il en découle 2 modes de classement : les profils substrats / inhibiteurs sont utilisés pour la classification de Bush K. (1, 2 et 3), tandis que les homologies de séquences et la structure de l'enzyme seront la base de la classification de Ambler R. P. Ces classes structurelles (A, B, C et D) seront associées à des références spécifiques. Un 4ème groupe développé par Bush K. présente des enzymes qui n'ont pas été totalement caractérisées pour le moment. Selon les protéines et les mutations associées on observe une grande variabilité dans leur spectre d'activité (**Tableaux 2**) **(40,131,132)**.

La réduction de la concentration intracellulaire (imperméabilité / pompe à efflux) découle de mécanismes variés pouvant être spécifiques à une molécule antibiotique ou non. Ils sont retrouvés chez de nombreuses espèces et ont fait l'objet d'une récente revue de la littérature pour le genre *Enterobacter* **(2)**. Les porines sont des protéines transmembranaires qui permettent l'entrée et la sortie de diverses molécules associées au métabolisme de la bactérie (nutriments…). Chez *Enterobacter* on retrouve notamment Omp35, Omp36, et Omp37 **(2)**. Des mutations spécifiques peuvent engendrer une modification structurale de ces protéines comme par exemple au niveau du gène *omp36* chez *K. aerogenes* (précédemment *E. aerogenes*) **(133)**. Ces mutations vont affecter l'activité du canal et réduire la perméabilité des bactéries aux molécules externes, empêchant ainsi certains antibiotiques d'atteindre leur cible dans la cellule. Cette première barrière peut être associée à des mécanismes membranaires d'efflux actif comme celui codé par l'opéron *oqxAB* sur le chromosome de KPNC. Cet opéron a par ailleurs été retrouvé sur des éléments génétiques mobiles chez d'autres entérobactéries dont *E. coli*. Sa transposition sur un plasmide est associée à une augmentation de son expression (×80) et une diminution de la sensibilité aux quinolones et au chloramphénicol chez les espèces autres que KPNC **(94,134)**. Enfin comme autre exemple de structure d'efflux, le gène *mdfA* code pour une protéine membranaire qui présente un plus large spectre d'action que l'élément associé à

oqxAB. Elle peut, selon son expression, être à l'origine d'une diminution de la sensibilité au chloramphénicol, aux macrolides à l'érythromycine, aux fluoroquinolones ou encore aux aminoglycosides **(135)**.

L'immunité et la modification du métabolisme est notamment associée en clinique aux résistances à la vancomycine développées par *Enterococcus*. Elles sont apparues dans les années 1980 (*i.e.* VRE ; **Figure 4**) **(125)**. Cette molécule de la famille des glycopeptides agit au niveau de la synthèse du peptidoglycane comme les *β*-lactamines. Cependant en raison de sa taille, celle-ci ne peut pas pénétrer la membrane externe des bactéries Gram – ce qui limite le spectre d'action aux Gram +. Elle n'interagit pas non plus avec les PLP mais va se fixer au niveau des extrémités dipeptide D-alanyl-D-alanine des précurseurs du peptidoglycane. Cette association va empêcher les étapes enzymatiques d'assemblage. Les entérocoques résistants vont contourner cette molécule en modifiant leur métabolisme et en synthétisant des précurseurs de la paroi légèrement différents. Ces derniers présentent à leur extrémité un D-alanyl-D-lactate ou une D-alanyl-D-sérine selon l'opéron de résistance. Ce changement ne permet pas la liaison de la vancomycine. En plus de cette altération de la cible, l'opéron présente aussi des gènes qui vont supprimer les précurseurs initiaux D-alanyl-D-alanine néoformés afin d'empêcher toute liaison avec une molécule antibiotique. Parmi ces opérons, vanA restent le plus fréquemment retrouvé et est celui qui apporte la résistance la plus forte. Il peut être présent sur le chromosome ou un élément génétique mobile **(122,136)**. Des mécanismes semblables sont mis en œuvre dans la résistance aux polymyxines chez les entérobactéries **(137)**. Enfin on trouve aussi dans ce type de résistance des mécanismes comme l'augmentation de la production de la cible de l'antibiotique. Cette augmentation a notamment été soulignée chez des souches d'*E. coli* résistantes à un traitement ciblant la voie de synthèse du folate. Le triméthoprime est un des agents qui va bloquer cette voie à l'origine des acides nucléiques. Il inhibe le fonctionnement de la dihydrofolate réductase, une enzyme qui catalyse la production de l'acide tétrahydrofolique (THF A) à partir de l'acide dihydrofolique (DHF A). Chez les souches résistantes, des mutations chromosomiques ont engendré une hyperproduction de cette enzyme (×200), qui est donc partiellement bloquée par l'antibiotique (**Figure 3**) **(124)**. Pour plus d'efficacité, cet antibiotique est d'ailleurs couramment associé au sulfaméthoxazole qui agit aussi sur cette voie métabolique en amont.

Tableau 2. Schéma de classification des *β*-lactamases d'après les travaux de réactualisation de Bush K. et Jacoby G. A. (131). AC : acide-clavulanique, TZB : tazobactam, C1G, C2G et C3G : céphalosporine de 1ère, 2ème et 3ème génération ; S : sensible, R : résistant, I/R faiblement résistant ; V : inhibition variable de l'enzyme ; la classe B de Ambler peut être subdivisée (B1, B2 et B3) selon des variations de structures de l'enzyme (amino-acide).

Classe structurelle (Ambler)	Classe fonctionnelle (Bush)	Types de *β*-lactamase	Principales enzymes associées	Inhibition AC TZB	Inhibition EDTA	Caractéristiques et principaux substrats
A (sérine active)	2a	Pénicillinase à spectre restreint	PC1	+ +	–	Pénicilline +
	2b	Pénicillinase à large spectre	SHV (-1, -11, -89) ; TEM (-1, -2, -13)	+ +	–	Pénicilline, C1G et C2G +
	2be	*β*-lactamase à spectre étendu	CTX-M ; SHV (-2, -3, -115) ; TEM (-3, -10, -26) ; PER ; VEB	+	–	2b) et C3G, céfépime, aztréonam +
	2br	*β*-lactamase à large spectre AC-R	TEM (-30, -31, -163) ou IRT ; SHV (-10, -72)	–	–	2b) et non sensible aux inhibiteurs
	2ber	*β*-lactamase à large spectre AC-I/R	TEM (-50, -158) ou CMT	(–)	–	2be) et moins sensible à l'AC
	2c	Carbénicillinases	PSE ; CARB	+	–	Pénicilline, carboxypénicilline + +
	2ce	Carbénicillinases à activité élargie	RTG	+	–	2c) et céfépime, cefpirome +
	2e	Céphalosporinase AC-S	CepA	+	–	C3G +, aztréonam –
	2f	Carbapénémase à site sérine actif	KPC ; GES ; SME	V	–	2a) et céphalosporine, carbapénème
C (sérine active)	1	Céphalosporinase (inductible)	CMY ; ACT ; FOX ; MIR ; DHA	–	–	Céphalosporine, monobactame +
	1e	Céphalosporinase à spectre étendu	GC1 ; CMY (-10, -19, -33, -37)	–	–	1) avec affinité + + oxymino-*β*-lactamamine
D (sérine active)	2d	Oxacillinase	OXA	V	–	Cloxacicline et oxacicline +
	2de	Oxacillinase à spectre étendu	Enzymes dérivées d'OXA-10 : -11, -14, -15	V	–	2d) avec affinité + + oxymino-*β*-lactamamine
	2df	Carbapénémase de type OXA	OXA -23, -51, -58	V	–	2d) + carbapénème
B (zinc dépendant)	3a	Métallo-*β*-lactamase (B1 et B3)	IMP ; VIM ; IND	–	+ +	All *β*-lactamines, monobactame –
	3b	Métallo-*β*-lactamase (B2)	CphA ; Sfh-1	–	+ +	Carbapénème +, monobactame –
–	4	Classe d'enzymes caractérisées de façon incomplète				

C) Les différents types de résistance

Les mécanismes présentés précédemment peuvent correspondre à une **résistance « naturelle »**. Celle-ci sera propre à une espèce donnée et peut résulter d'un défaut de cible ou d'accès à cette dernière. La production d'enzyme dégradant la molécule antibiotique est décrite chez certaines espèces. C'est notamment le cas pour les espèces comprises dans le complexe *E. cloacae*, considérées comme résistantes aux aminopénicillines, à l'amoxicilline + acide clavulanique ainsi qu'aux C1G et C2G. Cette résistance intrinsèque est due à l'expression d'une céphalosporinase chromosomique inductible de type bla_{ACT} **(131,138)**. Les germes *E. coli* et KPNC en sont eux naturellement dépourvus et présenteront un profil de résistance naturelle différent (http://www.sfm-microbiologie.org).

La résistance acquise est le second type de résistance et peut de nouveau mettre en jeu différents mécanismes. Elle résulte de la grande adaptabilité des bactéries et de leur vitesse de multiplication. Cette nouvelle résistance ne sera présente que dans certaines souches ou lignées, et non au sein de toute une espèce. La mutation est le premier moyen pour une bactérie d'acquérir une résistance. C'est un évènement ponctuel et aléatoire qui pourra être sélectionné au sein d'une lignée si elle permet de répondre à une pression extérieure locale. Les mutations chromosomiques sont non transférables et cibles généralement une classe d'antibiotique spécifique. C'est le cas des mutations associées aux résistances aux fluoroquinolones décrites précédemment pour *E. coli* ou KPNC (*gyrA* / *parC*) **(34,94)**. Par ailleurs des mutations affectant la structure des porines membranaires peuvent aussi engendrer une plus large gamme de tolérance face à des composés toxiques pour la bactérie **(133)**.

L'acquisition de matériel génétique exogène est le second mode de développement de nouvelle résistance. Contrairement à la mutation chromosomique qui ne sera transmise qu'à la descendance, ce type de résistance fait intervenir du matériel génomique tiers qui sera capté par la bactérie. Par exemple pour *E. coli* la première identification d'une enzyme conférant une résistance aux premières β-lactamines date de 1940 (« pénicillinase »). Cette même résistance avait été observée en culture 10 ans auparavant par Fleming et s'avérera être une céphalosporinase **(9,132)**. Parmi les résistances d'enjeu sanitaire mondial qui ont drastiquement réduit le panel d'antibiotiques initialement efficaces contre les entérobactéries on compte les BLSE **(139)**. Enfin, pour reprendre l'exemple de la résistance aux fluoroquinolones, en parallèle des mutations des QRDR ont peut observer l'acquisition de gènes spécifiques associés aux enzymes qui vont dégrader la molécule antibiotique avant qu'elle n'atteigne sa cible comme les variants de type *qnrA* et *qnrB*. Ces gènes sont désignés comme étant des « plasmid-mediated quinolone resistance » (PMQR) et sont issus de bactéries environnementales comme *Shewanella algae* (*qnrA*) **(34,43,140,141)**. Toutes ces résistances découlent majoritairement de l'acquisition d'un plasmide et selon le nombre de gènes associés à cet élément il n'est pas rare d'observer des profils multirésistants qui vont impacter plusieurs familles d'antibiotiques en même temps.

1. La résistance acquise par mutation du génome, exemple approfondi de la céphalosporinase hyperproduite chez *E. cloacae* complex

La grande majorité des céphalosporinases appartiennent à la classe C de Ambler (**Tableau 2**). Selon la séquence en acides aminés de leur site actif, ces enzymes sont dites à sérine active, ce qui permet de les différencier de la classe B des métallo-*β*-lactamases qui ont besoin d'un ion métallique, généralement Zn^{2+} pour être actives. Les céphalosporinases ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, et les enzymes du sous-groupe 1e présentent une extension de leur activité contre les C3G à la suite de différentes modifications structurelles (*i.e.* céphalosporinase à spectre étendu). Le sous-groupe 1e reste cependant très minoritaire en clinique **(44,131,132)**. Les gènes de résistance associés à la production d'une céphalosporinase sont généralement chromosomiques, mais ils peuvent aussi se retrouver sur des plasmides **(93,142)**. Selon les homologies de séquences il est possible de les relier à des espèces ou genres « ancestraux ». Ces derniers sont *Aeromonas* (CMY-1, FOX-1, MOX-1), *Citrobacter freundii* (CFE-1, CMY-2, LAT-1), *Enterobacter* (ACT-1 et MIR-1), *Morganella morganii* (DHA-1), ou encore *Hafnia alvei* (ACC-1) **(142)**. Si l'on se concentre sur le genre *Enterobacter*, l'expression de sa céphalosporinase chromosomique est naturellement faible et confère une résistance aux différentes *β*-lactamines citées précédemment (groupe 1 ; **Tableau 2**). Le mécanisme de régulation de cette enzyme est lié aux voies de recyclage de la paroi cellulaire (**Figure 6 A**) **(143,144)**. Les produits de dégradation du peptidoglycane présents au niveau du périplasme lors du développement bactérien vont passer la membrane cellulaire *via* une perméase (AmpG). Parmi les dérivés associés à cette dégradation que l'on retrouvera dans le cytoplasme il y a les 1,6-anhydromuropeptides. L'action d'une enzyme (amidase, AmpD) va permette une hydrolyse de ces composés (UDP-N-acetylmuramic acid) qui seront par la suite recyclés en tant que précurseur de la paroi. Ces deux éléments interagissent avec AmpR, qui est une protéine régulant l'expression du gène codant pour la céphalosporinase (*ampC*) **(142,143)**. Contrairement à d'autres modèles bactériens comme *Pseudomonas aeruginosa*, le mécanisme et les différentes voies de régulation de la céphalosporinase chez *Enterobacter* spp. restent encore à bien élucider. En effet, d'autres éléments précédemment identifiés chez *P. aeruginosa*, sont susceptibles d'avoir un rôle dans les voies de recyclage et de régulation (AmpH, DacB, NagZ) **(144)**. Il est cependant bien établi que ces mécanismes de recyclage du peptidoglycane sont *in-fine* associés au développement de résistance aux *β*-lactamines chez ces bactéries.

Dans des circonstances spécifiques, la bactérie présentant une céphalosporinase chromosomique peut surexprimer ce gène, ce qui va engendrer une hyperproduction enzymatique. Cette surexpression peut-être induite par une exposition à certaines molécules antibiotiques. Les aminopénicillines, les C1G et la céfoxitine sont considérées comme de puissants inducteurs, mais ils seront bien hydrolysés par la céphalosporinase. L'aztréonam et les C3G sont quant à eux considérés comme de faibles inducteurs et ne seront hydrolysés qu'en cas d'hyperproduction de l'enzyme. Les C4G n'induisent que faiblement la production d'enzyme et resteront plus stables à son action, tout comme les carbapénèmes à l'exception de l'imipenème (inducteur ++) **(145,146)**. Dans ce premier cas de figure, l'hyperproduction de la céphalosporinase est induite par effet cascade limitant l'action du mécanisme régulateur. Elle sera rapide, temporaire et réversible. Comme décrit précédemment, ces molécules inductrices vont cibler le mécanisme d'assemblage de la paroi (peptidoglycane). Cette perturbation va conduire en contrepartie à une augmentation des produits de recyclage associés aux précurseurs qui vont s'accumuler au niveau du cytoplasme de la cellule (**Figure 6 B**) **(143,144)**. L'enzyme

AmpD étant « débordée », les 1,6-anhydromuropeptides vont rentrer en compétition avec l'UDP-N-acetylmuramic acid et interagir massivement avec AmpR limitant l'effet répresseur de ce dernier **(142,143)**.

Dans un second cas de figure, des mutations dans le système de recyclage et donc de régulation sont aussi observables notamment au niveau du gène codant pour AmpD. L'enzyme modifiée ne sera plus capable de cliver correctement les produits de dégradation de la paroi, engendrant le même phénomène que lors d'une induction avec une hyperproduction de la céphalosporinase **(144)**. Par ailleurs d'autres mutations sont aussi possibles comme par exemple pour AmpR **(147)**. Le gène *ramR*, associé à la régulation de la perméabilité de la membrane et l'expression de pompe à efflux peut aussi jouer un rôle dans la résistance aux C3G et à d'autres familles d'antibiotiques lorsqu'il est affecté par des modifications **(148)**. Enfin, un récent article centré sur l'enzyme NagZ chez ECC a aussi confirmé son implication dans le système de régulation d'AmpC. Cette enzyme intervient au début de la voie de recyclage du peptidoglycane. Elle va cliver les N-acetylglucosaminyl-1,6-anhydromuropeptides en N-acetylglucosaminyl et 1,6-anhydromuropeptides. Sa surexpression peut aussi aboutir à une hyperproduction de la céphalosporinase **Figure 6 B**) **(149)**. Ces résistances associées à des mutations restent cependant spontanées, rares et transmissibles uniquement à la descendance. Au sein même d'une population bactérienne présentant une céphalosporinase chromosomique, une petite portion de celle-ci sera considérée comme mutante et résistante aux C3G. En plus d'être modeste, la prévalence de mutants reste variable selon les espèces. Elle sera par exemple plus importante chez *C. freundii*, ECC ou encore *H. alvei* ($\simeq 3\times10^{-8}$), que chez *Serratia liquefaciens* (6×10^{-10}) ou *M. morganii* (5×10^{-11}) **(150)**. Par ailleurs, cette dérépression mutationnelle stable présente un degré d'expansion bien plus faible que les germes producteurs de BLSE, car non transmissible aux cellules voisines. Peu de rapports cliniques présentent d'ailleurs des cas d'expansion nosocomiale de ce type de résistance **(75)**. De plus comme le suggèrent il a été suggéré chez *P. aeruginosa*, certaines mutations associées à cette hyperproduction engendreraient en contrepartie une limitation de la pathogénicité de ce germe. En effet, les résistances par mutation chromosomique peuvent présenter un coût biologique important pour les bactéries. Par ailleurs, le lien mutation/pathogénicité reste à confirmer pour d'autres genres au vu des mécanismes de régulations différents **(144,151,152)**.

Lors d'un traitement antibiotique pouvant être inadapté, la molécule administrée va sélectionner les mutants déréprimés préexistants. Ce n'est pas l'antibiotique qui est l'agent mutagène **(145)**. Le risque de sélection au niveau du site infectieux est variable, et il n'est pas conseillé en pratique selon le guide du CA-SFM/EUCAST, de traiter les entérobactéries de ce type avec une C3G, ou une pénicilline (http://www.sfm-microbiologie.org). Le choix de l'antibiothérapie adaptée fait par ailleurs débat et demande de bien prendre en compte le contexte de l'infection, l'espèce associée et sa réponse en laboratoire. La réponse *in-vivo* dépend aussi de nombreux autres facteurs **(143)**. Un récent article a par exemple souligné un changement important dans la composition du microbiote intestinal (commensal) chez des sujets sains après l'administration de ceftriaxone ou de cefotaxime (C3G), sans pour autant observer une augmentation de la population d'entérobactéries résistantes. Les auteurs ont suggéré un possible phénomène de compétitions intrinsèques avec d'autres familles de bactéries non sensibles qui reste à mieux étudier **(153)**.

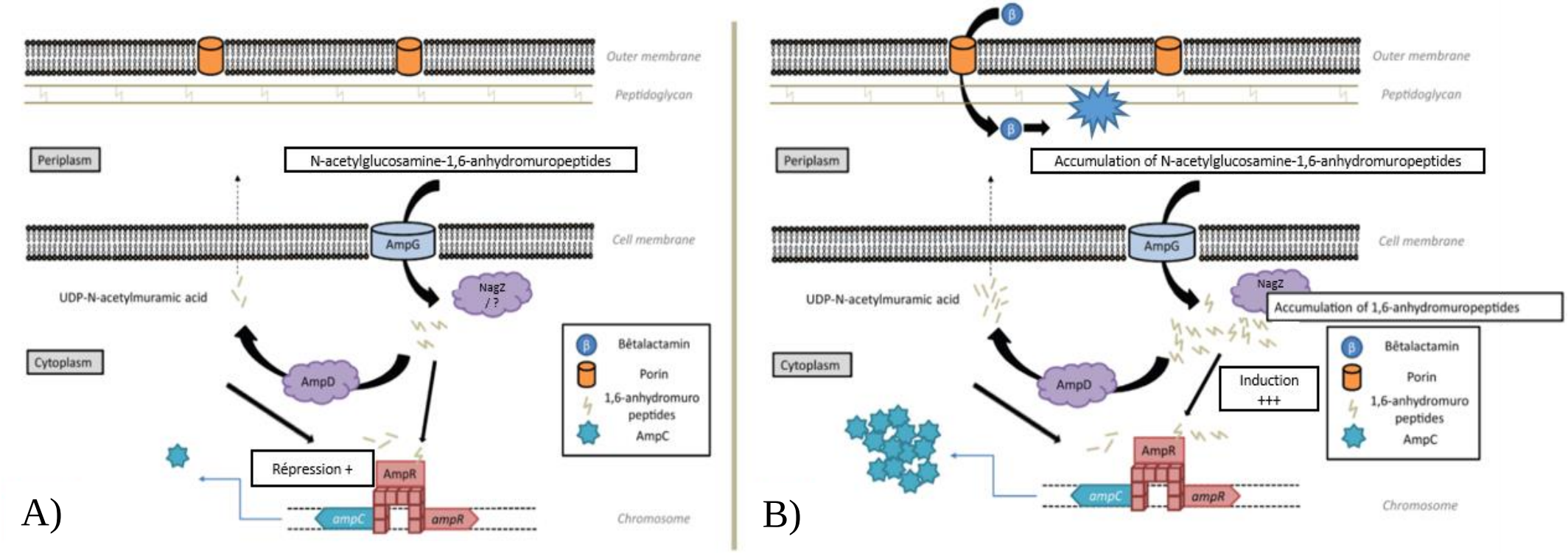


Figure 6. Représentation simplifiée du système de régulation de la céphalosporinase chromosomique (AmpC) chez *E. cloacae* complex. Schéma adapté de la revue de la littérature de Mizrahi. *et al.* et des travaux de Guérin F. *et al.* **(143,144)**, avec en **A)** la régulation normale de l'expression du gène et en **B)** la dérégulation induite par la présence d'une *β*-lactamine dans le périplasme ; certains mécanismes restent par ailleurs à mieux définir pour ces espèces (*i.e.* « ? »).

L'antibiothérapie avec une classe « supérieure » est aussi à considérer mais le risque de résistance est malheureusement possible. Il a en effet été souligné *in-vitro* une diminution de l'efficacité de la céfépime chez des mutants déréprimés des espèces ECC et *H. alvei* (résistance supérieure à 2×CMI) **(154)**. En ce qui concerne le sous-groupe enzymatique 1e, un traitement par une C4G a été relié à une sélection *in vivo* d'*E. coli* présentant une enzyme mutée ($bla_{\text{CMY-2}} \rightarrow bla_{\text{CMY-33}}$). On parle alors de céphalosporinase à spectre étendu et les souches associées en plus d'être C3G-R étaient aussi devenues insensibles à la céfépime **(44)**. Enfin, comme le soulignent différentes notes, la mise en place d'un traitement systématique par une carbapénème pour éviter la sélection de mutants risque de faciliter le développement de résistances à cet autre groupe de molécule **(145,155)**. En plus des gènes codant pour une carbapénèmase, l'accumulation de mutations dans le système de régulation d'AmpC en association avec une diminution de la perméabilité des porines engendre aussi une baisse de lza sensibilité aux carbapénèmes **(2,156)**. De récents travaux ont suggéré une nouvelle piste pour traiter les germes avec une céphalosporinase inductible. En se concentrant sur *P. aeruginosa* une équipe espagnole a pu souligner *in-vivo* (souris) l'intérêt de cibler les éléments impliqués dans le système de recyclage de la paroi cellulaire et notamment AmpG et NagZ afin de contrecarrer l'émergence de mutants déréprimés lors d'une infection en association avec un traitement aux C3G **(74,152)**.

2. La résistance acquise par transfert de matériel exogène : les BLSE et le succès mondiale des CTX-M

a) Des enzymes à large spectre d'action

Au vu du développement croissant de résistances au sein des populations bactériennes, l'OMS a listé les principaux agents qui posent des limites de traitement en clinique, et pour lesquels la recherche de nouvelles thérapies est aujourd'hui primordiale. Parmi les germes les plus critiques figurent *Acinetobacter baumannii* et *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes ainsi que toutes les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ou caractérisées comme productrices de BLSE **(139)**. Les dernières enzymes de cette liste appartiennent pour la grande majorité à la classe A de Ambler ou 2be pour Bush, et ont un important spectre d'action contre les *β*-lactamines. En effet les pénicillines, les différentes générations de céphalosporines et les monobactames sont des molécules facilement hydrolysées par les BLSE, tandis que les céphamycines et les carbapénèmes restent stables et actives. Il est par ailleurs possible d'inhiber l'action de ces enzymes par l'acide clavulanique ou le tazobactam (**Tableau 2**). Cette inhibition fait partie des critères de différenciation en laboratoire des BLSE du groupe 2be car elle laissera apparaître une synergie lors d'un antibiogramme en milieu gélosé entre un disque de C3G ou d'aztréonam et un disque avec inhibiteur **(123,131)**.

b) Les « anciennes » β-lactamases à spectre étendu

Les premières BLSE sont apparues en clinique au début des années 1980 (**Figure 4**) **(125)**. Au même titre que les céphalosporinases à spectre étendu du groupe 1e, ces *β*-lactamases sont issues d'enzymes qui présentaient initialement un spectre d'activité restreint contre les *β*-lactamines. Différentes mutations ponctuelles et des phénomènes de sélection ont engendré au fur et à mesure des variants avec une augmentation de la concentration minimale inhibitrice

d'antibiotiques clés. C'est le cas notamment des gènes de type *bla*$_{SHV}$. En effet, comme l'illustre le **Tableau 2** on retrouve le type –SHV (SulfHydryl Variable) dans 3 groupes de la classification fonctionnelle de Bush (2b, 2br et 2be) **(131)**. De façon anecdotique, un de ces variants a aussi été identifié comme ayant une augmentation de la CMI d'un antibiotique de type carbapénème (*bla*$_{SHV-38}$). Cette résistance a cependant été récemment rediscutée **(94,157,158)**. Une importante revue de la littérature a souligné qu'il existerait plus de 189 variants enzymatiques dans cette famille, mais seulement 90 ont été totalement caractérisés. Parmi ces derniers, 46 gènes *bla*$_{SHV}$ ont été associés à un phénotype de type BLSE (2be) **(159)**. Il n'existe pas de consensus sur une origine spécifique de ces enzymes, la plus probable serait KPNC (précurseur de *bla*$_{SHV-1}$). Ce complexe d'espèces est aussi le plus retrouvé parmi les isolats BLSE SHV+ **(159,160)**. Au sein d'une large collection de ce complexe, ce gène muté représentait environ 10% des isolats **(94)**. Une récente étude a analysé les mutations répertoriées à l'origine de l'augmentation de leur spectre d'action. Par une reconstruction de mutants elle a souligné que les positions 238 et 179 sont les principales zones de mutations associées à un phénotype de type BLSE **(158)**. Le plus grand nombre de mutations a été retrouvé pour le gène *bla*$_{SHV-128}$ (n=6) **(159)**. Parmi les isolats BLSE de ce type, les gènes *bla*$_{SHV-2/-2a}$, *bla*$_{SHV-5}$ et *bla*$_{SHV-12}$ sont les plus fréquemment identifiés. Par ailleurs l'importance des autres variants alléliques pourrait être sous-estimée en clinique car ils sont généralement associés à d'autres enzymes conférant le même phénotype **(158,159)**.

Une évolution similaire a été observée pour les gènes de type *bla*$_{TEM}$ avec différentes substitutions à partir de TEM-1 et TEM-2 (nom du premier patient : TEMoneira). En 2010 on comptait plus de 70 variants 2be dans cette famille **(131)**. En ce qui concerne *bla*$_{TEM-1}$ les principales mutations sont associées aux positions 104, 164, 238 et 240. Elles sont reliées à une région importante de l'enzyme qui permet son activité d'hydrolyse (Ω-loop) **(161,162)**. En laboratoire, il a été démontré que ces changements subtils sont à l'origine d'une augmentation jusqu'à plus de 256 fois de la CMI initiale selon les allèles et l'antibiotique testé. La ceftazidime, le cefotaxime et le ceftriaxone facilitent le développement rapide d'enzyme de type 2be à partir de *bla*$_{TEM-1}$ **(162)**. La dernière mise jour de la classification de Bush *et al.* a aussi souligné l'existence de quelques enzymes de cette famille capables de conférer un phénotype BLSE tout en étant moins sensible à l'action de l'acide clavulanique. Cette classe est la 2ber et correspond au « complex mutant TEM » (CMT). Ces enzymes se différencient des –TEM de type 2br qui sont très résistantes aux inhibiteurs mais non BLSE (« inhibitor-resistant TEM » ou IRT ; **Tableau 2**) **(131,161)**. En clinique, il a été mis en évidence que des traitements sur une courte période (ceftazidime ; 1 semaine) pouvaient sélectionner *in vivo* des variants *E. coli* CMT+ (*bla*$_{TEM-158}$) à partir d'isolats initialement caractérisés comme IRT+ (*bla*$_{TEM-35}$). Cette différence de phénotype est le résultat d'une accumulation de mutations : M69L + N276D puis R164S. Par ailleurs, l'apparition *in vitro* de ces mutants à partir d'une souche IRT+ reste faible et a été estimée entre 10^{-9} et 10^{-10} **(161)**. Il n'y a pas de gène *bla*$_{SHV}$ conférant un type 2ber **(131)**. Enfin, en comparaison des –SHV et –TEM, d'autres enzymes ont été caractérisées dans le groupe 2be mais sont beaucoup moins fréquentes et généralement associées à une région spécifique du monde ou quelques espèces. Elles sont dites « mineures » et sont codées par les gènes *bla*$_{BEL}$, *bla*$_{BES}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{SFO}$, *bla*$_{TLA}$, *bla*$_{PER}$ ou encore *bla*$_{VEB}$ (**Tableau 2**) **(131)**.

Quelques enzymes de la classe D de Ambler ont aussi été caractérisées comme BLSE. Ces enzymes sont des oxacillinases et ont initialement une forte activité contre l'oxacilline et la cloxacilline (pénicillines M). Selon les variants il est possible d'observer une faible inhibition par l'acide clavulanique (**Tableau 2**) **(131)**. Comme –TEM et –SHV leur spectre d'action a augmenté grâce à différentes mutations. Cette famille reste cependant bien plus hétérogène en matière d'activité d'hydrolyse. Les oxacillinases à spectre étendu sont capables de conférer une résistance aux C3G, et elles dérivent notamment du gène *bla*$_{\text{OXA-10}}$. Ces BLSE de type 2de sont associées à *P. aeruginosa*. Le premier isolat clinique chez cette espèce date de 1991 en Turquie (*bla*$_{\text{OXA-11}}$) **(163)**. Ce type de germe résistant a aussi été retrouvé dans des épidémies hospitalières en France métropolitaine au début des années 2000 (*bla*$_{\text{OXA-19}}$, *bla*$_{\text{OXA-28}}$) **(164)**. La présence d'enzymes 2de chez des entérobactéries reste moins fréquente **(131)**. Il a notamment été fait mention d'une souche de *Salmonella enterica* portant un gène *bla*$_{\text{OXA-53}}$ au Brésil et associé à une importante augmentation de la CMI pour la ceftazidime **(165)**. Un plasmide de type IncHI2 avec un gène *bla*$_{\text{OXA-53}}$ a aussi été retrouvé chez des ECC aux Etats-Unis **(86)**. Cette première énumération d'enzymes montre bien tout le génie bactérien mis en place pour s'adapter en continu aux traitements antibiotiques à base de *β*-lactamines (**Tableau 2**).

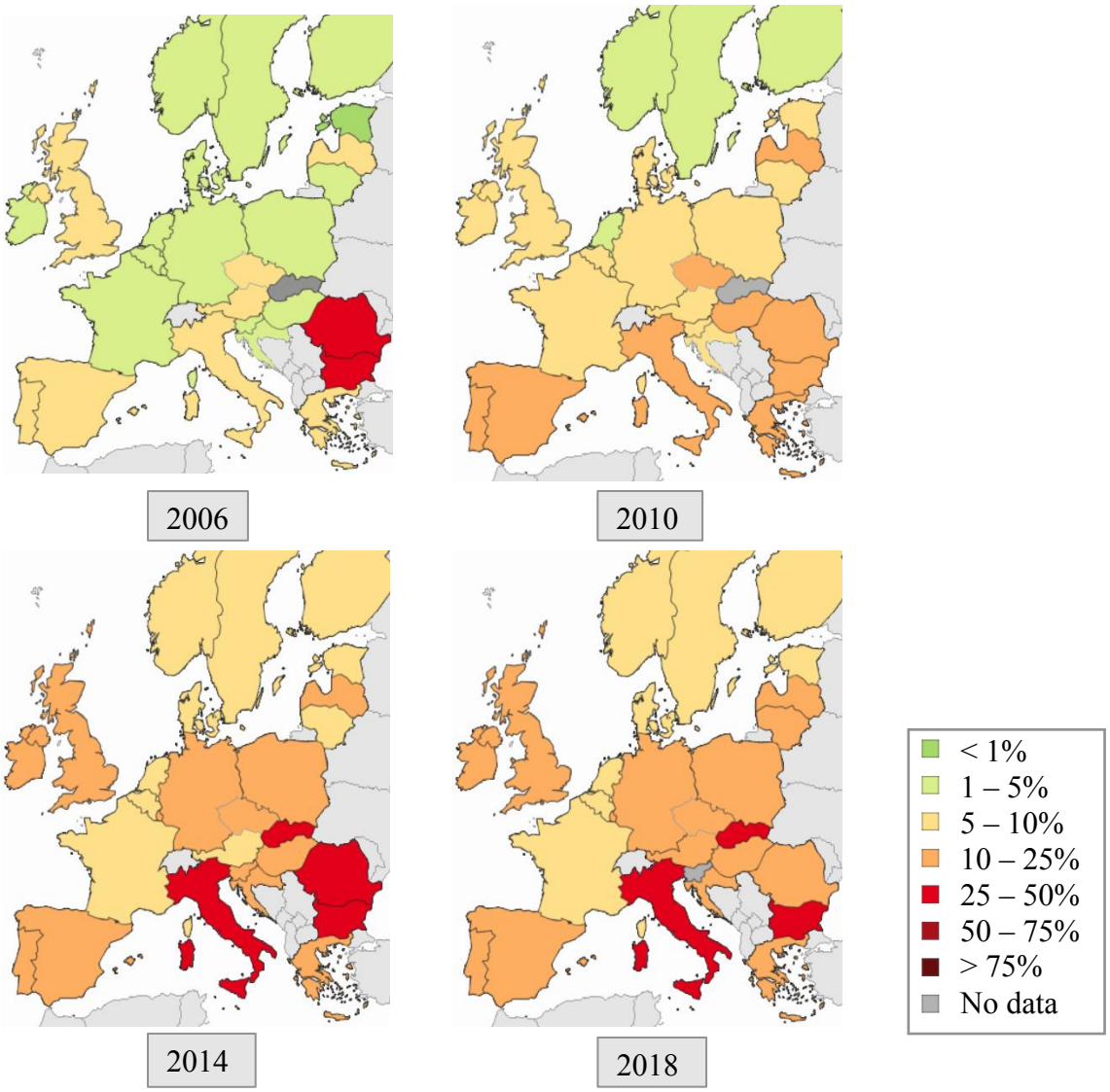


Figure 7. Evolution des données de surveillance des souches d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3$^{\text{ème}}$ génération en Europe en secteur hospitalier. Les prévalences nationales sont basées sur des isolats invasifs (sang, LCR) ; ces entérobactéries sont productrices de BLSE dans la majorité des cas ; les cartes sont issues du site de surveillance EARS-Net (https://atlas.ecdc.europa.eu/).

c) Les « nouvelles » β-lactamases à spectre étendu

Les principaux représentant actuels des BLSE de type 2be sont les gènes de la famille *bla*$_{\text{CTX-M}}$ **(166–168)**. Les enzymes associées ont largement supplanté les « anciennes » BLSE notamment en clinique **(169)**. La première publication d'une infection chez l'homme avec un germe CTX-M + date de 1989 à Munich (*E. coli*). L'auteur décrivait dès cette époque le portage par un plasmide et la possibilité d'une diffusion importante de cette résistance. La souche en question était résistante à la majorité des *β*-lactamines dont les C3G (surtout la CéfoTaXime) et à l'aztréonam (monobactames) **(170)**. Contrairement aux oxacillinases 2de, les CTX-M restent majoritairement associées aux *Enterobacteriaceae* **(168)**. Quelques cas sporadiques indiquent l'acquisition de ces gènes en dehors de cette famille comme par exemple chez *Acinetobacter* (*Moraxellaceae*) **(171)**. D'un point de vue phylogénie et classification, ces enzymes de la classe A de Ambler sont divisées en 5 groupes selon les similarités de séquence (1, 2, 8, 9, 25). Il est aujourd'hui admis que les CTX-M proviennent initialement des espèces du genre *Kluyvera* (**Figure 9**) **(131,168)**. Cette entérobactérie retrouvée principalement dans l'environnement présente en effet une *β*-lactamase chromosomique. L'analyse de la structure et de l'environnement de ces gènes a souligné jusqu'à 100% d'identité pour certains groupes avec le chromosome de l'espèce *K. ascorbata* (groupe 1 et 2) **(172)**. La même observation a été faite pour *K. georgiana* (groupe 8 et 9). Leur mobilisation par d'autres genres bactériens découle de l'action d'éléments génétiques mobiles et a bien été décrite en laboratoire **(173)**. Par ailleurs, il a récemment été découvert que *K. georgiana* serait aussi le progéniteur du gène *fosA3* qui confère une résistance à la fosfomycine chez de nombreuses autres entérobactéries **(174)**.

À l'image de l'Europe en **Figure 7**, une diffusion équivalente à une pandémie mondiale de ces « nouvelles » BLSE est décrite depuis le début des années 2000. Il est aussi possible d'observer des variations géographiques avec différentes combinaisons de gènes (**Figure 10**) **(14)**. Cette diffusion engendre une large diminution du panel d'antibiotiques et des traitements efficaces puisque les souches qui produisent ces enzymes sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques. En 2009 ont comptait 90 enzymes de ce type. Il y en aurait aujourd'hui plus de 220, ce qui est bien plus important que les 46 –SHV 2be **(40,131,159)**. Les CTX-M des groupes 1 et 9 restent les plus représentées avec notamment les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$, et *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (**Figures 9 et 10**) **(14,168)**. Chez l'homme, ces résistances sont initialement liées au secteur hospitalier et à des infections **(170)**. Les espèces *E. coli* et KPNC sont les principaux germes producteurs de ces BLSE **(168)**. Ces enzymes sont aussi retrouvées en portage chez les patients avec un risque de colonisation variable selon les services, mais généralement temporaire lors des séjours (≃ 4 semaines à plusieurs mois) **(36,153,175,176)**. Par le déplacement des patients ces souches peuvent se retrouver dans d'autres services **(177)**. Ce portage présente un risque supplémentaire en raison de la fragilité de nombreux patients **(74)**. Le suivi du portage reste cependant difficile à mettre en place après une hospitalisation et de nombreux facteurs peuvent l'allonger comme la prise d'un traitement ou des comorbidités importantes **(175)**. L'espèce impliquée peut aussi faire varier cette durée de colonisation, tout comme l'élément génétique mobile associé à la résistance. En effet, de récents travaux de suivi focalisé sur KPNC ont souligné la possibilité d'une durée de portage beaucoup plus longue de

lignées multirésistantes chez certains patients. Ce portage avait une durée de 2 à plus de 4 années et était le résultat d'une adaptation *in-vivo* du pathogène **(115,178)**.

En raison du caractère entérique de ces germes et de ce portage extensible, une large expansion dans la communauté est d'ores et déjà constatée. Ces germes BLSE peuvent être à l'origine d'infections au sein des ménages comme la lignée *E. coli* ST131 **(51,61)**. Par ailleurs, en 2016 il a été estimé qu'environ 14% de la population mondiale en bonne santé au niveau communautaire étaient colonisés par des souches d'entérobactéries productrices de BLSE (type CTX-M notamment). Ce pourcentage participe au succès de la propagation de ces germes. Ces chiffres restent très variables selon les régions du globe (Nord < Sud), industrialisées ou en voie de développement, avec un maximum retrouvé en Asie (22 – 46% ; **Figure 8**) **(167)**. Ce portage asymptomatique est considéré comme étant la « partie immergée de l'iceberg » car difficile à apprécier et à endiguer. Hors contexte clinique, l'homme est donc devenu un des réservoirs de bactéries résistantes, pathogènes ou non. Une diffusion silencieuse s'opère au sein de la communauté et tend à augmenter chaque année (+ 5,38%) **(167)**. Au Pays-Bas par exemple, il a été estimé qu'environ 2/3 des portages communautaires de souches d'*E. coli* C3G-R seraient liés à des transmissions interhumaines **(166)**. Cette transmission d'homme à homme reste cependant à nuancer et pourrait aussi varier selon les régions, la densité de population, les normes d'hygiène ou le contexte socio-économique. À une autre échelle, les voyages intercontinentaux ont aussi été pointés comme facteur d'expansion ces dernières années, avec un risque plus accru d'acquisition selon les destinations, Asie en tête (**Figure 8**) **(167,179)**. Une colonisation digestive par de tels germes après un voyage peut persister pendant plusieurs mois et comme mentionné précédemment être transmise dans les ménages de manière secondaire **(179)**.

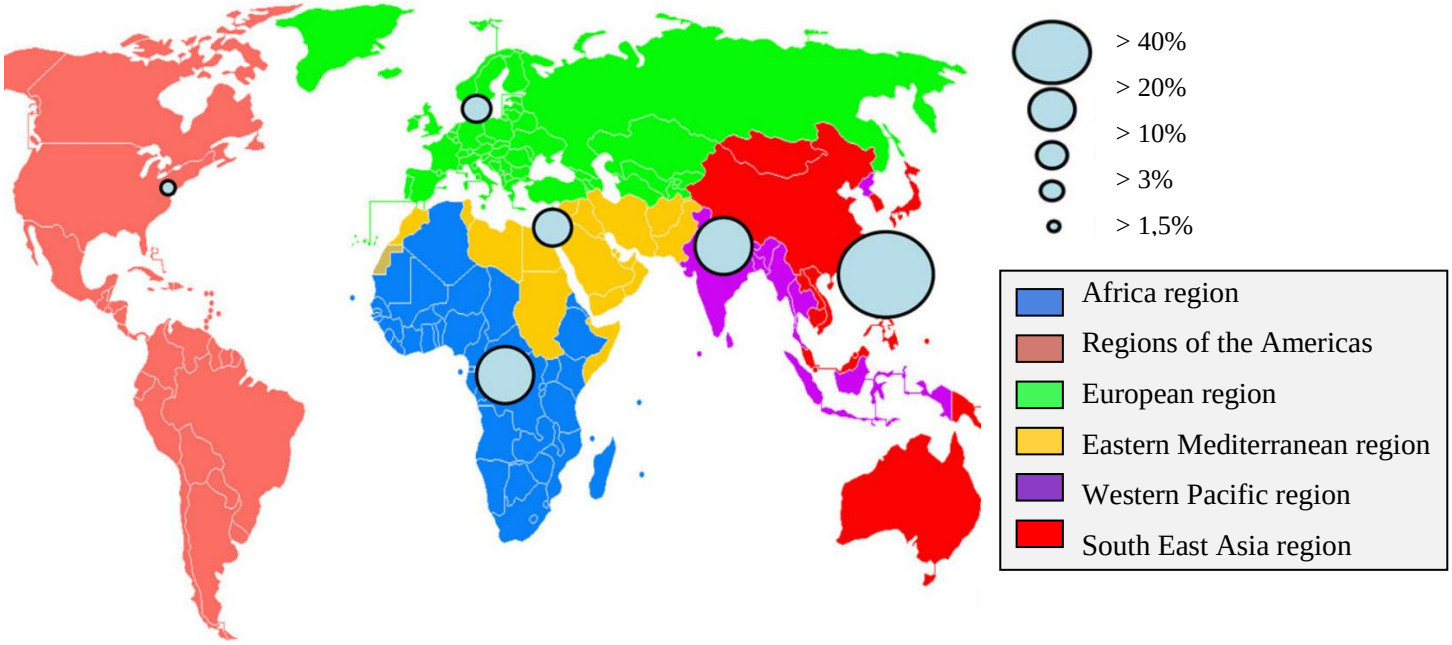


Figure 8. Prévalence de la colonisation fécale par des entérobactéries productrices de BLSE au sein de la population générale (2015) (167). Les cercles sont associés à un taux de colonisation chez des individus bien portant dans une région donnée. Les enzymes prises en compte dans l'étude sont uniquement associées à la classe A de Ambler (2be).

L'homme n'est pas le seul à présenter des souches multirésistantes. De par ses activités il a en effet disséminé ces germes résistants dans l'environnement. Des souches d'*E. coli* productrices de BLSE dont le ST131 ont par exemple été retrouvées dans des zones polaires près de différentes bases scientifiques et considérées comme relativement préservées (Antarctique ; *bla*$_{\text{CTXM-1}}$ et *bla*$_{\text{CTXM-15}}$) **(47)**. Si l'on s'accorde à utiliser les globes trotteurs comme de possibles « sentinelles et disséminateurs », les points de contamination peuvent être très nombreux. Seul le séquençage complet des génomes bactériens, plus résolutif que les techniques évoquées dans d'autres parties (*i.e.* PFGE, sérotype, MLST…) apporte les premiers éléments de réponse en termes de relation phylogénétique. Une récente étude a en effet pu mettre en évidence une acquisition d'*E. coli* BLSE (*bla*$_{\text{CTXM-15}}$) chez des voyageurs Suisses de retour de Zanzibar. Ces *E. coli* étaient très proches de souches isolées au sein de la population locale mais aussi d'animaux et de viande de poulet (≤ 20 SNV) **(180)**. La difficulté rencontrée actuellement et pointée par de nombreuses études semblables, est la généralisation des réservoirs d'entérobactéries multirésistantes.

Les facteurs de risques d'acquisition ne sont cependant pas toujours simple à identifier selon les résistances **(90)**. Par exemple, les germes résistants peuvent transiter par l'alimentation. Cette voie peut grandement favoriser le portage digestif et l'entretien de ces germes au sein de la population selon les modes de consommation adoptés **(5–7,48,166,180)**. Il est aussi possible de retrouver différents types d'enzymes BLSE chez les animaux domestiques (de rente ou de compagnie), dans les produits alimentaires, l'eau et les sédiments, les fruits, les légumes, mais aussi au sein de la faune sauvage jusque dans des régions très reculées **(5,12,43,50,159,166,181–184)**. De fait, l'exposition de l'homme est envisageable à des degrés différents *via* de nombreuses interfaces à travers le globe et l'acquisition de germes BLSE n'est plus seulement liée à un contexte nosocomial ou interhumain **(166)**.

L'un des compartiments les plus étudiés sur le sujet reste les animaux de rente. Comme énoncé précédemment, l'utilisation des molécules antibiotiques au niveau vétérinaire reste très importante **(127)**. Comme chez l'homme, les traitements antibiotiques vont influencer le portage et l'excrétion de germe BLSE chez les animaux **(185)**. Ces résistance ont été retrouvées en élevage et jusqu'à la chaine de découpe en abattoir et au sein des produits finaux (*i.e.* viandes) **(7,186)**. Des différences de gènes sont par ailleurs soulignées selon les biotopes avec par exemple *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$, généralement plus retrouvé chez les animaux que *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (homme) **(15,50,187,188)**. Les études phylogénétiques ou « d'épidémiologie moléculaire » sur d'importantes collections entre ces différents types d'hôte ou d'échantillon restent cependant primordiales pour confirmer ou infirmer ce lien. Des transmissions entre les fermes ont par exemple été soulignées **(92)**. Par ailleurs, les études menées par Ludden *et al.* citées précédemment ont conclu à une compartimentation des germes *E. coli* et KPNC BLSE entre des prélèvements hospitaliers et les animaux de rente au Royaume-Uni **(31,92)**.

En résumé, la situation actuelle de pandémie mondiale des BLSE de type CTX-M est associée à 3 types d'évènements :

1) L'utilisation de traitements parfois inadaptés facilitant les mutations et l'expansion d'enzymes toujours plus résistantes.

2) La dissémination et le succès de « clones épidémiques » qui vont porter ces gènes entre les pays et les compartiments comme décrit pour *E. coli* ST131.

3) Le transfert horizontal au sein des différentes espèces d'entérobactéries d'éléments génétiques mobiles dont des « plasmides de résistances épidémiques » généralement porteurs de nombreux gènes de résistance.

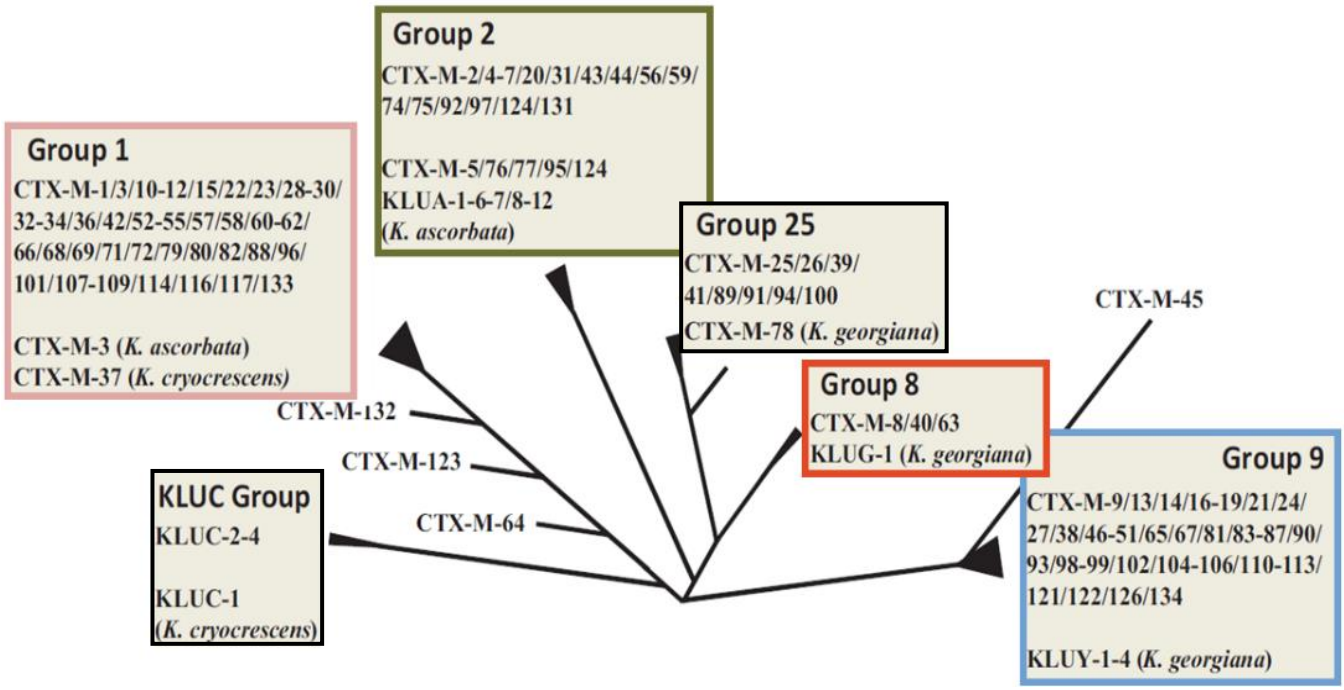


Figure 9. Arbre phylogénétique représentant la similarité des gènes de type CTX-M. Arbre adapté de la revue de la littérature de D'Andrea *et al.* **(168)** ; les principaux groupes sont associés avec les précurseurs les plus probables parmi le genre *Kluyvera* par alignement des séquences.

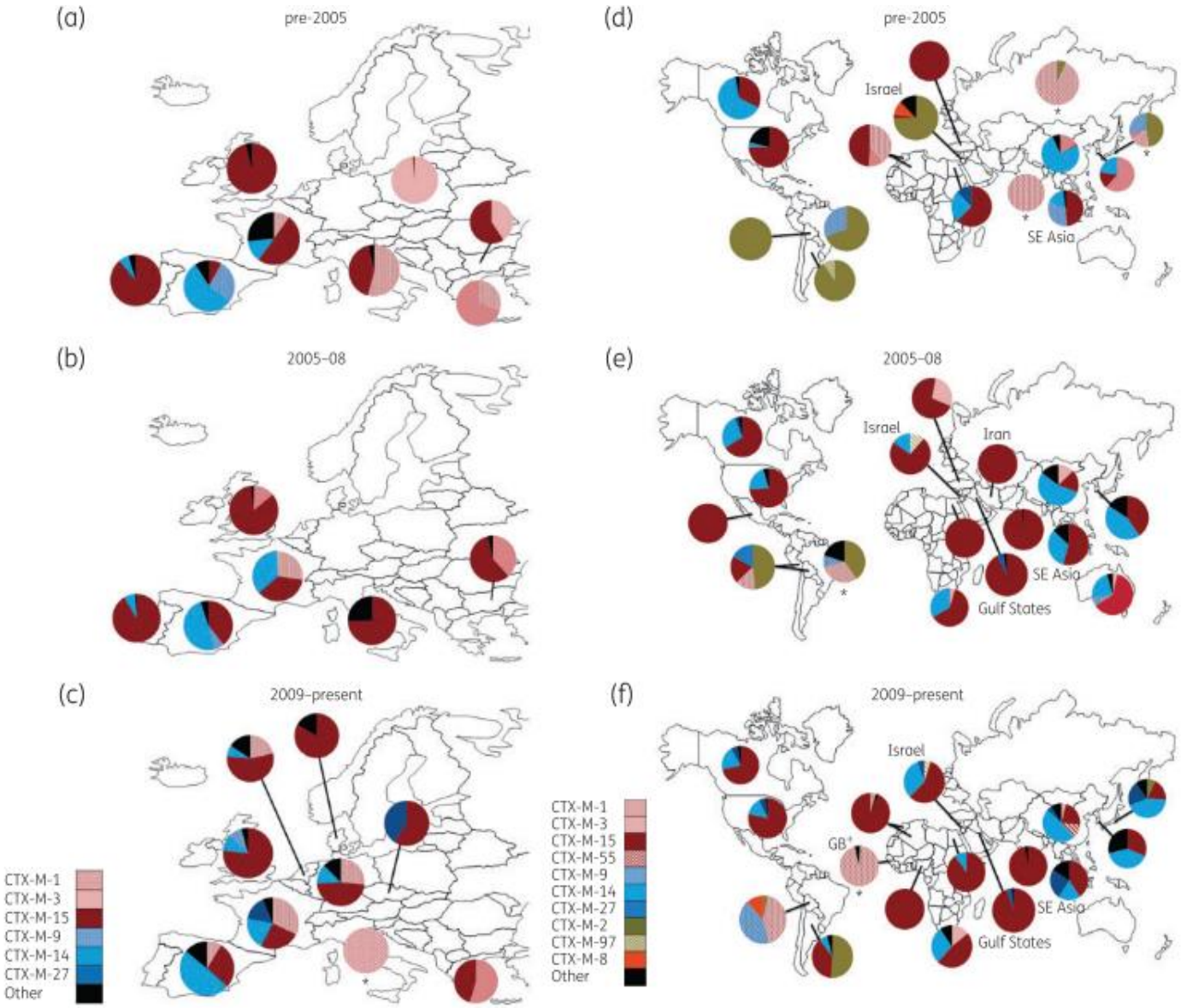


Figure 10. Tendances de la distribution des gènes de type CTX-M chez l'homme en milieu communautaire et hospitaliser entre 2005 et 2017 (14). La distribution découle d'une revue de la littérature mondiale sur plus de 220 références en Europe (a, b, c) et dans le reste du monde (d, e, f) ; le Cambodge, l'Indonésie, la Malaisie, les Philippines, Taiwan et le Vietnam sont inclus dans l'Asie du Sud-Est (SE) ; de la même façon, le Koweït, l'Arabie Saoudite et les Émirats Arabes Unis sont regroupés dans les « États du Golfe » et GB correspond à Guinée-Bissau ; les couleurs sont en adéquation avec les groupes de CTX-M associés en **Figure 9**.

d) Evolution des germes BLSE : le challenge du traitement adapté

Les souches caractérisées comme BLSE sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques en plus des *β*-lactamines. En effet, les éléments génétiques mobiles qui portent les CTX-M peuvent présenter d'autres gènes de résistance ce qui va considérablement limiter les options thérapeutiques fondées sur des combinaisons de molécules ou l'utilisation d'un inhibiteur (*i.e.* enzymes de type 2be). Contre ces derniers et à l'image des « complex mutant TEM », une étude *in-vitro* a cherché à identifier le risque à long terme de sélection de variants CTX-M résistants aux inhibiteurs. La majorité des enzymes mutées testées présentaient en contrepartie une importante diminution de la CMI des céphalosporines à l'exception d'un cas

avec une mutation compensatoire (S130G + L169S). Ces mutants n'ont pas été pour le moment observés en clinique **(161,189)**. Par ailleurs, les enzymes BLSE de classe A peuvent aussi être retrouvées avec des gènes codant pour une oxacillinase de type OXA-1, ce qui va rendre l'association pénicilline / inhibiteur généralement utilisée comme les molécules pipéracilline/tazobactam moins efficace **(45,190)**. D'autres gènes associés à la résistance aux aminosides, fluoroquinolones, tétracyclines ou encore au triméthoprime sont aussi largement exprimés. Cette multiplicité de gènes permet une co-résistance et une co-sélection des mécanismes de contournement **(191)**.

L'une des conséquences directes de la diffusion internationale des gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$ chez les entérobactéries est l'augmentation de l'utilisation d'une autre classe de *β*-lactamine plus stable et à large spectre : les carbapénèmes **(190)**. Ces « bombes atomiques thérapeutiques » ont été incluses dans la catégorie des antimicrobiens d'importance critique et de dernier recours par l'ANSM **(130)**. Leur utilisation est réglementée et restreinte au secteur hospitalier puisqu'elle risque de faciliter le développement et une large sélection de souches résistantes. Des exemples d'enzymes qui ont acquis une activité plus ou moins prononcée contre les carbapénèmes sont déjà retrouvés dans les classes précédemment citées. En effet, comme l'énigmatique souche avec le gène *bla*$_{\text{SHV-38}}$, il existe des enzymes de type –GES avec une activité carbapénémase (GES-2, -4, -5 et -6). Elles font partie du groupe 2f (carbapénémase à site sérine actif). Cette activité reste plus ou moins faible et découle de différents changements d'acides aminés **(131,184)**. De même, il existe une classe spécifique d'enzyme de type –OXA apportant une résistance aux carbapénèmes (carbapénémase 2df ; **Tableau 2**). Leur action contre ces antibiotiques de derniers recours est aussi très variable selon l'enzyme et le micro-organisme hôte et peut être liée à des mécanismes membranaires supplémentaires **(130,131,192)**. Ces variants sont largement retrouvés au sein du genre *Acinetobacter*, et dans le cas des entérobactéries on identifie notamment le gène *bla*$_{\text{OXA-48}}$ ou un variant associé : *bla*$_{\text{OXA-181}}$ **(6,93,193–198)**. Enfin, il a récemment été mis en évidence une enzyme CTX-M particulière issue de *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ chez une entérobactérie **(199)**. Le gène *bla*$_{\text{CTX-M-33}}$ associé diffère en effet au niveau de la position S109A et présente une activité d'hydrolyse contre le méropénème. Poirel *et al.* ont souligné que cette mutation couplée à des mécanismes d'imperméabilité de la membrane augmentent considérablement la CMI de l'ertapénème en comparaison du gène initial (>32 µg/mL contre 4 µg/mL) **(199)**. Cette accumulation de résistances serait à l'image de celle observée chez *Enterobacter* avec une enzyme hyperproduite mais reste pour l'heure très rare **(2,156)**.

e) De nouveaux concurrents enzymatiques

Chez les entérobactéries, à l'exception de *bla*$_{\text{OXA-48}}$ toutes les enzymes issues de mutations n'ont cependant pas la même diffusion ou la même efficacité que les carbapénémases de la classe B de Ambler ou celles de type –KPC (classe A) **(131,193)**. Il n'est pas rare de retrouver ces enzymes associées à des BLSE **(200,201)**. Tout d'abord, l'enzyme de type KPC dont le sigle réfère à l'espèce d'origine « *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase » a été rapportée pour la première fois aux Etats-Unis au début des années 2000 **(202)**. Les gènes *bla*$_{\text{KPC}}$ sont produits en majorité par des souches de *K. pneumoniae* et sont endémiques dans les hôpitaux américains **(94)**. Ils sont associés à un transposon spécifique qui a joué un rôle

important dans leur mobilisation et leur diffusion chez d'autres entérobactéries (Tn*4401*) **(86,198,203)**. Cette enzyme est la plus préoccupante des carbapénémases de classe A. Le complexe clonal KPNC CG258 avec notamment le ST258 est reconnu pour avoir joué un rôle important dans des épidémies hospitalières et la diffusion internationale des enzymes de type –KPC (surtout -2 et -3), comme *E. coli* ST131 pour les enzymes CTX-M **(3,92,104,115)**. Une étude sur une importante collection de KPNC résistantes isolées en Europe et dans des pays voisins a mis en évidence que de nombreux clones et gènes bla_{KPC} étaient associés à un pays en particulier. Par exemple le ST258 était majoritaire en Grèce, tandis que le ST152 (CG258) était principalement retrouvé en Italie et en Israël **(94)**. En plus de la production d'enzyme –KPC au sein de la lignée ST158, il a aussi été mis en évidence une porine OmpK35 non fonctionnelle et une modification de la structure d'OmpK36 comme c'est le cas pour *K. aerogenes*. La réduction de cette porine et son association avec la carbapénémase va considérablement changer la CMI des carbapénèmes **(133,192)**. Par l'utilisation d'un modèle murin il a été souligné que ces mutations engendrent cependant un coût d'adaptation *in vivo* significatif par rapport à d'autres agents pathogènes non mutés. Ce coût pourrait être expliqué par une diffusion limitée de certains nutriments au sein de la cellule. La forte expansion du ST258 / KPC+ chez l'homme aurait donc été facilité par l'utilisation des carbapénèmes **(192)**. Enfin, comme autres producteurs de ces carbapénémases de classe A, on retrouve ECC. Ces enzymes ont aussi été rapportés chez des animaux domestiques et également dans l'environnement **(86,198,204)**. Cependant, ces descriptions de souches productrices d'enzymes de type –KPC en dehors du secteur hospitalier restent des spécificités locales et non généralisées comme l'a démontré une récente étude transversale en Italie où leur incidence en clinique « explose » **(91)**.

Les carbapénémases de la classe B forment un groupe à part (métallo-*β*-lactamase). Toutes ces enzymes vont hydrolyser les carbapénèmes mais seront inactives sur les monobactames. Comme évoqué précédemment et contrairement aux classes A, C et D, il n'y a pas de site sérine active chez ces enzymes. Leur activité nécessite la présence d'ion zinc au niveau de leur site actif. De plus contrairement à la majorité des autres *β*-lactamases elles ne seront pas inhibées par l'acide clavulanique mais par l'EDTA. Il est possible de subdiviser cette classe en 3 selon la structure (B1, B2 et B3) ou l'action de l'enzyme (3a, 3b et 3c). Les métallo-*β*-lactamases du groupe 3b, ont une activité limitée aux carbapénèmes tandis que celles du groupe 3a ont un profil de substrat large face aux *β*-lactamines (**Tableau 2**) **(131)**. Les enzymes du groupe 3a restent les plus fréquemment rencontrées (*i.e.* –IMP, –NDM ou –VIM).

Le gène bla_{IMP-1} a été caractérisé pour la première fois en 1991 au sein d'une lignée de *Serratia marcescens* au Japon. La souche analysée présentait ce gène au niveau de son chromosome **(205)**. On retrouve aujourd'hui les imipénémases en clinique chez *Enterobacter* et *Klebsiella* notamment **(191)**. Leur distribution reste très hétérogène selon les pays et les continents. En ce qui concerne la France, les cas importés d'enzymes –IMP sont bien moins fréquents que les autres métallo-*β*-lactamases **(193)**. À l'inverse, en plus d'isolats associés à différentes épidémies hospitalières à *Enterobacter*, le gène bla_{IMP-4} a aussi été retrouvé chez des souches d'*E. coli* et de *Salmonella* chez des oiseaux sauvages et des animaux domestiques en Australie **(198,206)**. Les variants associés à bla_{IMP-1} sont les plus représentés (n=20). Par ailleurs des enzymes avec les substitutions S262G ou V67F présentent une meilleure activité fasse aux carbapénèmes que IMP-1 (jusqu'à 4× la CMI pour IMP-78). *A contrario* une diminution de

l'affinité et la CMI pour l'ampicilline a été soulignée. L'évolution d'une partie de ces enzymes semble être associée à une spécialisation contre les carbapénèmes. Leur manque d'activité pour l'ampicilline ou d'autres molécules est associé à une modification de leur structure et peut être généralement surmonté par les bactéries grâce à la présence d'autres *β*-lactamases. Ces observations ne sont pas les mêmes pour les enzymes de type –NDM. En effet, ces dernières ont évolué pour mieux surmonter la disponibilité limitée du zinc nécessaire à leur activité mais leur profil de substrat n'a pas changé **(207)**.

L'enzyme de type –NDM (New Delhi Metallo-*β*-lactamase) est endémique en Inde. En effet, la présence du gène associé a été mentionnée chez différentes espèces bactériennes isolées dans des points d'eau de consommation dans la ville de New-Delhi **(208)**. Le premier cas clinique remonte à un patient Suédois en 2008 ayant contracté une infection lors d'un voyage dans ce pays. Le gène associé, $bla_{\text{NDM-1}}$ a été retrouvé sur deux souches d'entérobactéries hautement résistantes (KPNC et *E. coli*) **(209)**. Depuis ce type d'enzyme et quelques variants associés ont largement diffusés sur des structures plasmidiques en clinique à travers le monde. Ces *β*-lactamases ont été identifiées en Australie, Cambodge, Thaïlande, Grèce, Serbie, Roumanie, Vietnam ou encore aux Etats-Unis et dans les Antilles **(6,54,94,111,112,193,198,210)**. Elles ont aussi été rapportées chez *Acinetobacter* et même chez des *Enterobacter* isolés de rats en Autriche **(140,211)**.

La première enzyme de type –VIM (Verona Integron-encoded Metallo-*β*-lactamase) a été mise en évidence en Italie en 1997 au sein d'une souche de *P. aeruginosa* à l'origine d'une épidémie nosocomiale **(212)**. Cette enzyme reste largement représentée au sein de ce genre, mais a par la suite été isolée chez différentes entérobactéries et principalement en Europe **(200)**. C'est le gène $bla_{\text{VIM-1}}$ qui est prédominant, tandis que les autres variants ne sont identifiés que dans un nombre restreint de pays. Le complexe *E. cloacae* fait partie des principaux porteurs de ce type d'enzyme et notamment les clusters VI et VIII **(198,200)**. Chez KPNC des gènes bla_{VIM} ont été retrouvés en Grèce, en Hongrie, Espagne ou encore en Turquie principalement chez Kp1 et de manière plus sporadique chez *K. varicola* **(94,200)**. Un récent projet de surveillance en Allemagne a détecté la présence d'un plasmide IncA/C présentant un gène $bla_{\text{VIM-1}}$ chez une souche d'*E. coli*. La particularité de cet isolat est son origine puisqu'il provenait d'une chaîne de production de viande de porc et que les carbapénèmes ne sont pas approuvées pour une utilisation en médecine vétérinaire **(201)**. Même si très ponctuelle, la détection de ce type de germe dans des produits alimentaires ou dans les chaines de production questionne sur leur diffusion à plus grande échelle au sein de la population **(186,201)**.

Il existe actuellement sur la base de données BLDB 90 variants –IMP, 38 de –NDM et 74 de –VIM (sept. 2021 ; http://bldb.eu/). Avec les exemples ci-dessus, la crainte actuelle est de se retrouver face au même « schéma explosif » de diffusion des CTX-M chez les entérobactéries au niveau communautaire et nosocomial. Par ailleurs, les infections à *Acinetobacter* et *Pseudomonas* résistants aux carbapénèmes présentent pour le moment un coût bien plus important que les infections à enterobactéries avec les mêmes résistances (*i.e.* USA ; **Figure 5**) **(128)**. Les entérobactéries hautement résistantes émergentes ont malheureusement déjà entamée une diffusion mondiale à bas niveau. On les retrouve dans différents compartiments avec une forte variation régionale et continentale, et la présence sporadique de

ces gènes dans les eaux usées urbaines est un indicateur parmi d'autres de cette diffusion **(86,93,193,201,204,206,208,213,214)**. La **Figure 11** ci-dessous illustre l'expansion chez l'homme des KPNC productrices de carbapénémases en Europe entre 2006 et 2018. Une différence Nord < Sud et Est > Ouest est observable, avec une forte prévalence en Grèce et en Italie. Par ailleurs, en plus des voyages, les flux migratoires en dehors des zones de conflits où certaines résistances sont devenues endémiques représentent un futur challenge dans le contrôle et la diffusion de ces enzymes « émergentes » **(215)**.

En France, à l'image de nombreux autres pays, les autorités sanitaires ont mis en place des protocoles spécifiques afin de maîtriser l'expansion de ces germes. Ces indications sont listées dans la circulaire DGS/RI/DGOS/PF n°2010-413 publiée le 6 décembre 2010 **(216)**. Elle stipule que les établissements de santé doivent effectuer un dépistage systématique pour les patients rapatriés sanitaires ou ayant effectué un séjour récent dans un hôpital à l'étranger. Les patients ayant des antécédents d'hospitalisation sur le territoire sont aussi concernés par ce dépistage. En plus de mesures d'hygiènes spécifiques, un isolement des patients porteurs de ces gemes doit être réalisé pour éviter les contaminations croisées. Ces évènements font l'objet d'un signalement systématique aux instances de veilles sanitaires (infection, colonisation) et d'une recherche de possible patient contact **(193,216)**.

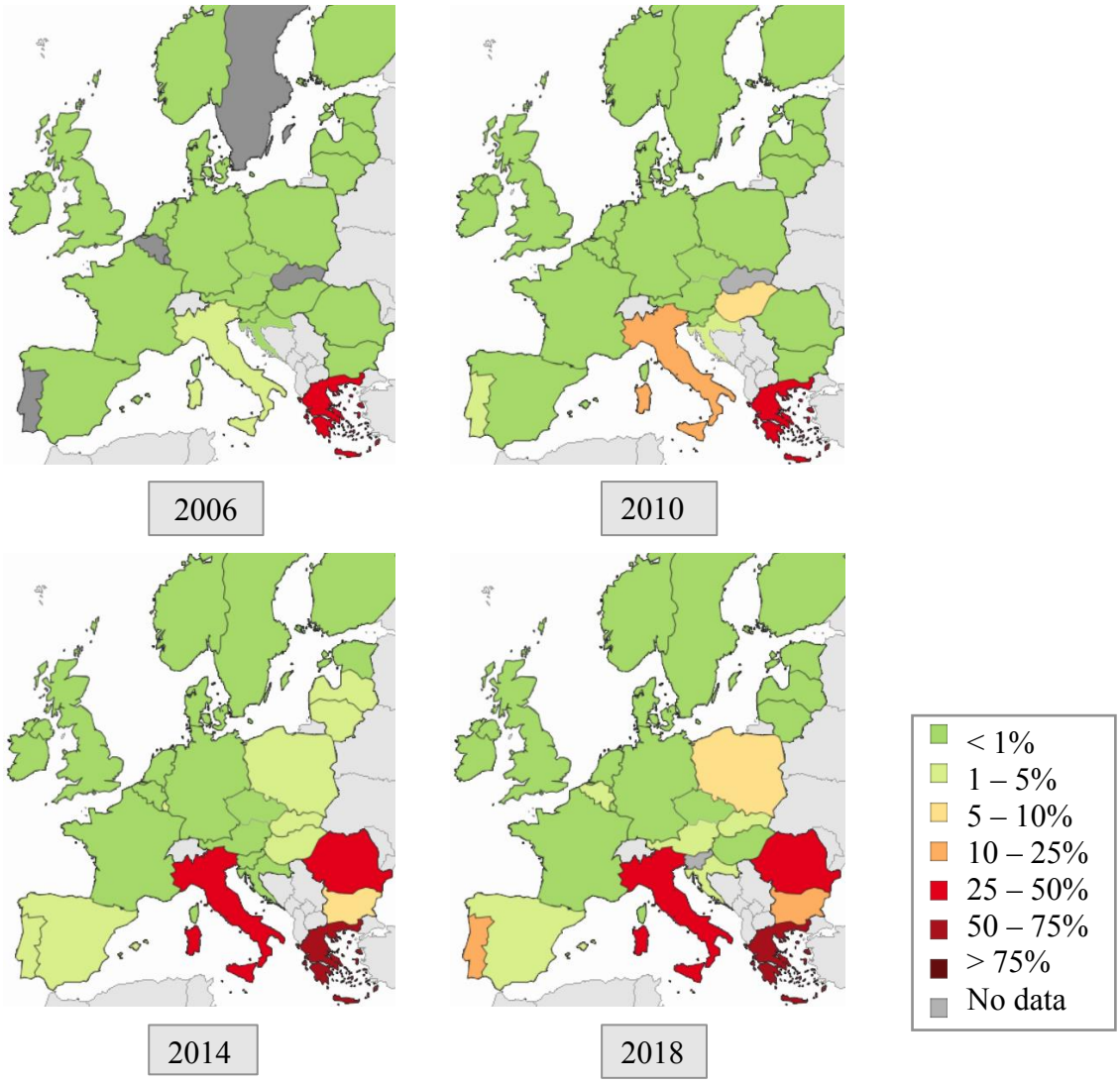


Figure 11. Evolution des données de surveillance de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases en Europe en secteur hospitalier. Les prévalences nationales sont fondées sur des isolats invasifs (sang, LCR) ; les cartes sont issues du site de surveillance EARS-Net (https://atlas.ecdc.europa.eu/).

D) Les mécanismes de diffusion de la résistance

Le succès de la résistance au sein du monde bactérien s'explique notamment par les transferts horizontaux de matériel génétique. Ces transferts sont le fruit de différents processus qui sont la conjugaison, la transduction et la transformation **(217)**.

1. La conjugaison

Parmi ces phénomènes, la conjugaison a été celui le plus étudié et reste le plus important. Il consiste au transfert unidirectionnel de matériel génétique entre deux cellules (donneuse → réceptrice ou transconjugant). Il se fait par un contact physique *via* les pili conjugatifs. Ce mécanisme nécessite trois composants codés par des éléments génétiques capables de promouvoir leur transfert intercellulaire comme les plasmides conjugatifs (**Figure 15 B**) **(218)** :

- **Le transférosome** sera associé à la formation d'un canal de transport entre les deux bactéries. Il comprend un système de sécrétion de type IV (T4SS) et un pilus conjugatif. Le T4SS correspond à une famille de systèmes polyvalents associés notamment au transport de protéines à travers la membrane de la cellule ou au transfert d'éléments génétiques mobiles. C'est lui qui sera à l'origine de la production du pilus de contact. Selon les protéines qui composent ces éléments et les homologies structurelles, il est possible de les regrouper en 8 catégories. Elles vont correspondre à un complexe d'accouplement spécifique ou MPF (mating-pair formation). Quatre MPF sont distinguables chez les *Proteobacteria* (MPF_G, MPF_T, MPF_I et MPF_F) **(219)**.

- **Le relaxosome** est un complexe nucléoprotéique qui comprend l'origine de transfert (*oriT*), une relaxase et des protéines auxiliaires. La relaxase est une enzyme qui va reconnaître l'*oriT* de l'élément génétique mobile et va cliver la molécule d'ADN à l'aide des protéines auxiliaires. Cette étape va permettre la mobilisation de l'élément génétique sous une forme simple brin qui convient au transfert intercellulaire **(218)**.

- La connexion de ces deux ensembles se fera grâce à une **protéine de couplage T4CP** (**Figure 15 B**).

La conjugaison est initiée par la mise en place du canal de transport entre les 2 cellules. Après clivage, l'élément génétique mobile est transféré activement à travers ce canal vers la cellule receveuse. Enfin, la dernière étape correspond à la synthèse du brin complémentaire et la ligation sous forme circulaire de l'ADN transféré dans le cas d'un plasmide. Ces éléments génétiques mobiles doivent aussi pouvoir se répliquer de façon autonome pour être transmis à la descendance **(218)**. Ces phénomènes de conjugaison peuvent avoir lieu dans de nombreux écosystèmes comme les effluents et les boues de traitement, l'eau et les sédiments, ou encore le tube digestif **(184,220–222)**. Par ailleurs, l'échange par conjugaison présente un coût énergétique important pour la bactérie (*i.e.* MPF). De ce fait, les gènes associés peuvent être réprimés pour limiter cette diffusion et permettre à la bactérie de rester compétitive **(223)**.

2. La transduction

Contrairement aux deux autres mécanismes, la transduction fait intervenir un micro-organisme tiers : un bactériophage (**Figure 12**). Ces virus spécifiques des bactéries sont composés d'une queue et d'une capside qui renferme le matériel génétique. Ils sont plus abondants que les bactéries (10^{30}–10^{32} bactériophages contre 10^{29}–10^{31} bactéries) **(224)**. Par ailleurs parmi ces nombreux phages, le crAssphage est spécifique de *Bacteroides intestinalis*. Il est très abondant dans les selles humaines (1,7 % du métagénome) contrairement à celles des animaux. Cette forte spécificité a amené une équipe de recherche à utiliser ce dernier comme marqueur de contamination fécale en métagénomique **(225)**. Pour se développer, ces virus sont capables d'infecter des bactéries après la reconnaissance de récepteurs de surface (spécificité d'hôte). On observe ensuite deux phénomènes selon les virus et différents facteurs exogènes :

- **La multiplication virale** par détournement de la machinerie cellulaire va aboutir à la libération des nouveaux phages par lyse (cycle lytique). Plusieurs centaines de virions sont ainsi libérés d'une seule bactérie et vont procéder à leur tour à l'infection d'autres cellules. Par leur multiplication dans un écosystème donné, les bactériophages peuvent réguler et moduler les communautés bactériennes. Ce phénomène est étudié depuis de nombreuses années comme une alternative aux antibiotiques et aux traitements de surfaces. De récents travaux ont par exemple démontré sur un modèle larvaire (*Galleria mellonella*) l'efficacité du phage *KP1801* à infecter des souches de KPNC BLSE tout en limitant la production de biofilm **(114)**.

- **Une intégration au génome bactérien** dans une région spécifique, et l'entrée dans un état de dormance (état lysogène, spécifique des phages « tempérés »). On parle alors de prophage, il sera retrouvé dans le génome de la descendance. Cette propagation passive peut ensuite découler vers un cycle lytique. Les prophages peuvent être des constituants importants du génome bactérien (jusqu'à 20%) **(226)**.

Au même titre que le mode de propagation des phages, il existe différentes formes de transduction. Elles découlent toujours d'erreurs lors du cycle lytique et engendre des chimères avec de l'ADN bactérien qui peut être injecté dans une nouvelle bactérie réceptrice (transductant).

- **Transduction généralisée :** un fragment aléatoire d'ADN bactérien est encapsidé.

- **Transduction spécialisée :** lors du passage en cycle lytique d'un prophage, une partie du génome bactérien situé aux extrémités du site d'intégration est excisée et insérée dans une capside.

Les bactériophages peuvent tout d'abord présenter des gènes de virulence. Leur intégration au sein du chromosome est associée à certains pathovars chez *E. coli* comme par exemple le « Stx-phage » qui porte le gène de production de la shiga-toxine chez les EHEC et les STEC **(19)**. Des gènes de résistance aux antibiotiques sont aussi susceptibles d'être

mobilisés lors de la phase infectieuse. Une étude chinoise a par exemple caractérisé chez des souches de *Salmonella* spp. la présence d'un gène *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ associée à la séquence d'un bactériophage de type P1 **(186)**. L'environnement de ce même gène chez *E. coli* ST131 du sous-clade C1-M27 avait déjà été décrit comme appartenant à une séquence virale au Japon **(37,54)**. Il en est de même pour le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ dans certaines études **(227)**. Le rôle de la transduction dans la dissémination de diverses résistances a bien été observé en laboratoire sur des germes environnementaux ou pathogènes, comme *Pseudomonas* spp. ou *Salmonella enterica*. Cependant la fréquence de transduction reste en général faible et de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-4} **(228,229)**. L'impact de ce phénomène est peu évalué de façon générale dans un environnement plus complexe et *in vivo* **(224)**. Par ailleurs, la présence de prophages au niveau du chromosome, indépendamment de gènes de résistances connus, peut aussi apporter un avantage sélectif. En supprimant les séquences associées à des prophages cryptiques (prophage ayant perdu la capacité de passer en cycle lytique) sur le génome de souche d'*E. coli* (K12), Wang X. et ses collègues ont observé une diminution de la concentration minimale inhibitrice aux *β*-lactamines (×3,9) et aux quinolones (×2,1) en comparaison d'une souche sans délétion. Les bactéries utilisent donc à leur avantage ces gènes d'origine virale pour répondre à différents stress environnementaux **(226)**.

3. La transformation

La transformation a été l'un des premiers phénomènes de transferts entre bactéries décrit en laboratoire. Contrairement aux deux autres mécanismes, la transformation ne nécessite pas l'intervention d'un vecteur intermédiaire. Historiquement limitée à certaines genres bactériens (*Streptococcus, Neisseria*), elle est mise en évdence chez un nombre grandissant d'espèces bactériennes y compris multirésistantes (*S. aureus, E. faecium, P. aeruginosa*). La transformation consiste à une capture d'ADN libre dans l'environnement même de la bactérie. Cette action de capture nécessite que la bactérie soit « compétente », et qu'elle mette en place une machinerie cellulaire dédiée. La bactérie présente en effet un pore spécifique et dans la majorité des cas un pilus de transformation (type IV) pour capter le brin d'ADN. Celui-ci sera ensuite protégé par des protéines contre la dégradation intracellulaire puis intégré dans le génome bactérien par des phénomènes de recombinaison (**Figure 12**) **(230)**.

Cette transformation peut être induite en laboratoire **(231)**. Différents facteurs de stress sont aussi impliqués dans le déclenchement d'un état de compétence transitoire. Dans le cas de *S. pneumoniae* il a notamment été souligné l'action de certains antibiotiques dans l'apparition de transformants **(230,232)**. Les bactériophages pourraient aussi faciliter la libération d'ADN dans l'environnement lors des cycles lytiques **(231)**. L'acquisition de gène par transformation naturelle est cependant tributaire d'autres facteurs qui influencent la persistance de l'ADN dans un environnement donné, comme par exemple la présence de nucléases qui vont dégrader le matériel génétique. Chez *E. coli* selon les conditions environnementales, de l'ADN exogène peut aussi être capturés mais les mécanismes en jeu restent à clairement élucider. De plus, comme le suggère une récente étude la fréquence de capture reste généralement bien plus faible dans des échantillons naturelles (eau de lac ou de sortie de station ; 10^{-10} à 10^{-7}) **(233)**.

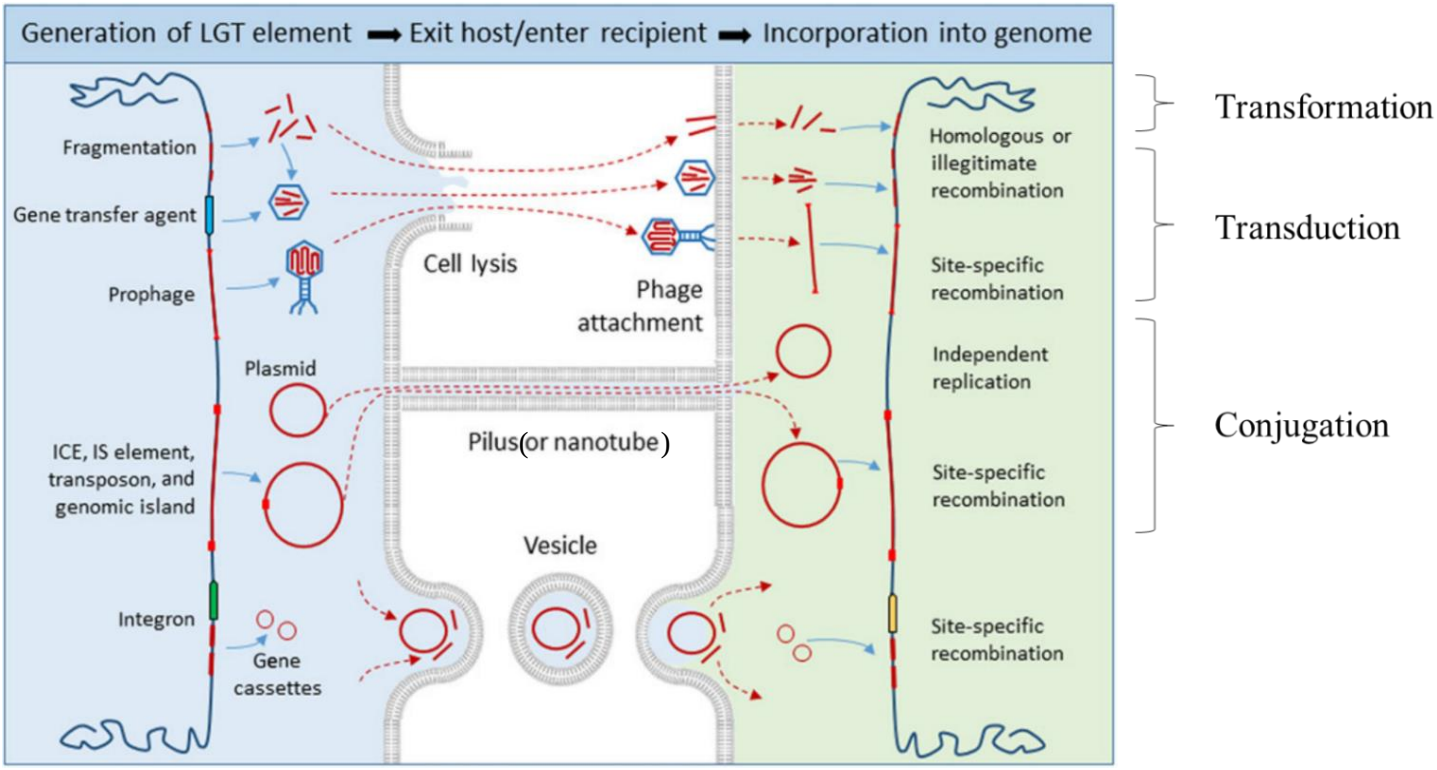


Figure 12. Représentation schématique des transferts horizontaux de gènes chez les bactéries (217). Les 3 principaux mécanismes d'échange génétique sont la transformation (assimilation d'ADN libre par un organisme « compétent »), la transduction (transfert réalisé pas un bactériophage) et la conjugaison (transfert par contact cellulaire et circulation d'un plasmide) ; les derniers mécanismes décrits mettent en œuvre le transfert *via* des vésicules et les nanotubes.

4. Les vésicules membranaires et les nanotubes : de nouvelles alternatives pour les bactéries dans la diffusion horizontale ?

Enfin deux autres mécanismes de transfert et de communication ont été décrits mais ne sont que peu étudiés pour le moment chez les bactéries. Il y a tout d'abord les vésicules membranaires **(217)**. Ces structures sphériques et extracellulaires sont notamment retrouvées chez les bactéries à Gram –. Elles ont un diamètre qui peut aller jusqu'à 500 nm selon le contenu **(234)**. Elles sont composées de protéines de la membrane externe et du périplasme, de lipopolysaccharides et de phospholipides. Elles vont encapsuler différentes molécules issues du métabolisme bactérien, mais aussi des gènes qui seront protégés des nucléases de l'environnement extérieur. Par cette approche les bactéries n'ont pas besoin de contact cellulaire pour échanger (*i.e.* conjugaison) et il n'y a pas de lyse de la cellule donneuse comme c'est le cas lors d'une transformation « classique ».

Une étude menée sur *A. baumannii* a pu mettre en évidence pour la première fois la présence d'un plasmide porteur d'un gène $bla_{\text{OXA-24}}$ dans des vésicules issues de souches résistantes. Après purification et concentration de ces vésicules, le contact d'une seconde souche d'*Acinetobacter* sensible avec ces éléments a permis la capture du plasmide et le développement d'un phénotype résistant aux carbapénèmes. Les auteurs ont par ailleurs souligné que les plasmides transférés ne présentaient pas la machinerie nécessaire à leur mobilisation par conjugaison. Les vésicules pourraient donc être une alternative de transfert **(196)**. Toujours avec *Acinetobacter* comme modèle, Chatterjee S. *et al*. ont souligné la diffusion entre différentes espèces d'un plasmide de résistance porteur de $bla_{\text{NDM-1}}$. La capture de

vésicules avec ce plasmide a permis la transformation de souches d'*Acinetobacter* et surtout d'une souche de laboratoire d'*E. coli* initialement sensible (JM109) **(211)**. Enfin, en dehors des résistances il a aussi été mis en évidence la diffusion des gènes de virulence d'*E. coli* O157:H7 vers des souches d'*E. coli* et de *Salmonella enteritidis* dépourvues de ces gènes **(235)**. Les fréquences de ce type de transformation en laboratoire ont été estimées entre 10^{-5} et 10^{-8} selon l'approche mise en place **(211)**. Ces échanges *via* les vésicules restent des évènements rares et non dynamiques. Une approche par microcopie à fluorescence a permis de souligner que ces structures restaient généralement sur la surface de la cellule émettrice. Par ailleurs elle a aussi souligné que des facteurs de stress environnementaux comme l'exposition à des molécules antibiotiques (ciprofloxacine à des concentrations < CMI) pouvait augmenter leur production chez *E. coli* ainsi que leur présence intercellulaire et par conséquent leur diffusion **(234)**. Ce mode d'échange génétique pourrait être important notamment dans des communautés au sein de biofilms ou dans un milieu aquatique, mais son implication dans une matrice complexe et *in vivo* reste actuellement difficile à apprécier **(217,224)**.

Une seconde structure a récemment été décrite et pourrait aussi jouer un rôle dans les échanges par contact entre bactéries à l'instar des pili conjugatifs. En effet, l'équipe de Ben-Yehuda S. a mis en évidence la formation de canaux nommés nanotubes chez les bactéries au sein de différents genres (Gram + et Gram –). Ils seraient à l'origine d'un échange actif de matériel cytoplasmique dont des gènes de résistance aux antibiotiques selon un mécanisme différent de celui de la conjugaison **(236)**. Par ailleurs, une autre équipe a présenté des résultats contrastés sur les mêmes modèles (*Bacillus subtilis, E. coli*), et suggéré que ces structures seraient une manifestation de la mort cellulaire. Elle a en effet observé une importante augmentation des nanotubes après un stress (antibiotiques, pression physique) et surtout lors de l'initiation de la dégradation de la cellule qui conduit à la libération de son contenu. Les auteurs ont aussi souligné que ces structures ne permettaient pas de transmettre des plasmides non-conjugatifs. Les connexions précédemment observées en microscopie électronique seraient des artéfacts et non des évènements biologiques **(237)**. Ces résultats totalement contradictoires soulignent bien toute la difficulté d'étudier les échanges génétiques entre bactéries et les futurs challenges à surmonter dans les années à venir.

E) Les éléments génétiques associés à la diffusion de la résistance

Le transfert horizontal de gènes de résistance implique dans la majorité des cas des éléments génétiques « mobiles ». Ces brins d'ADN correspondent au mobilome et sont classés en différentes familles en fonction de leurs propriétés respectives **(217)**. Il peuvent avoir un impact important sur la taille du génome, la diversification des bactéries et surtout leur adaptation à un biotope spécifique **(55)**. On retrouve 2 catégories d'éléments génétiques mobiles selon qu'ils permettent une mobilité intracellulaire ou une mobilité intercellulaire de l'information génétique (**Figure 13**) **(40)**.

1. Les éléments transposables : séquences d'insertion et transposons

La transposition d'une façon générale est un mécanisme d'évolution rapide qui consiste en l'insertion de gène de taille définie au sein d'un génome. Les éléments transposables associés

regroupent différentes structures génétiques ayant uniquement la capacité d'être transférées d'un site donneur vers un site cible sur le chromosome et/ou des plasmides (mobilité intracellulaire). Ne comportant pas la machinerie de réplication, ils sont dépendants du site sur lequel ils sont intégrés pour être dupliqués.

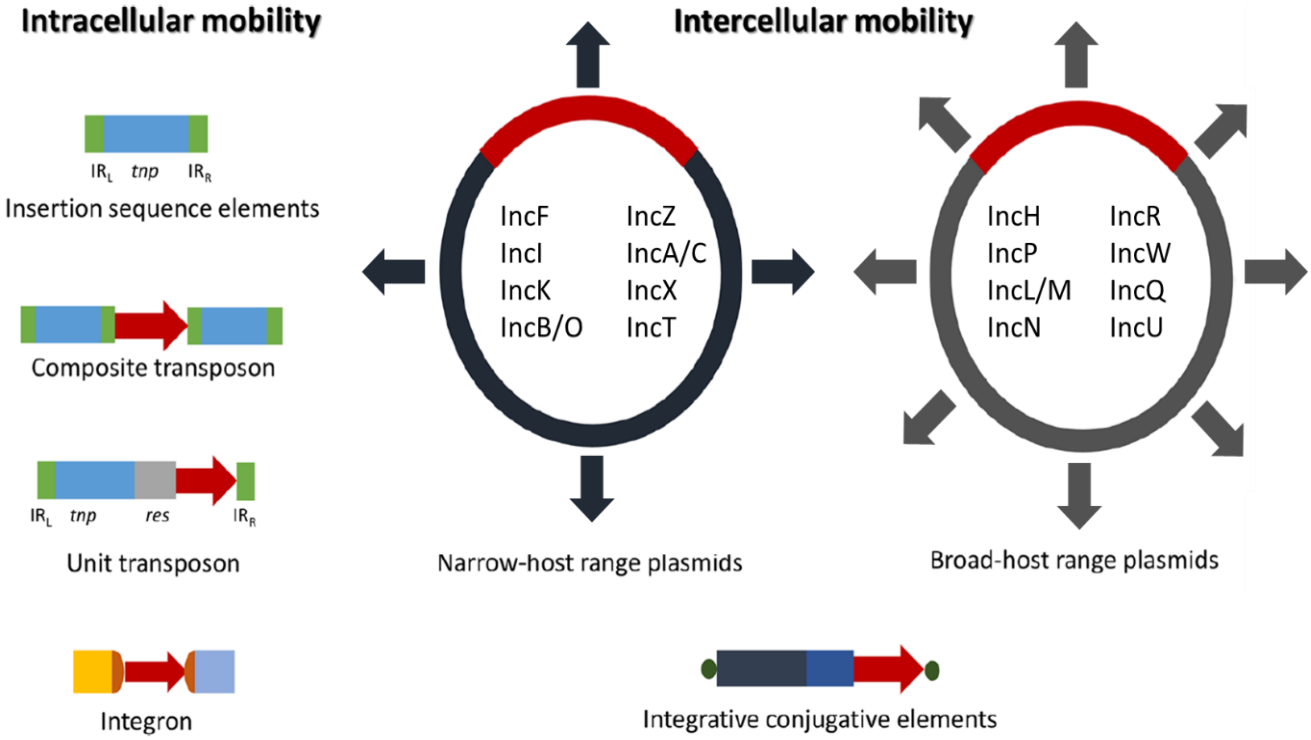


Figure 13. Vue d'ensemble des éléments génétique mobiles (40). Le spectre de diffusion des plasmides est adapté des travaux de Rozwandowicz M. *et al.* **(238)** ; les séquences d'insertion sont encadrées par des petites séquences répétées inversées (IR_L et IR_R) ; *tnp* gène codant pour la transposase, *res* gène codant pour la resolvase ; la séquence en rouge représente un gène de résistance à un antibiotique ; le détail d'un intégron est visible en **Figure 14**.

Les **séquences d'insertion** (IS) correspondent aux plus petits éléments génétiques mobiles. Leur structure comprend un seul gène codant pour une transposase (*tnp*A), qui va assurer la transposition. Celui-ci est encadré par des séquences répétées inversées de quelques paires de bases (IR_L et IR_R ; **Figure 13**). Les IS ont été mises en évidence par leur capacité à induire des mutations avec des processus de type « copier-coller » ou « couper-coller ». Ces mécanismes sont notamment associées au recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques **(40)**. Les IS peuvent reconnaître des séquences d'ADN cibles plus ou moins spécifiques au niveau du génome. La base de données ISfinder répertorie l'ensemble de ces structures. Celles-ci sont regroupées selon la nature de la transposase **(239)**. Parmi celles-ci on retrouve notamment :

- **ISE*cp1*** associée au gène codant pour les CTX-M et notamment $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, mais aussi les carbapénémases chez plusieurs genres bactériens. Cette IS a la particularité de pouvoir mobiliser à elle seule un gène et aurait joué un rôle central dans la mobilisation initiale et l'expression à haut niveau des CTX-M à partir du chromosome des *Kluyvera* **(14,171,173,186,240,241)**.

- **IS*26*** a notamment été décrite comme étant associée à l'évolution des plasmides de résistance IncF chez *E. coli* ST131. En effet, plusieurs copies de cette séquence d'insertion y sont présentes et ont engendré des transpositions et de multiples réarrangements au sein de ces éléments génétiques mobiles **(38)**. D'autres modèles ont confirmé ce lien avec la plasticité plasmidique **(242)**. Il a été postulé qu'elle serait par exemple à l'origine de la transposition plasmidique de l'opéron *oqxAB* **(134)**. Cette IS est aussi retrouvée avec les gènes de type bla_{SHV}, et aurait joué un important rôle dans leur mobilisation à partir de *Klebsiella* tout comme pour le gène *fosA3* chez *Kluyvera* **(159,174)**. Des intégrations chromosomiques de plasmides médiées par cet élement sont aussi possibles **(177)**.

- **IS*30*** dont l'insertion entre deux gènes *uspC-flhDC* a été mise en évidence au sein d'une population spécifique d'*E. coli* du phylogroupe A issue d'échantillons d'eaux usées. Cette caractéristique serait liée avec d'autres facteurs à une plus grande tolérance au chlore et au traitement UV. Les auteurs ont suggéré que cette insertion pourrait servir de biomarqueur pour identifier des souches naturalisées dans ce biotope **(29)**.

- Les **IS*1294*** présentes sur le chromosome des *Shigella* et le plasmide de virulence pINV (EIEC-like) sont associées à l'intégration chromosomique complète et réversible de cet élément génétique mobile (« site specific recombination » ; **Figure 12**) **(23)**.

L'association de deux IS identiques encadrant un ou des gène(s) spécifique(s) est la base de la structure des **transposons composites** (**Figure 13**). Ils vont mobiliser l'ensemble de la séquence encadrée et serviront de « véhicule » notamment aux gènes de résistance :

- **Tn*10*** est connu pour être le véhicule de gène de résistance à la tétracycline **(243)**.

- **Tn*7*** est notamment associé à un gène codant pour une intégrase de type *intI*2 et des cassettes de gènes de résistance spécifique qui sont *dfrA1*, *sat* et *aadA1* **(244)**.

Les **transposons non-composites ou unitaires** ne présentent pas d'IS au niveau de leurs extrémités. On retrouvera sur ces structures des séquences répétées en orientation inverse (IR_L et IR_R ; **Figure 13**). Ces IR vont permettent la transposition, elles seront reconnues par une transposase fonctionnelle (*tnp*) et un régulateur de la transposition (*res* ; resolvase) va permettre de terminer la réaction de recombinaison. Parmi ces transposons on retrouve notamment les Tn*3* associés à des gènes de résistance aux *β*-lactamines comme Tn*4401* et bla_{KPC} évoqué précédemment. Cette famille de transposons est aussi présente chez *Enterocccus*, et associée à l'un des principales opérons de résistance à la vancomycine (Tn*1546*) **(19,122,136,203)**.

2. Les intégrons

Les intégrons correspondent à une plateforme de capture et d'expression de gènes. Ces gènes peuvent coder une résistance spécifique ou diverses protéines. Ils seront regroupés sous

forme d'un réseau de cassettes (**Figure 14**). Trois éléments composent la structure de base de cette plateforme de mobilisation. On retrouve tout d'abord un gène codant une intégrase (*intI*). Cette enzyme sera associée à la reconnaissance et l'intégration d'une cassette de gène au niveau d'un site de recombinaison spécifique (*attI*). L'intégrase a aussi la possibilité d'exciser ou de déplacer une cassette du réseau. L'expression du gène inséré sera assurée par un promoteur (Pc) et sera graduelle selon sa proximité avec ce dernier **(245)**.

Il existe différents types d'intégrons. Chez *Vibrio cholerae* on retrouve notamment un super-intégron (SI) sur un de ces chromosomes. Ce dernier est aussi caractérisé comme étant « sédentaire ». Il est spécifique au genre et présente une taille d'environ 120 000 pb **(246)**. Il est associé à de nombreuses cassettes et joue un rôle important dans la plasticité de ce pathogène. Une étude de phylogéographie sur différentes espèces de *Vibrio* a par exemple mis en évidence une composition semblable des SI de plusieurs espèces selon leur distribution géographique. En parallèle, des souches d'une même espèce mais isolées dans plusieurs sites présentaient une composition différente de leur SI. Ceci indique un partage d'éléments génétiques mobiles entre isolats d'un même milieu et une adaptation localisée de ces espèces médiée par le réseau de cassettes **(247)**. Chez les entérobactéries on retrouve des intégrons de résistance (IR). Ces intégrons vont être des vecteurs de différentes cassettes de gènes de résistance et seront donc associés aux phénotypes « multirésistants ». On retrouve jusqu'à 8 cassettes sur ces éléments, et par homologie avec l'exemple de *Vibrio*, ils ont clairement joué un rôle dans l'adaptabilité de ces germes aux traitements antibiotiques **(245,248,249)**.

Il a été souligné que l'exposition à des molécules comme certains antibiotiques pouvait engendrer un stress et des dommages sur l'ADN de la bactérie. De ce stress découle une cascade de réactions métaboliques qui sont notamment associées à la réponse SOS. À noter que ce système n'est pas présent chez toutes les espèces (ex : *S. pneumoniae*) **(231)**. En ce qui concerne les intégrons, la production de l'intégrase est régulée par ce système et notamment la présence d'un répresseur de la réponse SOS (LexA) au niveau de son promoteur. Cette protéine va se cliver en situation de stress et libérer le promoteur de l'intégrase, augmentant ainsi l'expression d'*intI* **(250)**. Dans le cas d'un traitement antibiotique spécifique, l'intégrase produite va promouvoir le déplacement au plus près du Pc d'un gène de résistance spécifique afin d'augmenter son expression et répondre au stress (chloramphénicol → *catB9*) **(245,249)**. Ce réseau dynamique peut donc présenter différentes combinaisons et être facilement adapté selon les situations.

Les intégrons n'ont pas la capacité de « copier-coller » ou « couper-coller » des IS. Ils seront donc mobiles seulement s'ils sont associés à un transposon et d'autres éléments génétiques comme les plasmides conjugatifs ou les éléments intégratifs et conjugatifs **(245)**. En se fondant sur le gène qui code l'intégrase, il est possible de distinguer différentes classes d'IR. Parmi ces classes on retrouve notamment *intI*1, *intI*2 et *intI*3 (classes 1 à 3), clairement différentiables de *intI*4 associé au SI de *Vibrio* **(246)**. Parmi ces structures, les intégrons de classe 1 sont les plus représentés chez les souches multirésistantes en clinique mais aussi en portage au sein de la communauté **(164,200,227,248)**. Comme pour de nombreux gènes de résistance, leur origine serait environnementale **(172,251)**. En effet, une plateforme de capture semblable a été identifiée au sein des *Betaproteobacteria* isolées dans des environnements

aquatiques. Son association avec un transposon (Tn*402*) aurait permis sa mobilité en dehors du compartiment environnemental et l'apport successif de diverses cassettes de résistance aurait facilité la sélection et l'expansion des souches qui présentaient ce type de transposon chez l'homme notamment. L'une des premières cassettes intégrées serait un gène codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires (désinfectant) **(251)**. En ce qui concernent la structure *intI*2, celle-ci ne présente pas la même capacité de recombinaison que *intI*1 ce qui va donner un réseau de cassettes stable pour les intégrons de classe 2 **(244)**.

Le réseau de cassette de gènes correspond à la partie variable de l'intégron. Sous forme libre elles prendront une conformation circulaire (**Figure 14**). Ces cassettes sont des éléments mobiles constitués d'un gène et d'un site de recombinaison (*attC* ou 59-base element). Ce site correspond à une séquence spécifique inversée et répétée qui sera reconnue par l'intégrase **(252)**. Dans l'environnement, les sources de cassettes de résistance peuvent être théoriquement multiples. Une étude récente a proposé de hiérarchiser les cassettes de résistance en fonction des homologies du site *attC*. Ceci a permis de démontrer qu'une partie de ces gènes provenaient de trois taxons de bactéries environnementales qui présentent toutes un intégron sédentaire : *Spirochaetes*, *Vibrionales* et *Xanthomonadales*. Par ailleurs, les auteurs ont aussi suggéré que les cassettes de résistances aux *β*-lactamines identifiées dans ce projet seraient issues de l'environnement marin **(253)**. Si l'on fait le parallèle avec les travaux de Poirel *et al.* sur les progéniteurs de gènes de résistance comme le genre *Shewanella* (*qnrA*, $bla_{\text{OXA-48}}$), toutes ces découvertes concordent à dire que l'environnement aquatique joue un rôle central dans l'acquisition de résistance par les pathogènes humains **(141,195)**.

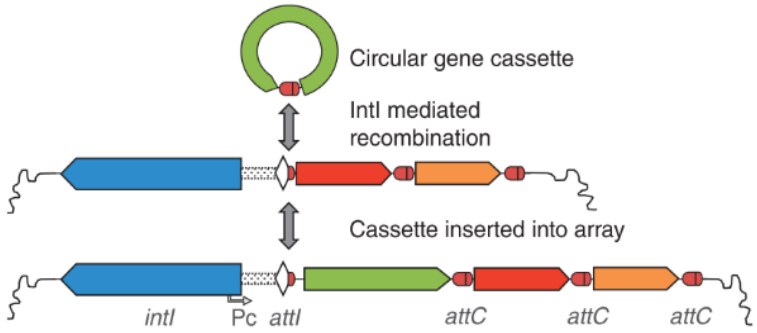


Figure 14. Structure d'un intégron et acquisition d'un gène (254).

L'équipe de Gillings M. R. *et al.* a suggéré que les intégrons pourraient être utilisés comme des marqueurs du degré de pollution anthropique dans un biotope donné (qPCR+ ARN 16S ou séquençage) **(254)**. En effet, par ces activités, l'homme peut être considéré comme la principale force d'évolution sur la terre **(217)**. Un biotope soumis à une pression de sélection peut présenter un avantage pour les bactéries qui portent des intégrons de résistance et qui finiront donc par prédominer dans la population (échanges horizontaux, division cellulaire). Par ailleurs les auteurs font aussi la distinction entre les intégrase « *intI*1 cliniques » et les « *intI*1 environnementales » initiales. Celles-ci présentent des séquences distinctes et ne seront théoriquement pas associées aux mêmes cassettes de gènes **(251,254)**. Ces *intI*1 cliniques ont été mises en évidence dans pléthores d'échantillons depuis l'avènement de l'antibiorésistance, à commencer par le microbiote de l'homme, en passant par les eaux usées urbaines et hospitalières, dans les rivières, des sédiments, du compost et des sols amendés, et jusque dans des aérosols et des communautés microbiennes de plastique. Comme pour les gènes de type

CTX-M, il est aussi possible de retrouver ces « plateformes » sur des bactéries isolées chez des animaux sauvages et même chez des bivalves en Arctique, ce qui souligne bien toute l'étendue de la problématique environnementale de l'antibiorésistance aujourd'hui **(53,184,206,214,248,255–259)**.

3. Les éléments intégratifs et conjugatifs

Les éléments intégratifs et conjugatifs ou ICE sont des structures chimères qui vont présenter à la fois la propriété d'intégration / excision chromosomique des bactériophages et la machinerie de transfert des plasmides conjugatifs. Ils seront donc capables d'auto-transfert par conjugaison (mobilité intercellulaire). Cependant, comme les autres éléments transposables ils ne peuvent pas se répliquer de manière autonome. Les ICE sont aussi des véhicules de gènes accessoires pouvant apporter un intérêt compétitif à son hôte. Par exemple, l'ICE*SXT* chez *Vibrio cholerae* présente une taille de plus de 99 000 pb. Il contient notamment un cluster spécifique avec une structure de type transposon composite associée à des gènes de résistance (*dfrA18*, *floR*, *strA/B*, *sul2*) **(260)**. Chez KPNC l'élément ICE*Kp* est présent dans plus de 30% de ce complexe d'espèces et a aussi diffusé chez d'autres entérobactéries. Il apporte le locus *ybt* codant la yersiniabactine. Ces structures peuvent être intégrées au chromosome en plusieurs copies et différentes variations d'ICE*Kp* existent (n=14). Par exemple, la structure ICE*Kp*10 code en plus pour la colibactine **(105)**.

4. Les plasmides

Les plasmides sont des éléments génétiques mobiles d'ADN généralement circulaires et double brin, indépendants et à réplication autonome vis-à-vis du chromosome. Ils codent leurs propres protéines de réplication et leur partition. Par ailleurs, différents éléments de l'hôte vont être recrutés pour permettre cette division (ex : polymérase, hélicase). Pour limiter les interférences lors de la réplication, le nombre de copies plasmidiques est généralement très limité **(223)**. Une autre particularité de ces éléments extra-chromosomiques est la possibilité de transfert entre bactéries voisines par le mécanisme de conjugaison présenté précédemment. En effet, les plasmides « conjugatifs » (MOB+ ; MPF+) présentent en plus du système de réplication, une région *tra* avec les gènes associés au relaxosome et au transferosome leur permettant une transmission par conjugaison. Les plasmides « mobilisables » (MOB+ ; MPF –), plus rares et généralement plus petits, ne présentent pas l'ensemble de la machinerie nécessaire à cette transmission horizontale mais peuvent être transférés avec les plasmides conjugatifs puisqu'ils contiennent au minimum une relaxase et un gène *oriT*. Les plasmides non-mobilisables (MOB – ; MPF –) ne présentent pas ces éléments (**Figure 15 A**) **(218,261)**.

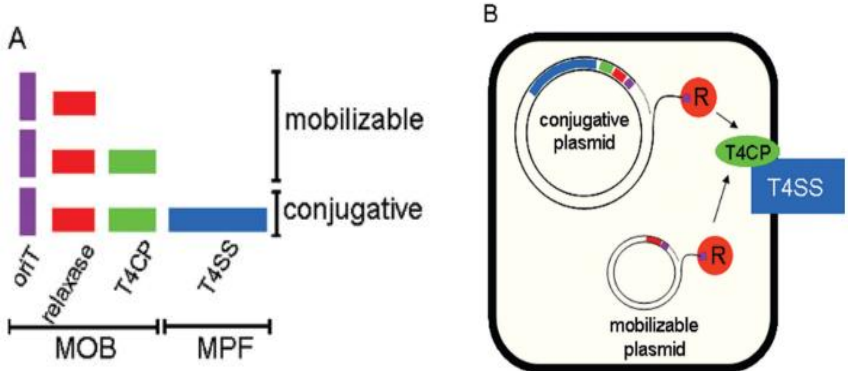


Figure 15. Structure schématique d'un plasmide transmissible (218). Les différents types de plasmides sont associés à la présence ou non de 4 constituants codant pour une origine de transfert (OriT), une relaxase (R), une protéine de couplage (T4CP) et un système de sécrétion de type 4 (T4SS).

Les plasmides sont considérés comme ubiquistes et présents dans de nombreux taxons bactériens. Ils présentent des gènes qui vont apporter un avantage sélectif sans pour autant être essentiel à son hôte. Les plasmides de dégradation vont apporter une capacité métabolique supplémentaire. Ils ont un intérêt majeur en biotechnologie. Par exemple un plasmide de type IncP, pCAR1 a été identifié chez des *Pseudomonas* dans l'environnement. Il présente un mécanisme de dégradation d'un composé chimique issu de l'activité humaine : le carbazole. Ce composé qui peut être toxique, va apporter un avantage compétitif aux porteurs de ce plasmide s'il est présent dans l'environnement **(262)**. Un plasmide non-conjugatif de type $IncFIB_K$ qui code les sidérophores aérobatine/salmocheline et le régulateur RmpA de la production d'une capsule sera associé chez les *K. pneumoniae* au pathotype hypervirulent et à une capacité invasive plus importante (ex : pLVPK) **(106,107,109,263)**. Pour le genre *Escherichia*, différents pathovars sont caractérisés par la présence de gènes portés par des plasmides de virulence spécifiques de type IncF. Ces gènes codent les facteurs d'adhésion et les toxines à l'origine des symptômes diarrhéiques notamment chez les ETEC (pAVM + facteur de colonisation + toxine) et les EAEC (pAA + opéron *aaf-agg*) **(21,22)**. Enfin, en ce qui concerne l'antibiorésistance, le rapide succès des entérobactéries à contrer les traitements antibiotiques peut s'expliquer par le partage de gènes de résistance entre espèces par ces éléments génétiques mobiles qui codent pour des enzymes mais aussi des systèmes de pompe à efflux **(134,168)**. En effet, les plasmides de résistance sont des « vecteurs parfaits » pour la diffusion de ces gènes à travers le monde bactérien **(238)**. Tous ces plasmides étaient présents dans la population bactérienne bien avant l'utilisation des antibiotiques **(264)**. Ils ont donc au fur et à mesure acquis un panel de gènes de résistance et ont largement diffusé dans des biotopes sélectifs.

a) Systèmes de classifications des structures plasmidiques

Les plasmides des entérobactéries font parties des plus étudiés et séquencés à l'heure actuelle **(265)**. Correctement identifier les structures plasmidiques en présence notamment chez une bactérie multirésistante, est aujourd'hui crucial pour mieux comprendre les dynamiques de diffusion des gènes associés. Pour se faire, plusieurs systèmes de classification et de typage plasmidique ont été proposés au fil des améliorations techniques et des connaissances. La classification fondée sur les groupes d'incompatibilité (Inc) reste l'approche historique. Elle s'appuie sur l'incapacité pour deux plasmides partageant le même mécanisme de réplication de cohabiter dans la même bactérie et donc de se retrouver en même temps dans les cellules filles. Ces groupes d'incompatibilité ont initialement été déterminés en laboratoire par des expériences de conjugaison ou de transformation. On compte aujourd'hui plus de 23 groupes différents (B,C, D,E, FI, FII, FIII, FIV,H,$I\alpha$,I_2,$I\gamma$,$I\delta$,$I\zeta$,J, K, M,N, P, T, V, W, X) **(238,266)**.

Cette méthode de classification longue et fastidieuse a permis de développer par la suite une méthode moléculaire fondée sur le typage par PCR de la séquence associée à l'initiation de la réplication plasmidique (Inc/rep PCR). Cette identification par typage proposée par Carattoli A. et ses collègues permet de différencier avec des PCR multiplex spécifiques chacun des groupes d'incompatibilité historiques. Cette approche est l'une des plus utilisées pour les entérobactéries et cible notamment le gène plasmidique *repA* **(267)**. Il est aussi possible de détecter ces groupes *in silico* après séquençage complet, grâce notamment à des outils dédiés fondés sur les mêmes cibles comme PlasmidFinder ou MOB-recon (dépendance de MOB-

suite). Des schémas pMLST spécifiques sont aussi proposés par ces outils (IncA/C, IncF, IncHI1, IncHI2, IncI et IncN) **(261,268,269)**. Les principaux groupes d'incompatibilité et réplicons des *Enterobacterales* sont représentés sur la **Figure 16 (265)**.

Une seconde méthode de classification par typage existe. Elle est basée sur la relation phylogénétique entre les relaxases impliquées dans la mobilité plasmidique (DPMT). Cette classification prend aussi en compte les protéines auxiliaires et de couplage. Par cette approche plus récente, les plasmides conjugatifs et mobilisables ont été classés en 6 grandes familles MOB pour « MOBility » : MOB_C, MOB_F, MOB_H, MOB_P, MOB_Q et MOB_V. Chacune de ces familles peut ensuite être subdivisée selon des variations de motifs et des analyses phylogénétiques associées à la relaxase **(270)**. Cette subdivision apporte une information supplémentaire entre l'association d'une relaxase MOB et une structure MPF. C'est le cas notamment pour la famille MOB_F : MOB_{F12} (MOB_{F12} + MPF_F), MOB_{F11} (MOB_{F11} + MPF_T) et MOB_{F13} (MOB_{F13} + MPF_C) **(219,271)**. Ce typage est possible *in-situ* avec l'outil MOB-typer (dépendance de MOB-suite) **(261)**. La méthode DPMT a par ailleurs permis de détecter des structures plasmiques qui n'étaient pas initialement assignées à un groupe d'incompatibilité. La cible de ce typage étant la relaxase, il n'est pas possible d'identifier les plasmides non-mobilisables (MOB – ; MPF –).

Ces deux schémas restent suffisamment exhaustifs dans une première approche pour connaître les types de plasmide en présence lorsque l'on s'intéresse aux entérobactéries. Cependant, comme décrit pour les analyses d'espèces, ce typage ne permet au final qu'un regroupement selon l'homologie d'une petite partie de la séquence et ne donne pas de notion évolutive approfondie **(267,270)**. La mise en place d'une nomenclature structurelle appropriée des plasmides reste complexe mais serait une réelle avancée dans la compréhension de la biologie des plasmides et des relations avec leur hôte bactérien **(271)**. Récemment une nouvelle approche a été développée par l'équipe de De La Cruz F. en plus de leurs travaux sur la relaxase. Par l'analyse des séquences complètes de plus de 10 000 plasmides de bactéries, ils ont pu créer différentes unités taxonomiques plasmidiques (PTU) qui présentaient de fortes homologies structurales et stables, à l'image du concept d'espèce bactérienne et de la formule ANI. Ces unités étaient au nombre de 276 et ont soit été retrouvées au sein de plusieurs phylums analysés (grade VI de diffusion) ou au contraire trouvées restreintes à une espèce (grade I de diffusion) **(265)**. Par ce nouveau concept, l'équipe a mis en évidence que les PTU sont généralement regroupées selon l'origine taxonomique de l'hôte. Il n'y a pas de distribution au hasard de ces structures chez les bactéries. Cette préférence d'hôte était cependant moins marquée chez les entérobactéries pour lesquelles de nombreuses PTU étaient partagés entre différents genres (**Figure 16**). Les études associées à l'approche PBRT de Carattoli A. *et al.* avaient déjà permis de souligner que tous les types de plasmides n'étaient pas représentés de la même manière chez les entérobactéries **(268)**. Par ailleurs l'analyse de séquences complètes et des PTU a confirmé que cette méthode de typage n'est pas suffisamment robuste, car des plasmides d'un même groupe d'incompatibilité peuvent présenter de grandes différences structurelles et génétiques (IncF > 8 PTU). Grâce à l'avènement du séquençage plasmidique, il est aujourd'hui possible d'interroger cette base et connaître le PTU associé à un plasmide *via* un outil nommé COPLA. Cette approche couplée à un séquençage spécifique devrait permettre de mieux définir les plasmides de résistance « épidémiques » à l'avenir **(265,271,272)**.

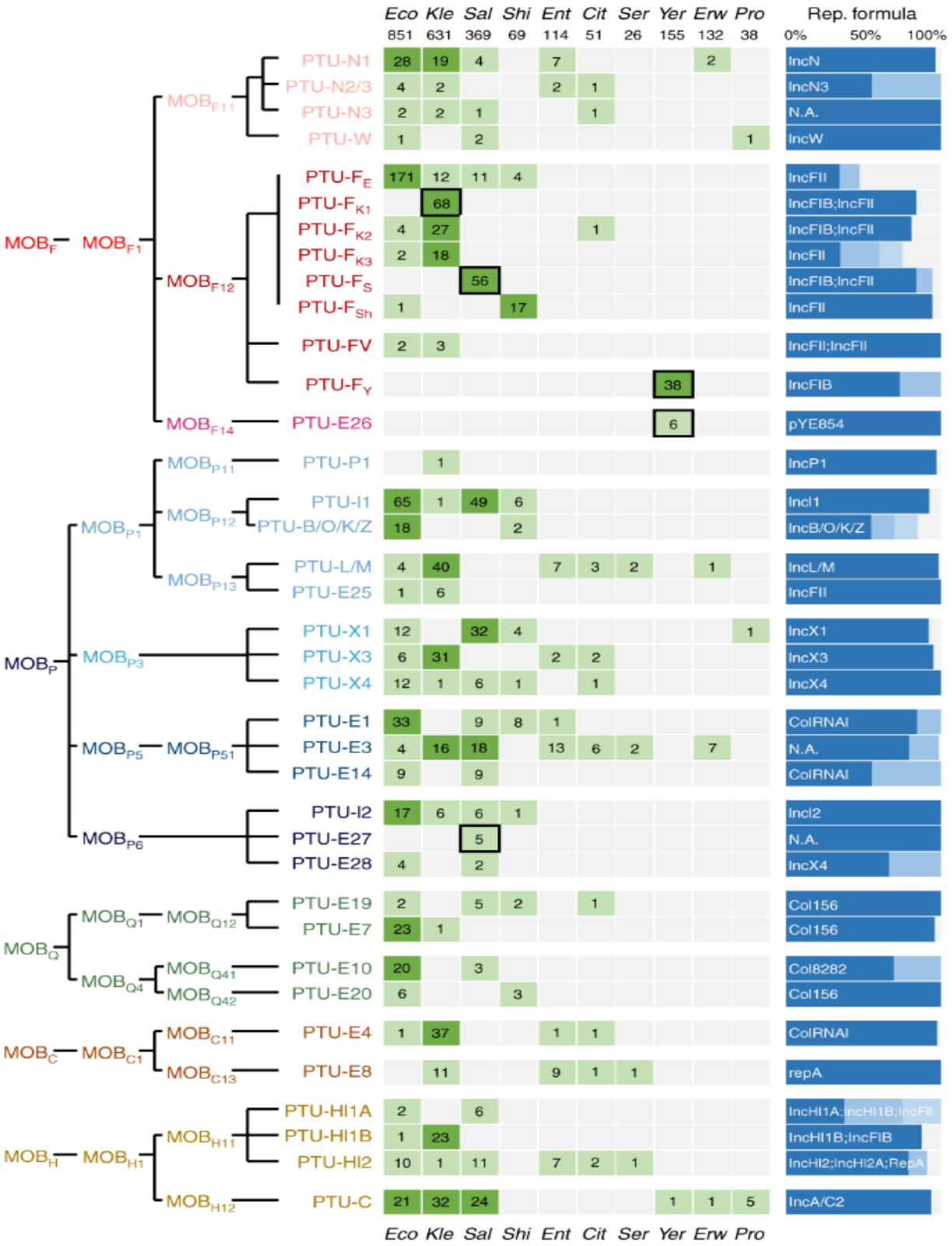


Figure 16. Liste des principaux PTU mobilisables et conjugatifs retrouvés chez les *Enterobacterales* selon les travaux de Redondo-Salvo S. *et al.* (265). Cette vue d'ensemble des schémas de classification des plasmides indique les principaux types de MOB (schéma DPMT) et le nom du PTU associé sur les colonnes de gauche ; les nombres dans les cases correspondent aux nombres de structures plasmidiques similaires isolées chez les principaux genres de cette ordre lors de l'étude, avec Eco : *Escherichia*, Kle : *Klebsiella*, Sal : *Salmonella*, Shi : *Shigella*, Ent : *Enterobacter*, Cit : *Citrobacter*, Ser : *Serratia*, Yer : *Yersinia*, Erw : *Erwinia*, Pro : *Proteus* et *Providencia* ; le nombre sous chaque genre représente le nombre total de plasmides retrouvés ; les cases quadrillées avec une marge noire représentent les PTU exclusivement présents dans ce genre ; la barre bleue à droite indique la structure de réplicon (schéma PBRT) la plus répandue pour un PTU donné (N.A. non applicable).

b) Principaux groupes d'incompatibilité chez les entérobactéries résistantes

Comme le souligne une récente revue de la littérature sur la distribution globale des plasmides de résistance en se fondant sur les schémas de classification précités, une variation entre les continents et les compartiments est observable (**Figure 17**) **(238,268)**. Cette distribution reste cependant indicative et sera sûrement amenée à beaucoup évoluer et à s'affiner avec l'augmentation croissante des recherches associées et de la grande adaptabilité des populations bactériennes **(273)**.

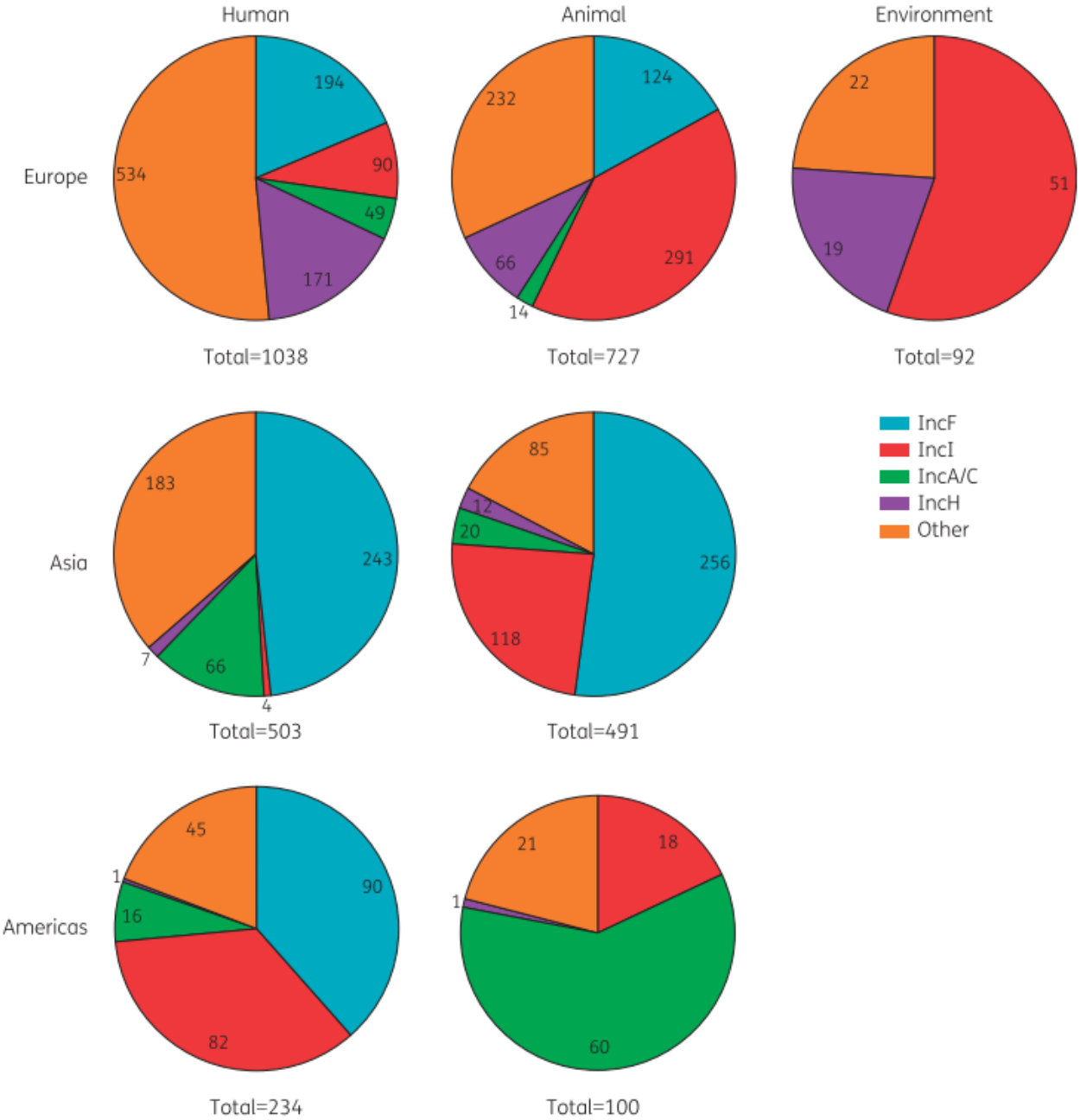
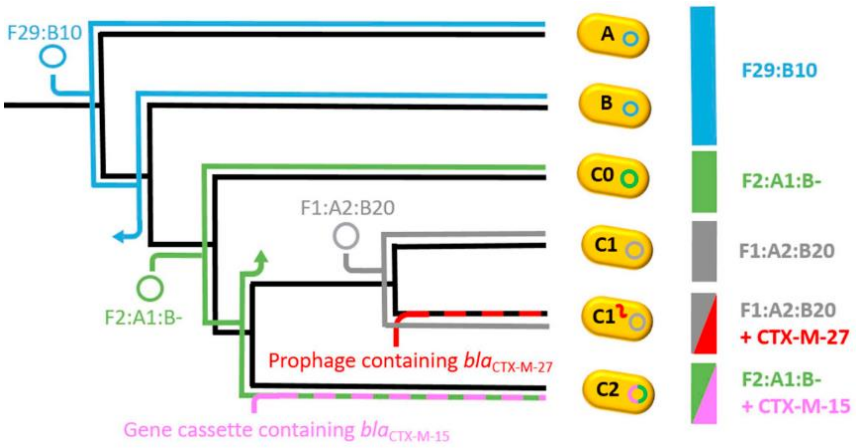


Figure 17. Répartition des principaux groupes d'incompatibilité de plasmide (Inc) présentant des gènes de résistance au sein des entérobactéries, selon les compartiments et les continents (238). Le typage résulte du schéma PBRT ; cette figure inclus des publications de 2000 à 2017 ; la section « Other » comprend les groupes d'incompatibilité suivant : ColE, IncB/O, IncK, IncL/M, IncN, IncP, IncR, IncT, IncU, IncW, IncX, IncY et IncZ.

Parmi les plasmides de résistance les plus représentés chez les entérobactéries on retrouve le groupe IncF avec une forte proportion de gènes codant pour des BLSE, principalement chez l'homme mais aussi chez les animaux domestiques **(238)**. Cette observation semble être aussi possible au sein de la faune sauvage **(187)**. Les plasmides de ce groupe appartiennent à la famille MOBF et notamment à MOB_{F12} (relaxase ; **Figure 16**). Ils sont classés comme suit : IncFIA, -FIB, -FIC et -FII (ou –FIIA). Une sous division plus récente pour le dernier réplicon inclus par ailleurs une préférence d'hôte avec : -FII_S (*Salmonella* spp.), et -FII_K (*Klebsiella* spp.) pour les *Enterobacteriaceae,* et -FII_Y (*Yersinia* spp.) chez les *Yersiniaceae* **(268,270,274)**. Par définition, ces plasmides présentent donc en général un spectre d'hôtes étroit et sont notamment associés aux genres *Klebsiella* et *Escherichia* selon les réplicons **(21,178,265,268,275)**. Ils ont une faible efficacité de transfert en comparaison avec d'autres groupes d'incompatibilité comme par exemple IncC (30-40% contre 100%) **(276)**. Ces plasmides de résistance peuvent présenter une importante hétérogénéité en dehors de la région associée à la conjugaison **(265,271)**. Il est par ailleurs courant d'identifier des structures mosaïques ou multi-réplicons qui rendent leur classification par le schéma PBRT plus complexe **(274)**. En effet, du fait de cette structure en mosaïque, il n'est pas possible en l'état d'obtenir un typage unique pour ces éléments génétiques mobiles ce qui peut limiter leur suivi épidémiologique. Des formules « FAB » assignant un type et un nombre d'allèles pour chaque réplicons permettent de mieux les distinguer entre eux. Par exemple, la formule [K7:A10:B-] correspond au profil IncF RST (replicon typing scheme) : FIA(10); FIB(-); FIC(-); FII(-); FII(7); FII_S(-) et FII_Y(-) **(268,274)**.

L'une des clés du succès d'*E. coli* ST131 résulte dans le pattern de gènes de résistance qu'il peut présenter. Johnson TJ *et al*. ont démontré une association entre différentes combinaisons alléliques du groupe d'incompatibilité IncF et les clades de cette lignée et un coût faible de leur portage facilitant leur rétention **(38)**. Plusieurs acquisitions et pertes de matériel génétique ont été observées au sein de ce complexe clonal au cours du temps. En effet, un plasmide [F29:B10] sera généralement associé aux clades A et B. Parmi les membres du clade C, on retrouve différents schémas associés ou non à une CTX-M. Les réplicons [F1:A2:B20] et le gène *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}27}$ seront retrouvés au sein du sous-clade C1 **(54)**. Tandis que le sous-clade C2 sera généralement associé à un plasmide de type [F2:A1:B-] ayant acquis des cassettes de gène de résistance associées à *aac(6')Ib-cr*, *bla*$_{OXA\text{-}1}$, *catB4* et *tetAR* avec en plus le gène *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ (**Figure 18**) **(37,38)**. De façon globale ce ST fait partie des principales lignées ayant largement contribué à la diffusion des gènes de résistances aux antibiotiques et notamment les CTX-M par ces plasmides. Cette co-évolution plasmide / hôte est aussi observable au sein d'une lignée émergeante d'*E. coli* : ST1193 **(275)**.



Sérotype	Clade	Typage *fimH* majoritaire	FQ
O16:H5	A	*fimH41*	S
O25b:H4	B	*fimH22*	S
O25b:H4	C	*fimH30* (-S)	S
O25b:H4	C	*fimH30* (-R)	R
O25b:H4	C	*fimH30* (-R)	R
O25b:H4	C	*fimH30* (-Rx)	R

Figure 18. Histoire évolutive simplifiée des clades d'*E. coli* ST131, et association aux principales formules FAB du groupe d'incompatibilité plasmidique IncF (37). Les flèches indiquent la perte de matériel génétique ; la colonne FQ correspond aux phénotypes (Sensible ou Résistant) contre les fluoroquinolones associés à des mutations spécifiques au sein de la région QRDR.

Les plasmides IncH (MOB_H) initialement mis en évidence au sein des genres *Salmonella* et *Serratia*, sont aussi décrits dans de nombreux genres bactériens comme *Escherichia* ou encore *Enterobacter* **(61,265,270,277)**. Ils présentent un faible nombre de copie par cellule (1 à 2), une grande taille (> 250 Kb) et une structure initiale relativement bien conservée **(277,278)**. On compte différents groupes dont IncHI1, IncHI2, IncHI3 et IncHII **(238)**. L'une des particularités des plasmides IncHI est l'intervalle de températures permettant une conjugaison entre bactéries. De nombreuses études centrées sur ce groupe ont en effet démontré une bonne efficacité de conjugaison seulement pour des températures inférieures à 30°C **(81,238)**. Cette particularité a notamment été étudiée par Gibert M. et son équipe. D'après leurs travaux, l'expression d'une protéine membranaire (TrhR) et d'une protéine cytoplasmique (TrhY), codées par le plasmide, sont associées à l'activation des opérons de transfert (associés à la région *tra*) et par effet cascade à l'initiation de la conjugaison plasmidique. L'action de ces 2 protéines est cependant régulée par différents mécanismes. Tout d'abord la protéine HtdA va contrecarrer en partie l'activité de TrhR / TrhY à basse température. Tandis qu'à des températures plus importantes (37°C), c'est la surexpression d'un complexe de protéines H-NS/Hha codées par le plasmide et le chromosome bactérien qui va réprimer le gène associé à la protéine TrhR et totalement bloquer l'initiation du transfert **(279,280)**. En ce qui concerne le schéma DLST pour les plasmides IncHI2 basé sur deux locus (*smr0018* / *smr0199*), celui-ci a permis de distinguer initialement deux ST. Les analyses associées ont suggéré que le ST1 serait le type prédominant dans les infections multirésistantes chez l'homme, tandis que le ST2 serait retrouvé particulièrement chez les animaux **(278)**. Depuis, 14 autres ST ont été identifiés et sont reportés sur PubMLST (https://pubmlst.org/). En plus de la diffusion de gènes codant pour des BLSE et différentes familles d'antibiotiques, ces plasmides sont aussi associés à la diffusion de nombreux gènes de résistance aux biocides et surtout aux métaux lourds **(61,85,86,191,281)**.

Enfin comme dernier exemple, les plasmides du groupe IncI ont été souvent identifiés à travers le monde chez les animaux (domestiques et sauvages ; **Figure 17**), avec une forte prévalence d'association avec un gène codant une enzyme CTX-M-1 chez les souches BLSE. Leur circulation entre compartiments a par ailleurs été documentée en Amérique et en Europe notamment (IncI1/ST3/*bla*$_{\text{CTX-M-1}}$) **(43,238,282)**. Ce groupe plasmidique a aussi été associé avec des céphalosporinases de type *bla*$_{\text{CMY}}$ **(44)**. Il correspond à la famille MOB$_{\text{P}}$ et au complexe plasmidique « I ». Comme IncF, ces plasmides présentent un spectre d'hôte restreint et sont souvent retrouvés chez des lignées spécifiques d'*E. coli* **(238,270)**. En outre, les plasmides de type IncI présentent une région « shufflon » Cette région correspond à un site de recombinaison spécifique. De récents travaux ont par ailleurs souligné l'impact d'une recombinaison spécifique au sein de la région codant pour les *pili* conjugatif de ce type de plasmide (*Hft* ; high frequency transfer). Cette modification a engendré par la suite une surexpression d'une protéine (TraA) associée à la régulation des pili. Les bactéries porteuses de ce plasmide mutant présentaient un changement de structure avec une « hyperpiliation », associée à un taux de transfert bien plus important de l'élément génétique mobile, qui a été considéré par les auteurs comme « super-disséminateur » dans cette conformation **(283)**.

D'autres combinaisons entre la présence d'un plasmide et de gènes de type BLSE ont été recensées comme IncK/*bla*$_{\text{CTX-M-14}}$, ou IncN/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ pour les CTX-M, mais aussi IncX3/*bla*$_{\text{SHV-12}}$ par exemple **(159,238)**. Les céphalosporinases plasmidiques restent en comparaison moins importantes **(131,142)**. Par ailleurs, les plasmides de type Col représentent une famille spécifique puisque l'on retrouve sur ces éléments génétiques des gènes codant pour des colicines notamment. Ce sont des protéines toxiques de la famille des bactériocines qui vont tuer ou inhiber la croissance des bactéries présentes dans le même environnement et ne possédant pas cet élément génétique mobile. Ils jouent un rôle dans les phénomènes de compétition notamment chez *E. coli* **(284)**. Ils peuvent aussi présenter des gènes de résistances à différentes familles et notamment aux carbapénèmes **(159,197,238)**.

c) Coût biologique et maintien plasmidique

En résumé, les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être regroupés ensemble sur des éléments génétiques mobiles. De ce fait l'action spécifique de chacun de ces gènes sur des classes d'antibiotiques différentes apporte un degré de résistance élevé aux traitements. On parle de multirésistance et à l'image d'un chevalier on se retrouve petit à petit face à des bactéries qui vont présenter une armure presque complète (sensible → pan-résistant). L'accumulation de gènes de résistance sur ces structures va en effet aboutir à la création de « super-plasmides » qui sont de véritables arsenaux de survie pour les bactéries en clinique. Une étude américaine a par exemple mis en évidence un plasmide IncHI2 circulant entre plusieurs espèces d'entérobactéries avec 23 gènes de résistance associés à 12 classes d'antibiotiques différentes ! Ce dernier présentait notamment un gène codant pour une carbapénémase (*bla*$_{\text{IMP-4}}$), 2 gènes associés à la production d'une BLSE (*bla*$_{\text{CTX-M-9}}$, *bla*$_{\text{SHV-12}}$) et même un gène de résistance à la colistine (*mcr-9*) **(191)**.

L'acquisition d'un plasmide va permettre une adaptation rapide des cellules dans un environnement donné, une réponse effective à différents stress et un avantage compétitif face à

d'autres micro-organismes. Il sera donc bénéfique pour son hôte. La résistance aux traitements antibiotiques est l'un des points les plus étudiés c'est aussi le plus problématique en santé humaine. La pression de sélection engendrée notamment par l'antibiothérapie ou le mésusage de ces molécules permet un maintien de ces combinaisons et facilite l'adaptation du plasmide avec son hôte. Ceci va aussi sélectionner positivement les « chevaliers » qui auront tout « le champ de bataille » de libre pour se développer et former une « véritable armée ». Comme décrit précédement, en plus des gènes de résistance aux antibiotiques, différents gènes accessoires peuvent aussi apporter un intérêt sélectif et compétitif à son hôte comme la tolérance à des métaux lourds et des composés chimiques (ex : tellurite, carbazole), la production de différentes toxines (ex : colicine) ou de systèmes de capture de fer (ex : salmocheline, aérobactine) **(106,262,284,285)**.

Si l'on garde la métaphore du chevalier et de son armure, l'apport de ces plasmides de résistance reste théoriquement utile seulement en « temps de guerre » pour protéger au mieux face une antibiothérapie notamment. À l'inverse, dans un environnement n'apportant pas pression de sélection spécifique, et en « temps de paix » le maintien de ces plasmides ou de cette armure va engendrer un coût biologique ou un fardeau puisque l'avantage sélectif est effacé. Il a par exemple été souligné que l'acquisition d'un plasmide de résistance pKP33 (IncN, 73 152 pb) chez KPNC et des souches d'*E. coli* engendrait une diminution du taux de croissance en comparaison avec les mêmes lignées sans ce plasmide. Celui-ci était par ailleurs variable selon l'espèce considérée (de 6 à 12,5%) **(242)**. Des phénomènes de compétition et d'exclusion avec les bactéries plus « simples » sans ce plasmide vont limiter la prévalence de bactéries résistantes au sein du microbiome en l'absence de traitement **(242)**. Par ailleurs, les plasmides peuvent engendrer des modifications structurels de l'hôte afin de faciliter leur transfert **(283)**. Si la conjugaison plasmidique et les transferts horizontaux perdurent de façon importante au sein d'une population bactérienne cette compétition par la croissance peut être diminuée **(220)**.

Un plasmide nouvellement acquis dans une population de transconjugants peut être instable et ne sera donc pas obligatoirement maintenu. Le transfert vertical aux cellules filles (réplication et ségrégation) est le premier moyen pérenne pour qu'un plasmide perdure. Différentes stratégies de compensation et de maintenance peuvent être mises en place pour permettre une persistance de cet élément au sein de la descendance. Les études associées au coût biologique de la résistance sont généralement focalisées sur des données *in-vitro*. Étonnamment, ce coût serait plus important lorsque la résistance découle d'une mutation chromosomique en comparaison d'une acquisition plasmidique. Par ailleurs une mutation sur le chromosome apporte généralement une résistance à une classe d'antibiotique tandis qu'un plasmide peut être associé à plusieurs gènes de résistance à la fois **(151)**. Le nombre de gènes accessoires va augmenter le coût, et ces éléments génétiques mobiles peuvent aussi interagir entre eux au sein de leur hôte pour le faire varier **(223)**.

L'association plasmide / hôte est un processus complexe et dynamique. Une adaptation par des mutations dans le chromosome et/ou au niveau du plasmide en question vont permettre une diminution de ce coût (mutations compensatoires) **(151,286)**. Ces phénomènes ne suivent cependant pas un « mécanisme universel » et peuvent être propres à une association donnée. Par exemple, chez des lignées de *Pseudomonas* ayant évolué de manière expérimentale, il a été

démontré que des mutations chromosomiques associées à des hélicases et l'ARN polymérase pouvaient permettre une meilleure conservation d'un plasmide. Les hélicases sont en effet impliquées dans de nombreux aspects du métabolisme de l'ADN et de l'ARN (réplication, réparation, recombinaison, transcription, traduction) **(287)**. La coévolution des plasmides de résistance IncF au sein de différentes lignées d'*E. coli* ST131 illustre aussi ce phénomène de compensation (**Figure 18**) **(37,38)**. En effet ils sont généralement présents en faible copie chez leur hôte et présentent un spectre de transfert étroit ce qui va limiter leur capacité de diffusion horizontale. Pour assurer leur propagation et leur stabilité au sein d'une lignée ils doivent donc présenter le plus faible coût biologique possible. Il a été démontré que le plasmide de résistance [F2:A1:B-] chez l'un des clades de ce ST présentait un impact très faible presque négligeable lors de tests de compétition avec des lignées sans plasmide **(288)**. De plus, une comparaison des transconjugants d'*E. coli* ayant capté un plasmide [F2:A1:B-] contre IncC-IncR a aussi souligné que les IncF étaient bien plus adaptés à cette espèce. En effet, après plusieurs générations, les transconjugants avec le plasmide IncC-IncR présentaient de nombreux réarrangements plasmiques et chromosomiques mais pas avec IncF **(276)**. Par ailleurs pour un plasmide donné, ces mutations auront une plus grande efficacité dans le maintien au sein d'une population bactérienne si elles sont localisées sur le plasmide et non sur le chromosome. En effet, lors d'évènements de conjugaison importants les cellules receveuses naïves ne présenteront pas de mutation d'adaptation spécifique et seront donc plus affectées par ce nouvel élément qu'elles devront compenser **(289)**. L'adaptation d'un plasmide à un hôte permet donc une meilleure diffusion de ce dernier au sein d'autres espèces et de lignées **(286)**.

Lors de la réplication plasmidique, des recombinaisons homologues peuvent se créer pour former des multimères de plusieurs plasmides. Pour limiter cette première erreur qui empêchera le partage équitable de plasmides entre cellules filles, il existe des systèmes de résolution de multimètre codant notamment pour une résolvase **(286)**. Pour assurer leur maintien, ces éléments génétiques peuvent aussi être dotés de systèmes de partition comme parA/parB, et d'addiction de type toxine/antitoxine **(21,281)**. En ce qui concerne les systèmes d'addiction, il existe différents types selon l'antitoxine et son point d'action (n=6). Leurs fonctions sont multiples au niveau métabolique et dans la survie des bactéries. Les systèmes de type II sont les plus étudiés et sont aussi généralement associés au maintien plasmidique **(290)**. La protéine antitoxine va se lier directement à la toxine. Ces deux protéines sont produites de façon équivalente et le complexe formé va inhiber l'activité toxique. Par ailleurs, si l'une des cellules filles ne présente pas ce plasmide, l'antitoxine toujours présente dans son cytoplasme va rapidement se dégrader. La toxine étant plus stable celle-ci va bloquer la croissance de la bactérie ce qui va aboutir à sa mort prématurée. Il y a donc une élimination des cellules filles sans le plasmide suite à un défaut de ségrégation ou de réplication (« post-segregational killing ») **(223,290)**. On retrouve par exemple les complexes ccdA/ccdB, hipA/hipB, relE/relB ou encore yacA/yacB. Ces modules ont été décrits chez des plasmides de type IncF, IncH, IncI mais aussi chez des éléments plus rares comme IncJ **(19,21,238,276,278,281)**. Tous ces modules toxine/antitoxine sont référencés sur le service TADB dédié **(290)**. En plus d'être présents en clinique ils ont aussi été identifiés dans des structures plasmidiques issues d'autres compartiments comme la faune sauvage **(43)**. Par exemple le plasmide de virulence pINV retrouvé chez les EIEC et *Shigella* présente différents systèmes toxine/antitoxine et notamment

le module MvpAT, dont la toxine est une endonucléase qui va s'attaquer spécifiquement à l'ARNt de la cellule. Son expression est essentielle dans certaines conditions environnementales pour que le pathogène ne pas perdre son plasmide qui présente un coût biologique important pour la cellule (T3SS) **(23)**.

Pour rester le plus stable possible au sein d'une population et ne pas être perdu, les plasmides doivent présenter une importante plasticité. La suppression de composants est une autre approche mise en place pour limiter leur coût biologique et éviter d'être éliminé. Pour reprendre l'exemple du plasmide de virulence pINV, il a été démontré qu'il pouvait y avoir une suppression de l'îlot de pathogénicité (T3SS) très couteux, plutôt que l'élimination du plasmide en entier pour assurer la compétitivité des bactéries **(23)**. Ce type d'observation a aussi été retrouvé lors de protocole expérimentaux chez *E. coli* pour le plasmide de résistance pKP33 évoqué précédemment. Le plasmide testé a perdu des gènes de résistance et surtout une région associée à la conjugaison. Après plusieurs générations, il ne présentait plus les gènes associés à la formation du pilus (T4SS). Ce changement n'était pas observable chez KPNC avec le même élément génétique mobile, ce qui suggère aussi une adaptation espèce-dépendante **(242)**. D'autres auteurs ont aussi mis en évidence des délétions au niveau de cette région *tra* pour des plasmides IncF chez *E. coli* et chez KPNC **(178,288)**. Une intégration bénéfique des gènes au niveau du chromosome suivie d'une perte du plasmide est aussi observable **(241)**. À l'inverse les plasmides peuvent aussi acquérir des gènes « utiles » à leur hôte comme de nouvelles résistances. D'autres types de transpositions peuvent grandement favoriser leur maintien comme par exemple sur un plasmide expérimental et mobilisable de type IncP. Après plusieurs générations, celui-ci a acquis un transposon non-composite Tn*6231* qui code notamment pour une résolvase (TnpR) permettant la résolution des multimètres, et un système toxine/antitoxine (Tad/Ata-like) **(286)**.

En résumé, il est aujourd'hui primordial de comprendre de façon globale les éléments génétiques structurels et fonctionnels qui vont favoriser le maintien et la propagation des plasmides de résistance pour limiter la création de réservoirs. En effet, il a par exemple été souligné qu'au sein des les biofilms les communautés microbiennes associées pouvaient renfermer des structures plasmidiques plus persistantes **(291)**.

d) Suivi génétique des micro-organismes et le défi du séquençage plasmidique

Grâce au développement croissant des technologies de séquençage et d'analyses bio-informatiques associées, les méthodes traditionnelles de type Sanger ou plus spécifiques comme l'ARN16S ont été remplacées par des approches de séquençage haut-débit de « seconde génération » *via* des plateformes spécialisées. Parmi elles, la technologie Illumina prédomine notamment dans le domaine de la microbiologie. Elle est fondée sur une approche de séquençage par lecture de fragments d'ADN complémentaires fixés à une flow-cell. La synthèse *de novo* initiée par cette lecture (polymérase) permet l'incorporation de nucléotides libres marqués (fluorescents) et la création d'un signal lumineux spécifique interprété en séquence. Les principaux avantages qu'apportent cette méthode sont une rapidité d'exécution

(jours), un coût en constante diminution, mais surtout une bonne précision avec des taux d'erreur de lecture très bas (0,1%) **(292)**.

En épidémiologie, que ce soit chez l'homme ou encore les animaux domestiques, les infections dues à des bactéries pathogènes ou résistantes aux traitements peuvent être suivis précisément par ce type de séquençage et à travers des lignées et clones spécifiques (ex : ST131) **(292)**. Ces approches phylogénétiques se retrouvent aussi en clinique dans le cadre d'épidémies nosocomiales par exemple, afin de mieux cerner l'origine, et d'approfondir les mécanismes de diffusion pour les endiguer **(76)**. Le séquençage a aussi été très utile pour mieux comprendre les épidémies passées **(121)**.

Dans le cadre de bactéries résistantes, les gènes associés sont mis en évidence par l'annotation du génome et l'utilisation de bases de données spécifiques **(293)**. Pour affiner la compréhension de leur propagation, les plasmides associés sont généralement typés grâce à différents schémas de classification comme les groupes d'incompatibilités ou les relaxases (PlasmidFinder, pMLST, MOB-suite) **(238,261,267,268,270)**. Il est donc possible par cette méthode de séquençage de connaître les marqueurs plasmidiques en présence ainsi que les gènes de résistance sans pour autant les associer avec certitude. Il est seulement possible de créer des clusters présence / absence ou de similarité de séquence. On peut aussi soumettre les contigs portant les résistances dans des bases de données plasmidiques ou inversement comparer des plasmides circularisés à une séquence complète **(15,31,136,268,275,293)**. Cette association peut être appuyée par une transformation ou une conjugaison en laboratoire puis du séquençage de transconjugants afin d'attester la présence des gènes de résistance sur un plasmide **(238)**.

La technologie de séquençage Illumina reste fondée sur des petits fragments qui seront par la suite assemblés en une ébauche d'assemblage (contig-scaffold). On parle de « short-reads » avec une taille inférieure à 500pb **(292,294,295)**. Cette technologie ne permet pas en l'état un suivi efficace de la structure plasmidique complète. Ces éléments génétiques mobiles peuvent être bien plus grands que 500 pb, et seront de ce fait fractionnés en plusieurs contigs et non circularisés. L'assemblage final ne sépare pas avec certitude les contigs associés au chromosome bactérien de ceux correspondant au(x) plasmide(s). Les gènes accessoires comme les gènes de résistance ne pourront pas non plus être correctement associés **(296)**. La localisation précise des gènes de résistance reste primordiale à déterminer puisque comme suggéré auparavant, une présence sur un plasmide augmente la probabilité de diffusion dans un environnement donné et vers des lignées bactériennes plus ou moins pathogènes. À l'inverse, la présence « naturelle » ou l'intégration fortuite sur le chromosome, parfois en plusieurs copies, peut faciliter le maintien stable indépendamment d'une pression de sélection extérieure **(168,183,241)**. En raison de la grande variété de plasmides existant, il est important de savoir si la diffusion de gènes de résistance est due à un plasmide dit « épidémique » ou à la présence d'un clone présentant des plasmides de résistances spécifiques comme pour les différents clades d'*E. coli* ST131 avec des plasmides spécifiques du groupe IncF et des gènes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ ou $bla_{\text{CTX-M-27}}$ (**Figure 18**).

Pour combler cette lacune, de nombreux outils ont été proposés pour assigner et séparer les séquences plasmiques d'un assemblage ou de données métagénomiques (**Tableau 3**). Chacun de ces outils présente des performances spécifiques selon l'approche et les bases de données utilisées. En termes d'assignation, le risque de faux positifs et de faux négatifs en raison d'une petite taille du contig, d'éléments répétés et de diverses insertions, reste variable dans les analyses comparatives. Cette approche novatrice peut demander d'utiliser pour le moment une combinaison d'outils ou des valeurs seuils spécifiques **(261,297–299)**. Par ailleurs, d'un point de vue technique, beaucoup de ces logiciels restent limités à la fraction cultivable. Pour passer outre cette culture de bactérie, des outils comme PlasFlow permettent aussi une analyse sur des données métagénomiques afin d'avoir une vision complète du plasmidome d'un échantillon **(299)**. À cela s'ajoute des approches d'assemblage plasmidique *de novo* spécifiques comme proposé par une extension de SPades (PlasmiSPades). Cependant, cette approche ne semble pas assez robuste en l'état pour les entérobactéries BLSE, pour lesquelles la présence de séquences chromosomiques a été mise en évidence tandis que les plasmides de type IncHI2 n'étaient pas correctement reconstruits **(300)**.

Grâce aux progrès technologiques et aux nouvelles approches proposées, il est aussi possible d'opter pour un séquençage « long-reads » par les technologies Pacific Biosciences ou Oxford Nanopore. La première est semblable à celle développée pour l'Illumina. Cependant, c'est la polymérase qui est fixée à la flow-cell et non des fragments d'ADN complémentaires **(292)**. La seconde est fondée sur le passage de brins à analyser dans un nanopore. Ce passage va entrainer une perturbation du champ électrique spécifique à chaque nucléotide. Il n'y a pas de séquençage par polymérase et c'est le signal électrique spécifique qui sera interprété en séquence. Les longueurs d'ADN lues par ces approches permettent de passer outre la problématique d'assemblage des séquences répétées et surtout d'obtenir plus facilement un seul contig par plasmide. Cependant, contrairement à l'Illumina les erreurs de lecture sont fréquentes ce qui limite la qualité de l'annotation. Afin d'obtenir de longues séquences avec un minimum d'erreur de lecture il est notamment possible de coupler les méthodes Illumina et Pac-Bio ou Nanopore **(21,43,294)**. Ces approches approfondies, associées aux bases de données publiques (NCBI, EMBL, DDBJ) mais aussi spécifiques à ces éléments génétiques mobiles (MOB-suite, PLSDB) sont aujourd'hui incontournables pour mieux appréhender les plasmides « épidémiques » et surveiller la diffusion des résistances dans leur globalité comme proposé par l'approche par PTU **(261,265,272,273)**. Elles restent cependant perfectibles et à standardiser entre les équipes de recherche (*i.e.* pipeline) **(292,301)**. Ce séquençage hybride a aussi été mis en place pour la première fois en Guadeloupe dans une étude de 2020 **(43)**.

Tableau 3. Exemples d'outils utilisés dans l'analyse de séquences pour la prédiction plasmidique (261,297–299). Tous ces outils sont directement utilisables en ligne de commande contrairement à PlasmidFinder (non présenté dans ce tableau) **(268)** ; [a] dépendance de MOB-suite ; [b] ces outils sont aussi présents sur un site spécifique dédié ; [c] ces outils sont aussi accessibles *via* l'actuel toolshed Galaxy ; [d] combine les deux approches.

Outils (date de publication)	**Interface web**	**Taxon-spécifique**	**Métagénome**	**Analyse des contigs**	**Mode de classification des contigs**	**Recommandations des auteurs**
mlplasmids (2018)	X[b]	X		Signatures spécifiques (plasmide/chromosome) pour les espèces validées (n=3), fréquence de *k-mer* de 5 (pentamer)	Machine learning	Good accuracy Prediction ≥ 0.7 / contig lengh ≥ 1Kb
MOB-recon[a] (2018)	X[c]			Identification de marqueurs plasmidiques spécifiques (réplicon, relaxase), trie selon les éléments répétés et comparaison avec une collection de séquences plasmidiques	BLAST / Mash	
PlasFlow (2018)	X[c]		X	Signatures spécifiques (plasmide/chromosome), fréquence de *k-mer* de 5 (pentamer)	Neural network	Good accuracy Prediction ≥ 0.7 / contig lengh ≥ 1Kb
RFPlasmid (2020)	X[b]	X[d]		Fréquence de *k-mer* + gènes plasmidiques (réplicon/protéine) et chromosomiques (marqueur d'espèce)	Random forest model	Good accuracy Prediction ≥ 0.6 / contig lengh ≥ 3Kb

III. L'approche One-Health et les compartiments associées

A) Principes et application à la lutte contre l'antibiorésistance

Le concept du programme « One-Health » a pour principal objectif de revoir notre façon de penser les problématiques de santé afin de les appréhender de façon plus globale : « un monde, une santé » **(129)**. Cette approche correspond à un « effort de collaboration de multiples disciplines – travaillant au niveau local, national et mondial – pour atteindre une santé optimale pour les personnes, les animaux et notre environnement » **(302)**. Ainsi, en plus d'une vision communautaire et clinique, la santé animale et la gestion de l'environnement sont amenées à ne former plus qu'une seule et même entité, comme c'est le cas pour de nombreuses maladies infectieuses **(121,303)**. Ce concept qui date de 2004 est donc avant tout interdisciplinaire. Il a connu un véritable essor dans le monde de la recherche après 2016. Les auteurs d'une revue bibliométrique sur le sujet ont identifié 1 067 contributions y faisant référence dans le titre, le résumé ou les mots clés [1998 – 2019]. Ils suggèrent par ailleurs que cette augmentation serait liée aux épidémies et zoonoses comme celles associées aux virus Ebola et Zika. L'actuel SARS-CoV-2 en sera l'un des principaux moteurs dans les publications à venir **(303)**.

Aujourd'hui au vu des connaissances sur le sujet et des nombreuses interactions possibles, il est aussi primordial de prendre en compte la problématique de l'antibiorésistance dans une approche unique, afin de mieux comprendre les mécanismes de transmission et de création de réservoir **(302)**. Dans le cas de ce projet de thèse, les entérobactéries n'ont en effet théoriquement pas de frontière, et les points d'échanges possibles des résistances associées sont nombreux entre les 3 grands compartiments (**Figures 19 et 20**). Ces échanges sont locaux et mondiaux. Comme évoqué pour les enzymes CTX-M, les voyages et les flux de migrations humaines et animales ont clairement facilité leur expansion. « Chacun a un rôle à jouer », et un plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens a été proposé par l'OMS aux états membres en 2015 **(1,129)**. Ce dernier a listé 5 objectifs :

- Mieux faire connaître la problématique de la résistance aux antibiotiques grâce à la communication, la vulgarisation et la formation.

- Renforcer les connaissances par le biais de la recherche et de programmes de surveillance spécifiques.

- Réduire l'incidence des infections bactériennes par la mise en place de mesures efficaces d'assainissement, d'hygiène et de prévention.

- Optimiser l'utilisation des antibiotiques en santé humaine et médecine vétérinaire.

- Investir dans la mise en place d'interventions concrètes, et dans le développement de traitements et d'outils de diagnostic. Dégager les arguments économiques en faveur d'investissements durables et adaptés à chaque région du globe (**Figure 5**).

Le but principal de l'approche One-Health appliquée à l'antibiorésistance est de bloquer les mécanismes de développement et les chaines de transmission. Le plan d'action mondial sert ici de cadre aux plans d'action nationaux. L'un des exemples concrets est la mise en place de protocoles stricts dans la recherche des germes producteurs de carbapénémases dans le secteur hospitalier **(39,216)**. Les mêmes actions concernant l'environnement ou les animaux sont cependant plus difficiles à développer. Il convient donc d'identifier les voies de transmission entre les compartiments pour pouvoir agir efficacement. Parmi les principales entérobactéries rencontrées en clinique, KPNC et ECC présentent généralement plus de gènes de résistance que les souches d'*E. coli* (**Figure 19) (8)**. Le caractère ubiquiste de ces bactéries les rend aussi plus à même d'échanger ces gènes entre les compartiments et surtout de capter de nouveaux gènes *via* les plasmides de résistance et d'autres éléments mobiles **(8,141,195)**. Cette diffusion est une thématique importante en recherche. Comme mentionné auparavant ceci a permis de souligner qu'au Royaume-Uni la voie animaux de rente → portage / infections chez l'homme semble restreinte et non systémique pour les entérobactéries BLSE (**Figure 21**) **(31,92)**. Ceci peut paraître paradoxal comparé aux épidémies à *E. coli* O157:H7 et autres EHEC qui peuvent être associées aux bovins **(18,20)**. Les mêmes constats ont été faits dans d'autres articles européens dans le cadre de la transmission de bactéries résistantes, c'est principalement l'homme qui contamine l'homme. Le portage ou les infections résistantes liés à l'environnement ou une transmission zoonotique restent bien entendu possibles mais généralement ponctuels, localisés et surtout difficiles à mettre clairement en évidence (« silencieuses ») **(8,91,166,180)**.

La proximité entre compartiments pourrait cependant être une notion importante dans cette circulation et les données européennes ne reflètent probablement pas l'ensemble du monde. Par exemple, dans certaines provinces chinoises le portage au sein de la population de souches d'*E. coli mcr-1* + était corrélé avec la consommation de viande de porcs et d'aliments provenant de productions aquacoles locales. Cette observation doit être confirmée par un meilleur séquençage des souches animales. Elle suggère une large excrétion de bactéries résistantes et d'antibiotiques comme la colistine *via* les fermes, ceci a impacté par la suite l'environnement et les productions associées « de la fourche à la fourchette » dans certaines régions **(126)**. Un très récent projet mené au Cambodge a aussi souligné le biais de ces travaux scientifiques européens qui ne sont pas représentatifs de la situation des pays à revenu intermédiaire ou faible (**Figure 21**) **(6,7)**. Ce pays est l'un des plus pauvres d'Asie de l'Est avec des normes d'hygiène moins strictes au niveau agroalimentaire et surtout des contacts plus directs entre hommes et animaux. En se concentrant sur les *E. coli* BLSE, une équipe de recherche a clairement souligné le partage fréquent d'éléments génétiques mobiles (plasmide, transposon, $bla_{\text{CTX-M-55}}$) entre souches de différents compartiments **(7)**. Par ailleurs, les données accumulées sur le sujet sont généralement anthropocentrées. L'environnement et la faune sauvage font partie des composantes de l'approche One-Health les moins étudiées. Or, même si les proportions d'ECC, d'*E. coli* ou de KPNC sont généralement plus faibles dans ces compartiments, il est toujours possible de les retrouver (**Figure 19**) **(8)**. Comme le soulignent Thorpe H. *et al.,* pouvoir mettre en évidence les flux bactériens environnement → homme et identifier les zones poreuses reste aussi plus laborieux **(91)**.

La notion de « résistome » est très ancienne puisque des gènes de résistance homologues à ceux retrouvés actuellement ont été détectés dans l'environnement bien avant l'ère moderne. Cette découverte a notamment été faite dans des échantillons de Permafrost analysés au Canada et datant de plus de 30 000 ans **(304)**. L'ère moderne avec la pression de sélection qui a suivi la découverte des antibiotiques est, quant à elle, à l'origine d'une expansion croissante de bactéries et de pathogènes multirésistants. Ces derniers sont généralement associés à des plasmides de résistance et seront retrouvés dans des infections mais aussi dans l'environnement **(125,264,305)**. L'ampleur de cette expansion reste difficile à mesurer (*i.e.* partie immergée d'un iceberg ; **Figure 20**). Comme nous avons pu l'apprécier au chapitre précédent, le mouvement des gènes de résistance est possible à différentes échelles, que ce soit au niveau génétique mais aussi entre les individus. On observe un effet « poupées russes » où les plasmides conjugatifs vont par exemple présenter un transposon qui sera associé à un intégron et des cassettes de gènes de résistance (**Figure 20**). Le concept de « contaminants émergents » pour les gènes de résistance aux antibiotiques a aussi été proposé. Cette notion est notamment associée aux travaux menés par Pruden A. et ses collègues qui ont mis en évidence une plus grande concentration de gènes de résistances (*tet*/*sul*) dans les sédiments d'une rivière soumise à un gradient de pression anthropique en comparaison avec un point d'échantillonnage en amont dans un milieu préservé des activités humaines **(306)**. Le même type d'observation est possible entre sédiments prélevés en zones urbaines et rurales **(184)**. Cette prise en compte comme polluant présente un important défi en comparaison d'autres contaminants. En effet, pouvoir limiter l'expansion des résistances semble plus difficile en raison de leur nature biologique et ubiquiste, et des nombreuses possibilités de transferts de gènes au sein d'une communauté bactérienne **(306)**. Selon la structure analysée il est cependant possible d'avoir une vision plus globale de cette pollution (*i.e. intI*1 « cliniques ») **(254)**. Enfin, l'analyse de ces structures bactériennes présente également un intérêt écologique car il n'est pas rare de retrouver des gènes de résistance aux métaux.

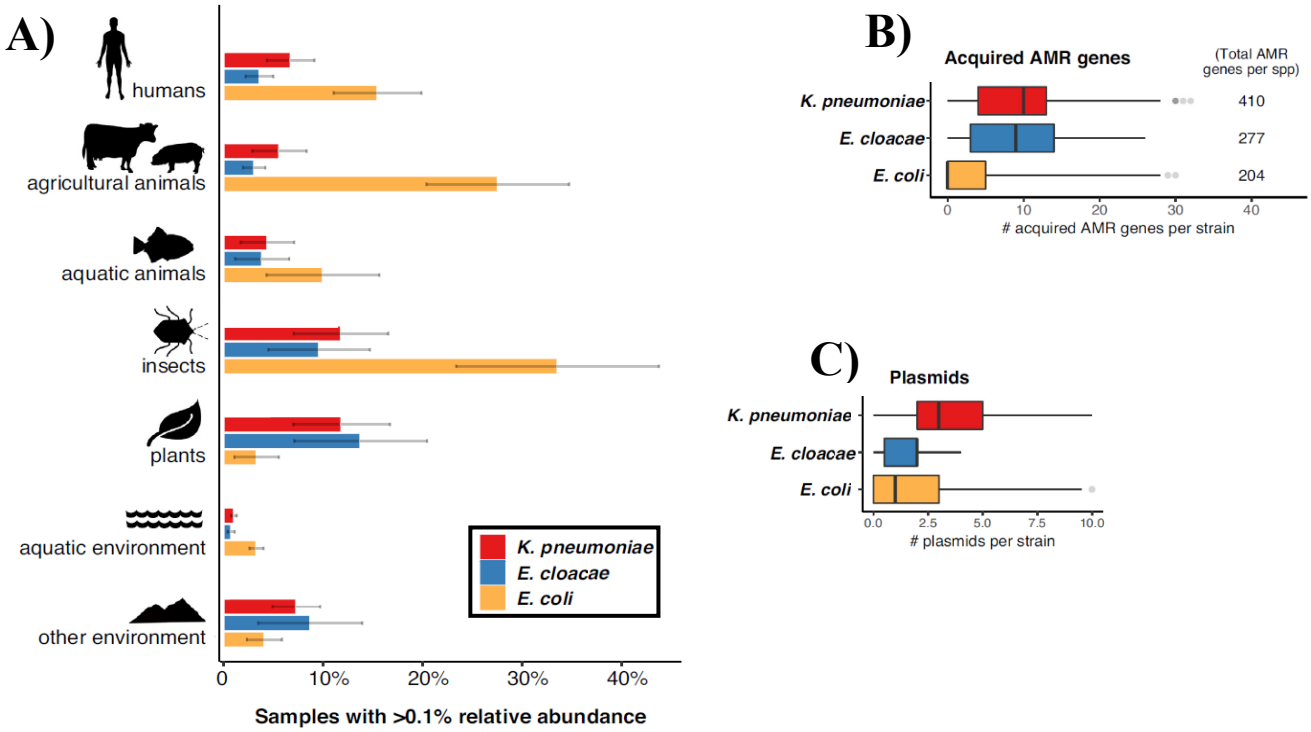


Figure 19. Caractéristiques des principales *Enterobacteriaceae* d'intérêt clinique (8).

A) distribution globale estimée dans différents types d'échantillons selon la base de données IMNGS (compilation de profils ARN 16S de diverses communautés microbiennes) ; **B)** estimation du nombre de gènes de résistance acquis, **C)** et du nombre de réplicons plasmidiques par génome (médiane, quartiles ; données NCBI).

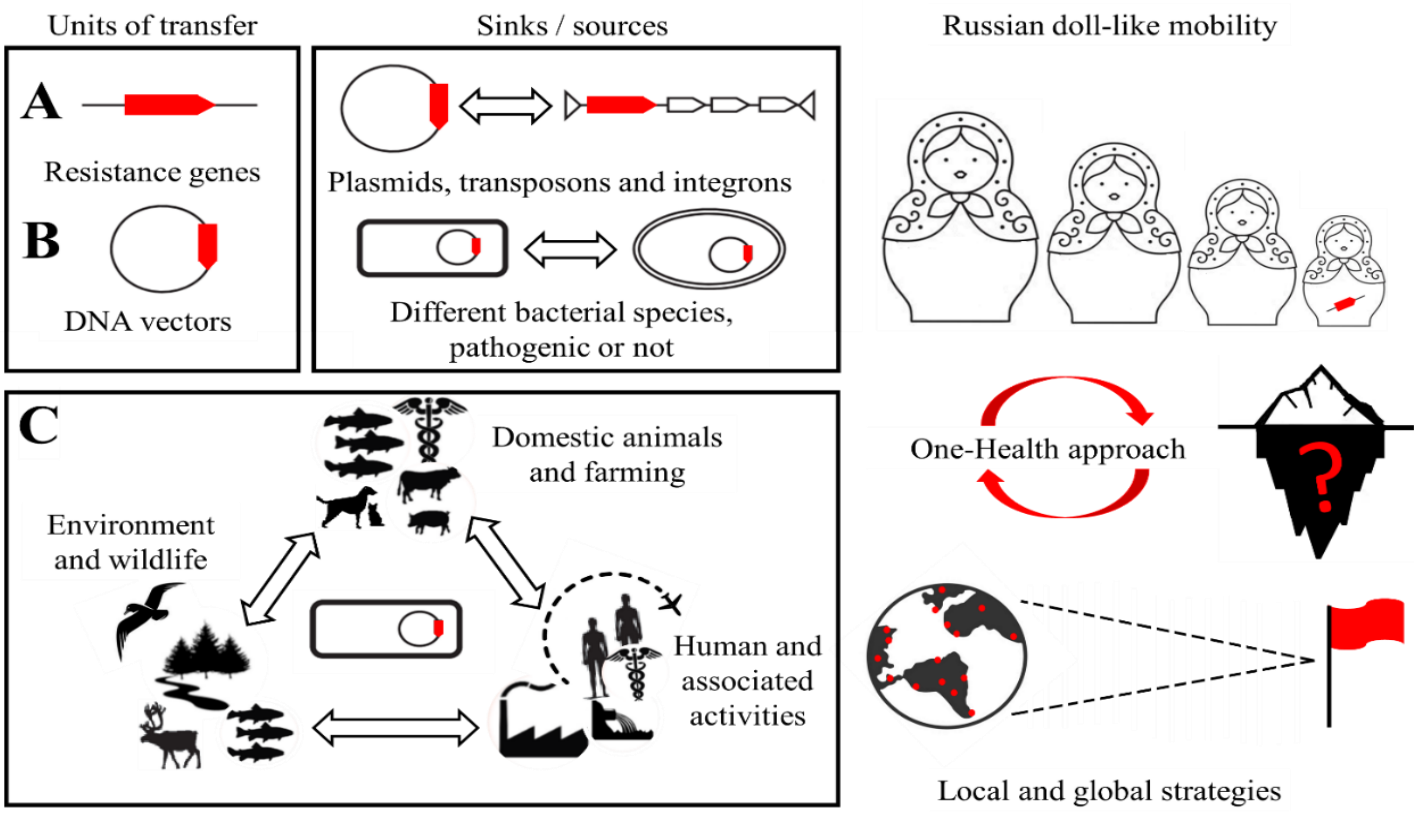


Figure 20. Voies de dissémination possibles des gènes de résistance aux antibiotiques selon différentes échelles. Eléments d'illustration issus principalement de https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x et de https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180 ; **A)** à l'échelle de l'ADN un gène de résistance (en rouge) peut être présent à différents niveaux : concept des poupées-russes (chromosome / éléments génétiques mobiles) ; **B)** dans le cas d'éléments génétiques mobiles, ces derniers peuvent théoriquement être transférés de manière horizontale entre différentes espèces / lignées de bactéries dans une niche écologique donnée ; **C)** enfin ces bactéries pathogènes ou non peuvent aussi être retrouvées parmi différents types d'hôtes / compartiments à travers le monde : approche One-Health, cette distribution reste mal évaluée pour le moment (*i.e.* partie immergée d'un iceberg).

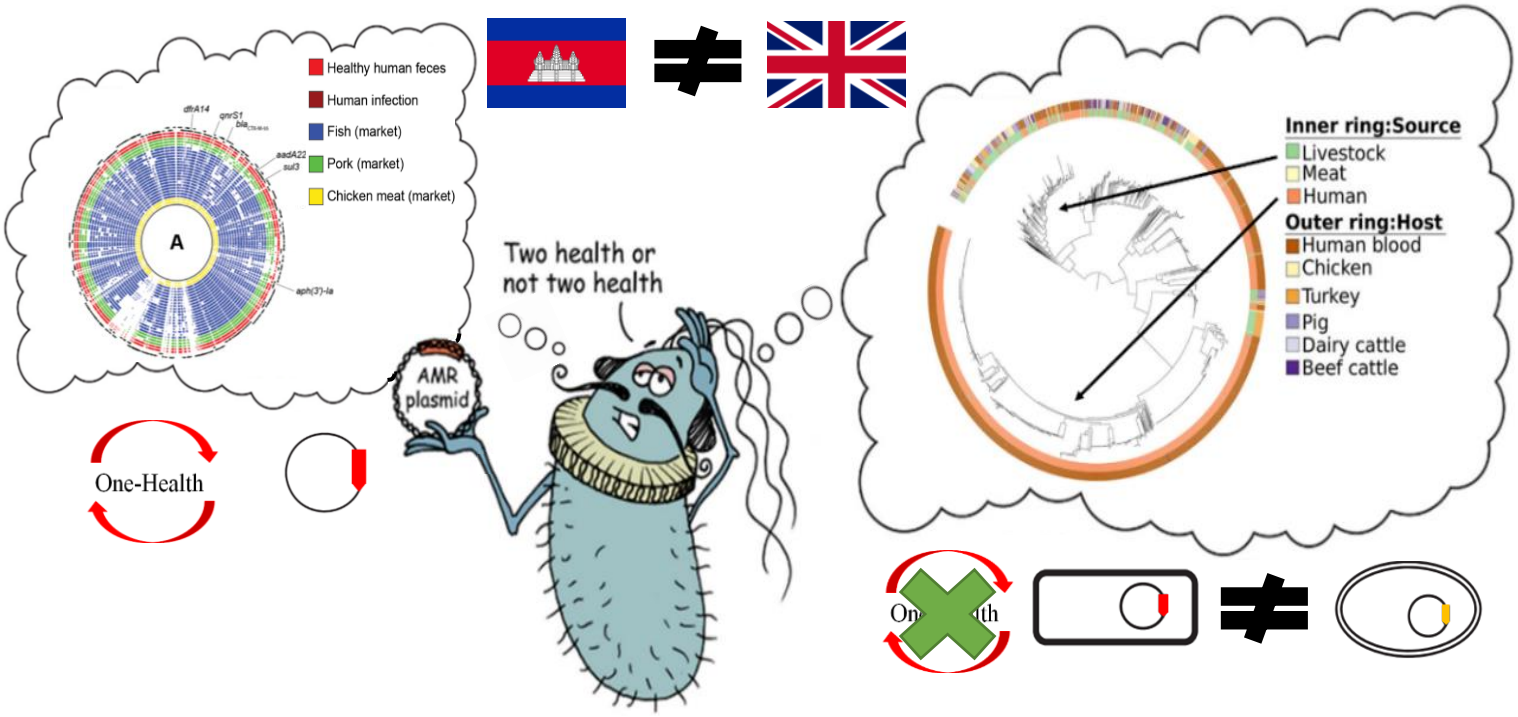


Figure 21. Phylogénie d'*E. coli* productrices de BLSE issues de différents compartiments et distribution plasmidique. Illustration inspirée de : https://doi.org/10.1128/mBio.00550-19 ; au Royaume-Uni presque tous les génomes très proches ont été isolés de la même espèce hôte ou d'un même compartiment ; les souches humaines sont majoritairement séparées des souches d'origine animale ; à l'inverse au Cambodge des structures plasmidiques très similaires circulent entre l'homme et les animaux (viandes) ; AMR plasmid : plasmide de résistance aux antibiotiques.

B) Le compartiment environnemental : focus sur la faune sauvage

Dans cette vision « One-Health », la faune sauvage peut servir à la fois d'indicateur dans un lieu donné pour illustrer la diffusion ou la limitation de la résistance, mais aussi de possible disséminateur sur de plus longues distance **(53,307,308)**. C'est le cas pour les germes producteurs de BLSE, mais aussi plus récemment pour les gènes de résistances aux antibiotiques de « derniers recours » comme les carbapénèmes ou la colistine **(85,130,187)**. Ce portage croissant de résistances d'intérêt clinique chez ces animaux normalement non soumis à un quelconque traitement antibiotique, démontre de nouveau le caractère global de cette problématique de diffusion. Celle-ci est aussi posée avec la présence de lignées à fort potentiel épidémique comme par exemple ST131 pour *E. coli* **(32,52,53,182)**. L'intérêt de la communauté scientifique pour ce compartiment est croissant. La majorité des projets actuels portent sur les oiseaux et les petits mammifères (rongeur) généralement omnivores comme décrit ci-dessous.

Il convient cependant de bien délimiter les recherches selon le « type de faune sauvage » analysé. En effet il existe un degré d'anthropophilie selon les espèces animales. La notion d'animaux sauvages peut être divisée en 2 grands groupes **(309)** :

- **Animaux péri-domestiques :** Ils vivent dans un environnement largement dominé par l'homme ou ses activités, et correspondent à toute la faune synanthrope. Ces animaux sont donc des indicateurs de la résistance dans la communauté humaine ou l'environnement naturel environnant par leur étroite cohabitation. C'est le cas du genre ubiquitaire *Rattus*, et qui a été historiquement l'un des réservoirs de *Y. pestis* **(43,121,140,188,310)**.

- **Animaux sauvages :** Ils présentent normalement une interaction beaucoup moins directe avec les activités humaines, à l'exception de la faune considérée comme synurbique **(309)**.

Un troisième groupe peut aussi être distingué : les animaux de zoo. Ces derniers ne présentent pas le même intérêt puisque que leur santé reste étroitement surveillée au même titre que les animaux de rente ou de compagnie **(309)**. Cette distinction des espèces animales reste importante comme l'a démontré une étude sur la diffusion de souches productrices de BLSE dans l'environnement aquatique en Antarctique où les colonies de manchots (*Pygoscelis papua*) même proches des bases scientifiques étudiées ne présentaient aucune des résistances recherchées (0/400) **(47)**. Les auteurs ont par ailleurs émis l'hypothèse d'une diffusion *via* d'autres espèces plus anthropophiles dans cet environnement **(47)**. À noter que selon les approches de screening il reste tout de même possible de retrouver des gènes de résistance même en faible quantité au sein de cette population **(311)**.

L'origine de la résistance chez ces animaux, péri-domestiques ou non, peut être multifactorielle et reste encore à élucider. La **Figure 22** illustre de façon générale les différents points considérés comme critiques dans cette dissémination. Ils sont pour la plupart intimement liés à l'homme **(187)**. Il convient donc de bien délimiter l'écosystème de recherche ou de niche écologique, ces derniers pouvant être soumis à un degré variable d'apports anthropiques **(309)**.

Parmi ces apports, la proximité avec les élevages est l'un des exemples associés avec une augmentation du portage au sein de la faune sauvage **(312)**. Il a aussi été mentionné un possible impact des saisons sur ce portage **(313)**.

Enfin, les besoins et les stratégies de recherche de nourriture sont d'autant plus importants à prendre en considération puisque de manière générale il est considéré que les activités humaines et les déchets associés ont modifié le comportement alimentaire de certaines espèces sauvages, influençant logiquement le portage de germes résistants **(309)**. C'est le cas de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) en Espagne, chez qui le portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE était significativement plus élevé au sein des colonies situées à proximité des décharges **(32)**. De plus comme l'ont souligné les auteurs, au fil des années, le comportement migratoire de ces animaux a largement diminué au vu de l'abondance des points de subsistance, les rendant plus sédentaires et vivant près des décharges au lieu de migrer vers le continent africain en hiver.

Ces observations ont permis d'identifier certaines espèces associées à l'homme comme indicateur de la dissémination des résistances. Ainsi, les goélands (*Larus* sp.) qui se nourrissent *via* les déchets laissés par l'homme et vivent près des métropoles peuvent disperser leurs fientes dans l'environnement, et constituer une source de contamination secondaire (**Figure 23**). Dans une première étude européenne menée en 2009 et portant sur ces oiseaux, un gradient de portage d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques a été observé entre pays du Sud et du Nord **(10)**. De futures études incluant des analyses de mouvements migratoires par satellites permettront de mieux comprendre les comportements des oiseaux et les diffusions de résistances associées **(53)**.

En l'absence de données génétiques et phylogénétiques, il peut être difficile d'attribuer avec certitude la source de contamination de ces animaux et les différents flux. Un exemple récent de possibles échanges inter-animaux (domestique/sauvage) est la présence de souches BLSE chez le héron garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) souvent observé en interaction avec le bétail lorsqu'il se nourrit. Cet oiseau migrateur reste aussi en interaction avec l'homme *via* ses déchets. En plus d'un portage conséquent d'*E. coli* BLSE (26/28), il a été observé une forte similarité (sérotype, gène de résistance) entre certaines souches isolées de ces oiseaux et des souches isolées chez des vaches dans la même région du Nigéria **(314)**. Une forte similarité phylogénétique a aussi été démontrée entre des souches BLSE d'*E. coli* ST410 isolées en Allemagne chez l'homme, un chien et un cygne sauvage (≤ 29 SNP) **(52)**. Les exemples concrets de diffusion de germes entre ces compartiments sont de plus en plus fréquents grâce aux avancées techniques. Cependant comme le soulignent Dolejska M. et Literak I., il reste actuellement difficile de connaître et d'estimer les risques directs pour la santé humaine d'un tel portage au sein de la faune sauvage **(315)**.

D'autres études ont été menées sur des insectes, et essentiellement sur des espèces péri-domestiques. C'est le cas pour certaines espèces de cafards (*Periplaneta americana*, *Blattella germanica*), grégaires, connues pour être omnivores, coprophages et présentes dans notre quotidien. Ces cafards peuvent aussi avoir un rôle en tant que réservoir et disséminateur de germes BLSE comme cela a pu être mis en évidence par comparaison du portage de souches C3G-R chez des cafards et les habitants d'un même foyer. Les auteurs ont en effet isolé des

bactéries avec le même ST et les mêmes gènes de résistance entre ces deux compartiments (*E.coli bla*$_{\text{CTXM-15}}$) **(316)**. Les mêmes observations ont été faites au niveau nosocomial pour des souches de KPNC (PFGE) **(113)**. Les mouches sont aussi étudiées dans différents écosystèmes sous pression anthropique. Les résultats soulignent notamment une prévalence importante de germes BLSE chez des insectes prélevés dans l'environnement hospitalier en Ethiopie (39/58), et les mêmes souches isolées de patients et chez ces insectes au Rwanda **(46,317)**. La présence et la possible diffusion au sein d'une ferme d'une lignée d'*E. coli* (ST38 *bla*$_{\text{CTXM-15}}$, PFGE) entre différentes espèces de mouches et des vaches a aussi été mentionnée **(12)**.

En se focalisant sur les données géographiques existantes en termes de circulation des déterminants des BLSE (type *bla*$_{\text{CTXM}}$) il est possible de mieux cerner la possible origine de la contamination de la faune sauvage avec par exemple *bla*$_{\text{CTXM-15}}$ généralement plus retrouvé chez l'homme et *bla*$_{\text{CTXM-1}}$ chez les animaux domestiques **(187)**. Cependant comme présenté dans le précédent chapitre, il reste aujourd'hui indispensable de disposer d'informations génomiques plus précises et de connaître les plasmides de résistance en présence et leur structure, afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu dans la dissémination entre compartiments au niveau local mais aussi mondial.

D'une façon générale, ce chapitre souligne que la proximité avec des sources anthropiques peut façonner le portage de germes résistants au sein de la faune sauvage. Cette notion reste encore à bien évaluer selon les contextes écologiques, les germes et les espèces hôtes considérées (biologie, habitudes alimentaire…). Par ailleurs, ces observations au sein de la faune sauvage ne permettent pas nécessairement de conclure sur une colonisation stable ou transitoire. Ceci renforce la nécessité d'identifier et de prévenir tout point de dissémination de résistances aux antibiotiques dans l'environnement, les animaux associés étant utilisés comme indicateur avec une approche par séquençage complet des génomes. Ce projet de thèse va donc s'intéresser non pas à une contamination animaux → homme comme le postulat des animaux de rente, mais plutôt homme → animaux. De cette façon, les animaux deviennent alors selon la prévalence de portage de possibles vecteurs.

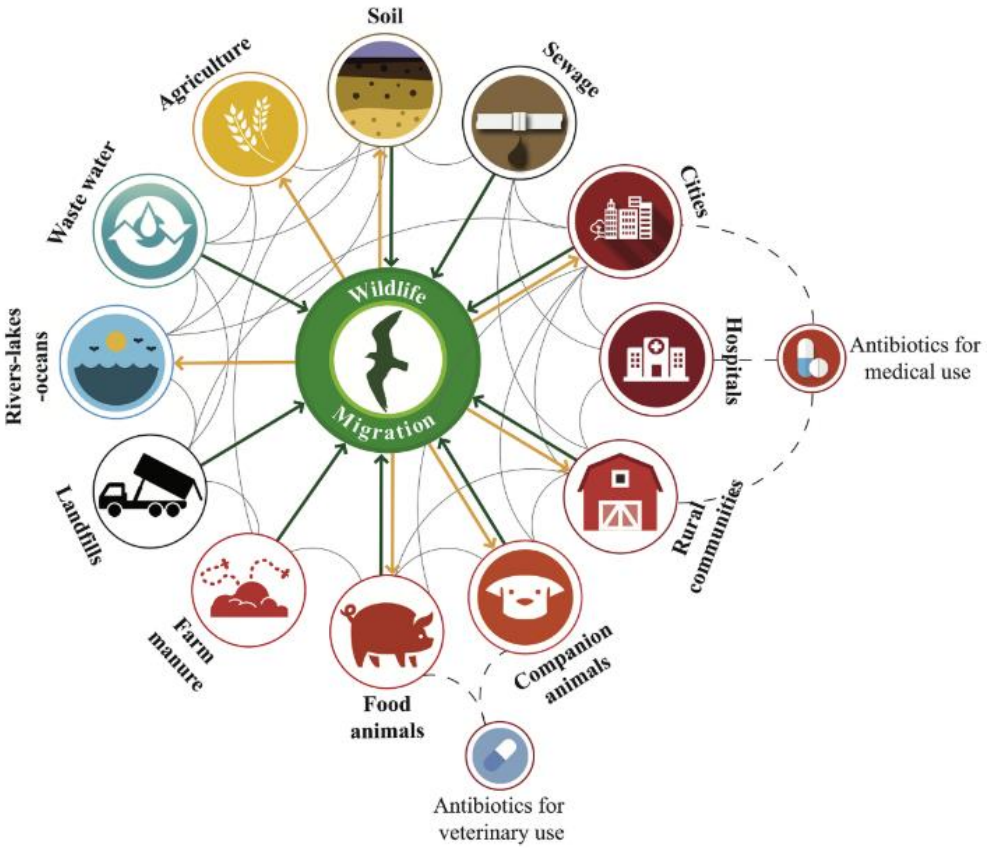


Figure 22. Voies de transmission possibles de la résistance aux antibiotiques entre la faune sauvage et les autres compartiments (187). Flèche verte : source de résistance pour la faune sauvage ; flèche jaune : possible diffusion à partir de la faune sauvage.

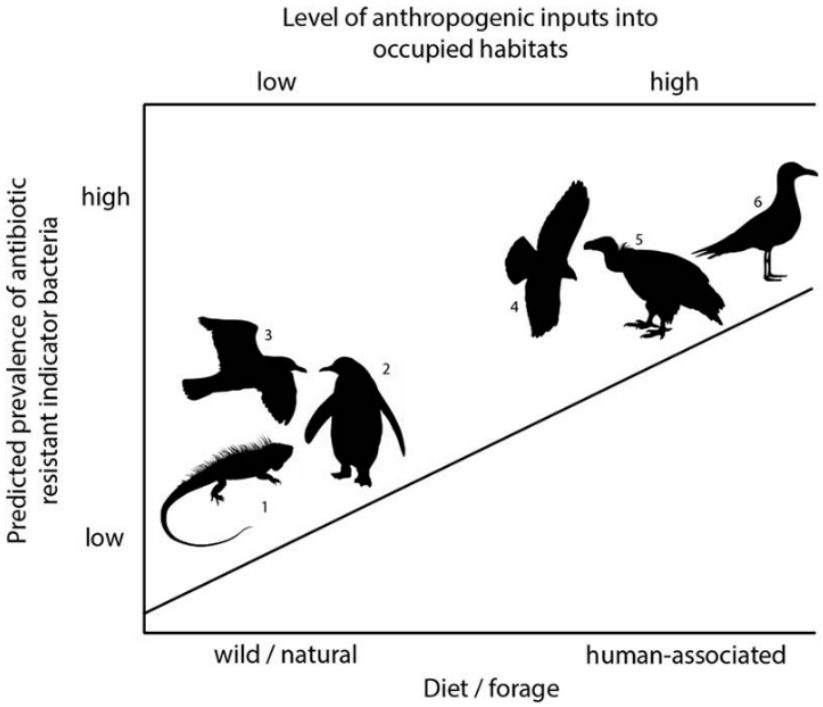


Figure 23. Prédiction du portage de bactéries résistantes aux antibiotiques chez différentes espèces d'animaux sauvages selon la pression anthropique de l'environnement considéré et les habitudes alimentaires observées (309). Les exemples d'animaux se focalisent sur de précédents travaux : 1) les reptiles dans des zones peu densément peuplées, 2) les manchots de l'Antarctique, 3) les espèces de goélands de mer ayant un régime alimentaire « normal », 4) les oiseaux de proie, 5) les charognards se nourrissant près des abattoirs, 6) les goélands ayant adopté une alimentation associée aux déchets d'activités humaines.

C) Les stations d'épuration des eaux usées : la principale interface entre les compartiments homme et environnement

1. Importance de l'hygiène et du traitement des eaux usées

Le présent chapitre est porte sur le lien étroit entre eaux usées / antibiorésistance, et sur le fonctionnement et l'importance des systèmes de traitement associés. De façon globale, les activités humaines rejettent différents déchets dans l'eau. Ceci nécessite un traitement et une épuration des eaux dites « usées » ou effluents afin d'éliminer les matières organiques et les principales impuretés apportées en suspension ou sous forme dissoute pour « protéger la santé et la salubrité publique » **(318)**. En effet, l'accès à une eau potable, qui est un droit fondamental, est étroitement lié au reste du cycle de l'eau et notamment aux actions menées en parallèle pour dépolluer les eaux usées avant libération dans l'environnement. Ces quelques chiffres permettent de mieux apprécier l'importance de tels systèmes pour la santé humaine notamment dans des régions sinistrées et défavorisées **(319)** :

- 1 personne sur 3 à travers le monde n'a pas de toilettes, et la défécation en plein air est une pratique fréquemment retrouvée encore aujourd'hui dans certaines régions du globe (**Figure 24**).

- Environ 1,8 milliard de personnes boivent de l'eau contaminée par des matières fécales.

- Les maladies hydriques, pouvant être associées au péril fécal sont à l'origine de plus de 2,6 millions de décès par an.

Parmi les maladies hydriques liées à la contamination de l'eau par des organismes pathogènes, on compte notamment le choléra (*Vibrio cholerae*), les gastro-entérites (*E. coli, Campylobacter*…), la fièvre typhoïde (*Salmonella enterica*), les hépatites infectieuses (virus de l'hépatite A et E), les helminthiases (*Ascaris lumbricoïdes*, *Trichuris trichiura*…) ou encore la dysenterie amibienne (*Entamoeba histolytica*) **(319)**. L'un des plus récents exemples de maladies hydriques dans les territoires des Caraïbes est l'épidémie de choléra en Haïti qui a fait plus de 9 000 morts depuis 2010 **(320)**. Dans la présente thèse, nous nous sommes intéressés à la diffusion de bactéries principalement ubiquistes mais résistantes aux antibiotiques et aux gènes associés. Cette problématique est moins visible et dévastatrice qu'une épidémie de choléra car un germe porteur de résistance n'est pas nécessairement pathogène. Elle fait aujourd'hui partie intégrante du cycle de l'eau et plus particulièrement dans le domaine de l'assainissement et de la gestion des effluents **(1)**.

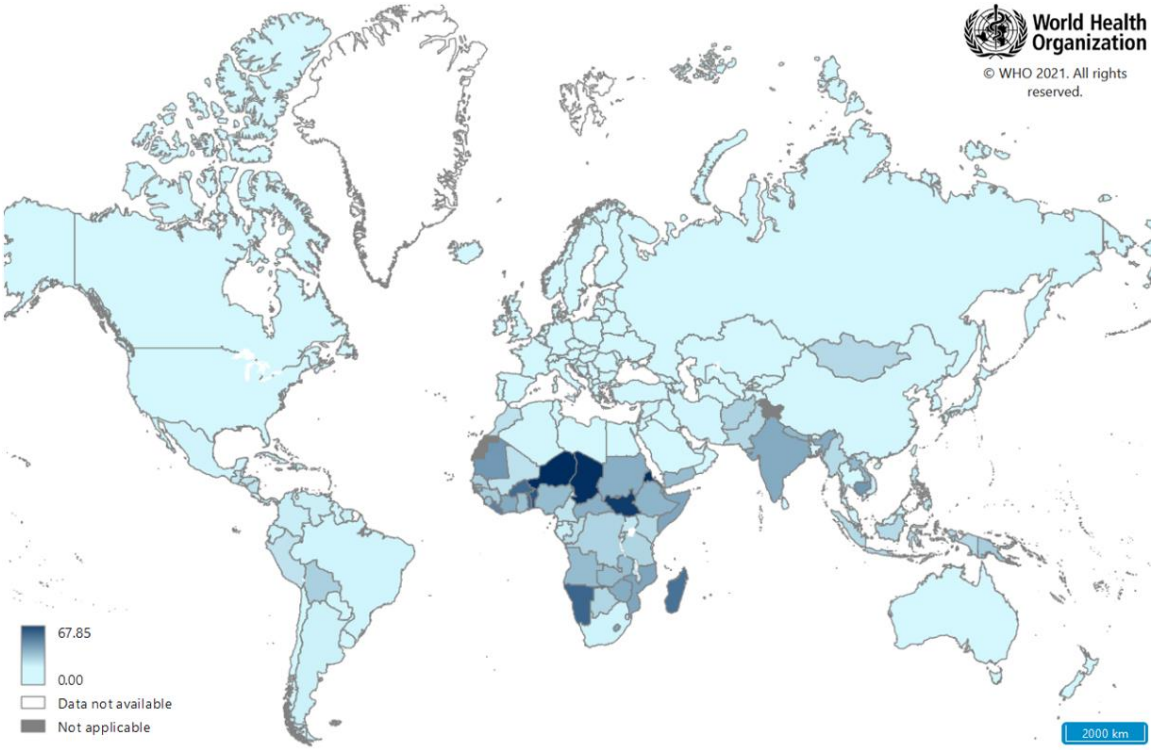


Figure 24. Estimation du pourcentage de la population pratiquant la défécation en plein air (321).

2. Principe de fonctionnement des stations d'épuration à boues activées

L'assainissement des eaux usées peut être effectué *via* un réseau global de collecte ou individuel et privé. Dans ce projet, nous nous sommes focalisés sur l'assainissement collectif qui va aboutir à une dépollution en station par boue activée. Les STEP correspondent à l'interface entre nos eaux usées et l'environnement. De ce fait, la qualité de l'eau en sortie répond à différents critères et normes que les collectivités et entreprises se doivent de respecter. On retrouve dans les textes réglementaires des paramètres et des valeurs limites de rejets pour la pollution biologique, chimique et physique. L'arrêté du 21 juillet 2015 vise tout d'abord à limiter la perturbation de l'environnement aquatique récepteur et à conserver au mieux l'équilibre du milieu naturel **(322)**. Les procédés modernes de traitement des eaux usées permettent d'optimiser et d'accélérer un processus de dépollution naturel en abaissant la charge organique et particulaire. Cette dépollution résulte en partie de phénomènes de décantation et de l'action des micro-organismes en présence.

Les effluents bruts qui arrivent à la STEP subissent tout d'abord un prétraitement divisé en 3 opérations unitaires qui sont : le dégrillage, le dessablage et le déshuilage/dégraissage (**Figure 25**). La combinaison de ces étapes permet une première dépollution physique des eaux. Placées en tête de station elles engendrent une réduction partielle des pollutions et évitent l'apparition de mousse, une détérioration des équipements et des canalisations dues aux colmatages et à l'accumulation des déchets solides. Le dégrillage a pour fonction de bloquer les macro-déchets souvent par le biais d'une grille verticale régulièrement nettoyée. L'étape de dessablage qui suit permet en agissant sur la vitesse d'écoulement de l'eau de faire sédimenter les particules minérales grossières et insolubles (Ø 200 µm) qui seront ensuite curées. Des approches mécaniques peuvent être aussi appliquées. Pour finir le prétraitement, l'étape de déshuilage/dégraissage permet d'éliminer les éléments ayant une densité inférieure à l'eau. Ces

matières flottantes et particules grasses peuvent être plus rapidement séparées en insufflant de l'air dans le liquide à traiter. Elles sont récupérées en surface par un système de raclage. Selon les ouvrages et leur complexité il est possible d'observer des équipements qui combinent ces différentes actions (exemple : dégrilleurs à nettoyage automatique par tamisage) **(323,324)**.

La suite du traitement des eaux usées est généralement déclinée en 3 grandes étapes qui sont le traitement primaire, le secondaire et le tertiaire (**Figure 25**). La majorité des STEP vont appliquer une approche biotechnologique avec l'utilisation de boues activées. Ces étapes permettent notamment une limitation de la pollution carbonée. Le premier traitement correspond à une phase de décantation qui repose de nouveau sur le principe d'écoulement de l'eau et de sédimentation des particules organiques et matières décantables. La dimension des ouvrages et le débit d'eau ajusté pour cette étape varient de sorte qu'une partie de la matière organique puisse sédimenter à son tour. Les matières en suspension s'accumulent et vont se déposer sous forme de boues primaires sur le fond des bassins qui sont régulièrement raclées pour éliminer l'excédent **(324)**. Certains schémas de traitement utilisent en complément des réactifs coagulants pour agglomérer un maximum de matière organique comme des sels d'aluminium **(325)**. Ce procédé physico-chimique est notamment effectué sur des stations d'épuration ayant à traiter des eaux brutes dont les volumes peuvent fortement varier selon les saisons (station balnéaire).

Un traitement secondaire biologique est ensuite appliqué sur les effluents. Ce sont les micro-organismes (algues, bactéries, levures, protozoaire) présents généralement sous forme libre au sein du liquide qui sont à l'origine de l'épuration. Si l'on s'intéresse aux bactéries de cet écosystème, celles-ci ont une concentration de 10^{11} à 10^{12} par litre **(324)**. Des systèmes de biofiltre ou de lit bactérien existent aussi ; les micro-organismes épurateurs sont alors fixés sur un support en contact avec l'eau. Le traitement par boues activées est initié par l'introduction de l'eau prétraitée dans un bassin d'aération. Le liquide est brassé et oxygéné en continu sur une partie de ce bassin pour garder les micro-organismes en suspension et maintenir une activité biologique aérobie adéquate. Les composés azotés et la matière phosphorée peuvent subir une étape de dégradation biologique complémentaire en ajoutant des zones anoxiques ou anaérobies en parallèle du traitement secondaire **(324)**. Dans le cas de la station analysée, une zone spécifique de ce bassin impose notamment une anaérobiose pour l'élimination de la pollution carbonée et azotée (procédé en deux cuves). Ces éléments nutritifs peuvent en effet engendrer une forte pollution dans les zones sensibles avec une augmentation de l'eutrophisation visible par un développement accru d'algues en surfaces des milieux aquatiques **(326)**. La dégradation des molécules et matières organiques biodégradables se fait par le biais des enzymes cellulaires. Cette transformation biologique permet l'apport d'énergie indispensable au développement des micro-organismes qui vont s'agréger au fur et à mesure de leur expansion sous forme de flocs en suspension. Ces derniers concentrent notamment les bactéries ainsi que leurs déchets **(324)**. Ce mélange homogène de structures floculantes et d'eau est appelé liqueur mixte.

Les étapes de traitement secondaire sont calquées sur la dynamique de croissance des bactéries épuratrices autotrophes et hétérotrophes. On observe en effet différentes phases de développement des micro-organismes et en l'occurrence des bactéries. Il y a tout d'abord une phase de latence et d'adaptation à l'environnement où les bactéries ne se développent que très

peu. Ensuite, ces micro-organismes se développent et se divisent jusqu'à atteindre un maximum caractérisé par une phase de croissance exponentielle stable. Selon la quantité de matière organique apportée on atteint une troisième phase dite de ralentissement lorsque le substrat est limitant. Enfin en phase endogène la quantité de micro-organisme diminue. Il existe plusieurs approches en ce qui concerne la configuration d'une station d'épuration. Un bon rendement épuratoire sera obtenu en ajustant différents paramètres des réacteurs pour respecter le cycle de développement de cet écosystème complexe **(324)**.

En fin de phase de traitement des eaux usées on retrouve donc une étape de clarification parfois précédée par une phase de dégazage. Les flocs et le reste des matières solides organiques ou minérales en suspension sont récupérés sous forme de boues secondaires après décantation. L'eau épurée est séparée de ces éléments solides par un système de surverse. Une partie de la biomasse microbienne récupérée est remise en circulation au sein du bassin d'aération tandis que l'excédent est évacué pour traitement ultérieur. Cette recirculation permet de maintenir une concentration constante de biomasse et donc de contrôler leur développement comme décrit précédemment **(323,324)**.

Des traitements complémentaires de purification tertiaires seront aussi mis en place selon les exigences, le contexte local et le milieu récepteur. Les approches sont chimiques et/ou physiques. Les eaux épurées peuvent aussi subir une étape de désinfection. Ceci se fait par ajout de chlore, d'ozone ou encore par utilisation des ultraviolets (UV) dans le but notamment de diminuer la charge finale en micro-organisme. Divers micropolluants sont aussi ciblés pour être diminués et d'autres procédés sont possibles comme une filtration sur membrane, sur sable, ou encore l'adsorption sur charbon actif. Enfin certaines stations présentent aussi une étape finale de lagunage selon les capacités d'entrée (lits de roseaux) **(15,29,325,327,328)**.

Les déchets récupérés lors du traitement des eaux usées sont de différentes natures. On retrouve les macro-déchets raclés sur la grille pour prévenir les blocages lors du dégrillage, ensuite les sables et les graisses. Ces derniers sont généralement transférés vers des déchetteries ou d'autres filières pour être incinérés ou stockés. Les boues d'épuration au sein d'une STEP peuvent être récupérées à différentes étapes selon les ouvrages. Tout d'abord au niveau de l'étape primaire avec la décantation initiale, puis lors de l'étape de clarification. Elles comportent d'une part des éléments de nature minérale et d'autre part de la matière organique résultant de l'épuration biologique et de la digestion des matières biodégradables. Ces boues lorsqu'elles sont extraites du système doivent donc être stabilisées. Pour se faire il existe 4 approches : soit par dégradation bactérienne aérobie ou anaérobie soit pas stérilisation chimique ou physique. Ces traitements permettent en premier lieu de réduire la teneur en eau et la charge bactérienne (chaulage, déshydratation, méthanisation, épaississement, séchage…) **(329)**. Elles peuvent ensuite être incinérées ou enfouies. Les boues « hygiénisées » peuvent aussi être compostées et valorisées en agronomie. En effet les composts concentrent de la matière organique et des minéraux intéressants pour la fertilisation des sols **(16,330,331)**.

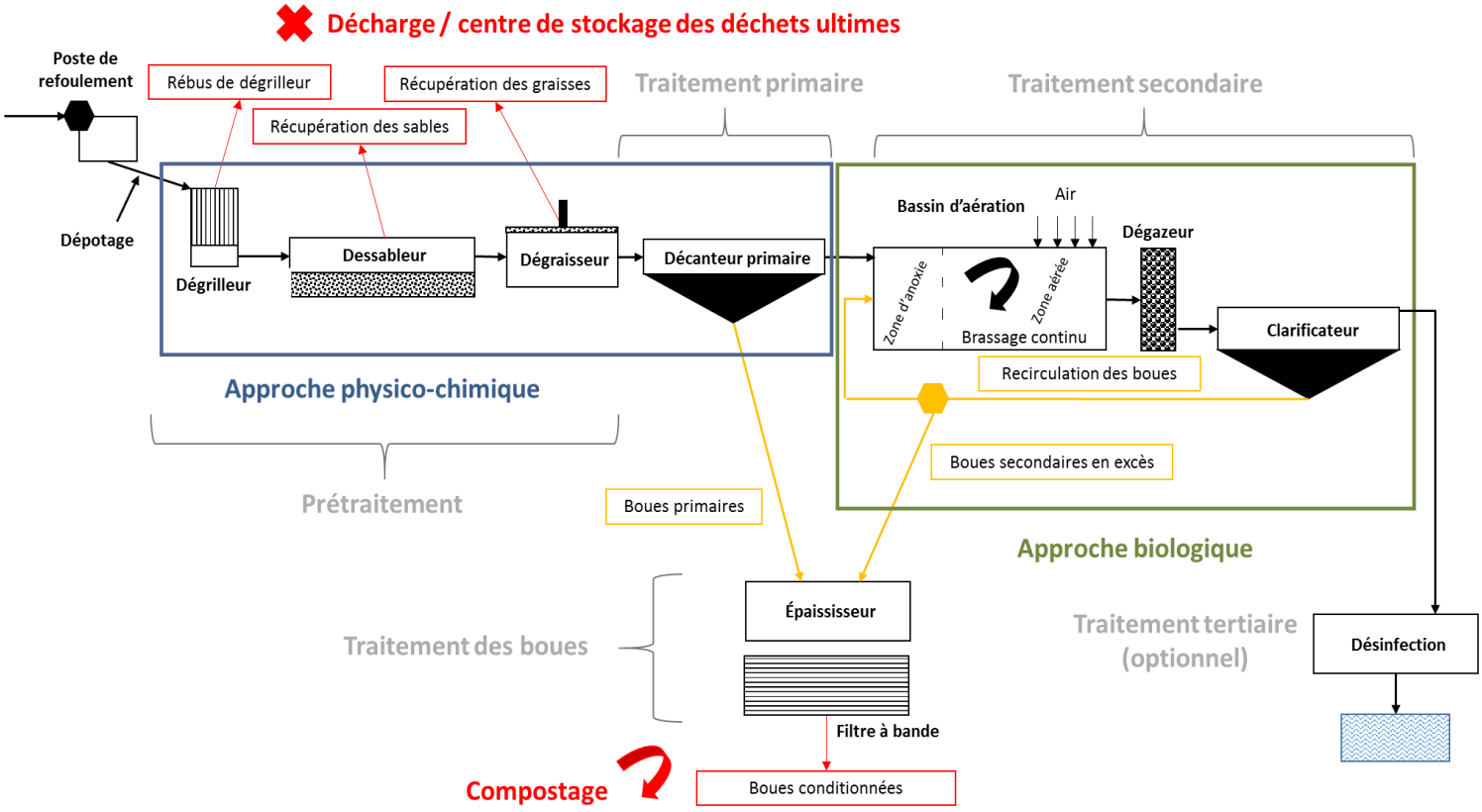


Figure 25. Représentation schématique du process de traitement des effluents. Les procédés mis en œuvre sont calqués sur la station d'épuration analysée lors de ce projet ; celle-ci ne présente pas de traitement tertiaire des effluents avant libération dans l'environnement marin.

3. Principaux risques biologiques et points d'exposition au sein d'une station d'épuration

Les travaux dans les STEP peuvent exposer les travailleurs à différents risques, dont les risques biologiques (bactéries, virus, champignons, parasites et endotoxines) **(323,329)**. Un récent travail de compilation des données sur le sujet a cependant souligné que peu d'études apportent actuellement un lien de causalité évident entre une infection et ce lieu de travail excepté pour des cas d'hépatite A. Les auteurs ont aussi mentionné que les employés sont potentiellement plus à même de présenter des troubles respiratoires et des parasites intestinaux que la population générale (non évalué par les pairs) **(332)**. Par ailleurs, une autre étude non mentionnée par ces derniers a souligné une plus forte prévalence de portage asymptomatique de *Tropheryma whipplei* (agent de la maladie de Whipple) chez des employés de station (8% contre 4% en population générale ; $p=0.017$) **(333)**.

Les espèces étudiées dans ce projet sont actuellement regroupées dans la classe 2 des agents biologiques. De ce fait, elles peuvent « provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; [leur] propagation dans la collectivité est improbable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace » selon la directive européenne 2000/54/CE. Par ailleurs parmi l'espèce *E. coli*, certaines souches ont été placées dans la classe 3** car généralement associées à une pathogénicité accrue et cytotoxique (*i.e.* sérotype O157:H7), et pouvant provoquer une maladie grave et se propager plus facilement (sauf dans l'air *a priori*). Ce classement est modifiable selon l'apparition de clones plus virulents par exemple **(334)**.

À titre de comparaison, les pathogènes à transmission fécale-orale cités précédemment et responsables de nombreuses épidémies à travers le globe (*i.e. Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, *Salmonella* spp., *Ascaris lumbricoïdes*, *Trichuris trichiura* et *Entamoeba histolytica*) font tous partie du même groupe 2 à l'exception de *S. enterica* serovar *typhi* et du virus de l'hépatite E classés au niveau 3** **(334)**. Ceci souligne bien les fortes inégalités pour ce qui est des systèmes de santé, d'accès aux traitements et d'assainissement entre les pays et notamment ceux en voie de développement, en situation instable, de conflit, ou de catastrophe naturelle (**Figure 24**) **(319,320)**. Par extension, les difficultés concernant la résistance aux antibiotiques (prévalence/diffusion etc…) sont d'autant plus grandes et seraient à mieux prendre en compte selon les régions **(302,335)**.

L'une des voies d'exposition des opérateurs est liée à la présence de bioaérosols. En effet, au sein de la STEP, les équipements n'étant pas toujours isolés ou capotés, différents points peuvent émettre des aérosols avec des germes en grande quantité. Certains équipements sont plus à même de produire des aérosols : dégrilleur, bassin d'aération par exemple, mais surtout les locaux de traitement et stockage des boues ou le poste de relèvement **(329)**. Le voisinage peut aussi être exposé par l'air, la réglementation faisant notamment mention de nuisances « olfactives » **(322)**. En effet, la qualité de l'air est généralement appréciée avec des indicateurs chimiques (H_2S, ammoniac...), sans données spécifiques et valeurs seuils pour les agents biologiques analysés dans le présent projet **(329)**. Contrairement à d'autres matrices comme l'eau, l'air et les bioaérosols restent beaucoup moins étudiés en ce qui concerne la présence de bactéries d'intérêt et la diffusion de la résistance, même si avérée **(16,336,337)**. Les recherches au sein de STEP et dans le voisinage de ces dernières présentent des résultats pouvant être variables selon les méthodes utilisées et les conditions spécifiques (environnement, process, météo...) **(332,336–338)**. Les voies d'exposition locales aux micro-organismes dispersés par ces aérosols sont la voie respiratoire par inhalation, la voie cutanée par un contact direct sur une peau lésée ou v*ia* les muqueuses, mais aussi la voie digestive par déglutition ou contamination indirecte (exemple : mains ou éléments souillés). La prévention de ce risque se fait par une réflexion lors de la création, des protections et règles de sécurité spécifiques ainsi que par la formation **(329,332)**. Très peu de recherches se sont intéressées au portage de bactéries résistantes chez les employés de station contrairement aux analyses faites chez les éleveurs par exemple **(166,181,339)**. En 2020, Zieliński W. *et al*. ont souligné un portage nasopharyngé de *Staphylococcus* résistant à la méthicilline chez les employés d'une station en Pologne pouvant être lié au process de traitement en analysant la présence de gènes spécifiques (virulence/résistance) entre des isolats de ces deux compartiments **(339)**. Ce premier travail original doit cependant être consolidé par du séquençage complet, mais rejoint l'analyse des espèces auxquels peuvent être exposés ces employés *via* les bioaérosols dans une étude menée au Danemark (germes non-résistants ; **Figure 26**) **(337)**.

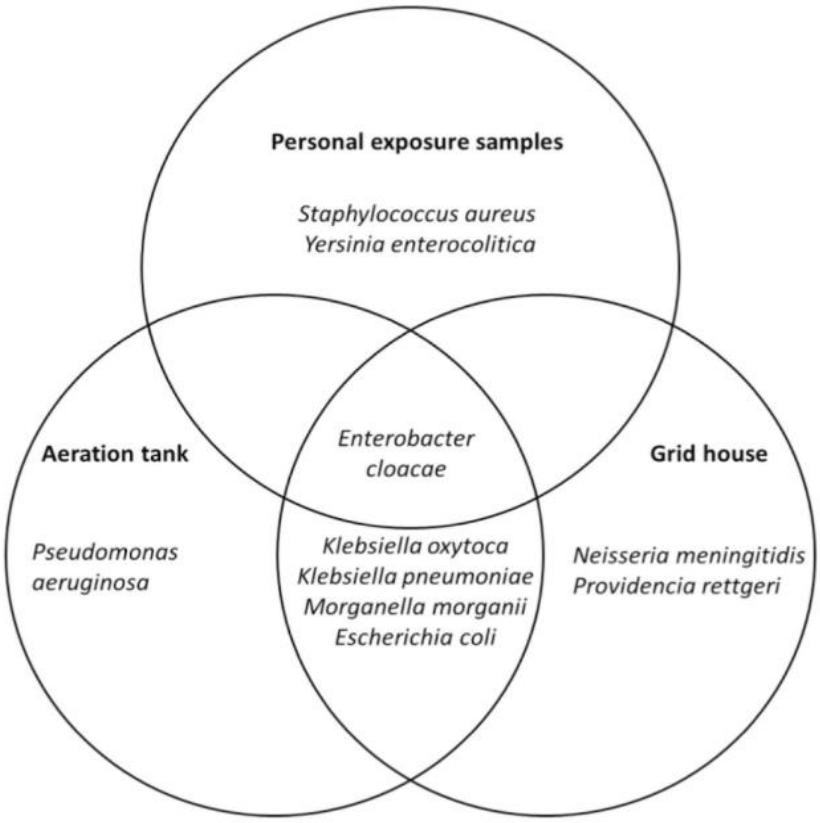


Figure 26. Diagramme de Venn des principaux agents retrouvés dans l'air autour des employés de station d'épuration à différentes étapes du process de traitement (337). Ces points de traitement sont le dégrilleur et le bassin d'aération.

4. Rôle des stations d'épuration dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques

Les STEP sont généralement pointées comme étant des « hot-spots » de la résistance. L'analyse et la recherche concernant l'antibiorésistance sont principalement concentrées sur le compartiment humain et l'environnement naturel qui est le récepteur final des effluents reste souvent négligé dans la démarche One-Health **(302,303)**. Un rapport conjoint des organisations mondiales (OMS, OIE, FAO) a par ailleurs récemment résumé en 3 points principaux l'impact de l'assainissement et des eaux usées sur la dissémination de l'antibiorésistance **(1)** :

- Les infections liées à la transmission d'agents pathogènes associés aux eaux usées ou les produits du process de traitement (boues, fumiers) dans le cas d'une mauvaise gestion, obligeant un recours important aux traitements antibiotiques en médecine humaine mais aussi dans les filières agricoles.

- « La transmission silencieuse » de micro-organismes déjà multirésistants, normalement à faible pathogénicité, mais ayant la capacité de transmettre dans un second temps ces gènes à des agents plus pathogènes *via* les plasmides par exemple.

- Les différents rejets associés aux eaux usées engendrant une pression de sélection importante dans l'émergence et le maintien des résistances ainsi que le transfert de ces gènes entre bactéries (résidus d'antibiotiques, métaux lourd…).

a) Les eaux usées pour apprécier la résistance au sein de la population humaine

Chez l'homme, les entérobactéries font partie de la flore normale du microbiote intestinal et peuvent être excrétées de manière importante. On estime qu'il peut y avoir jusqu'à 10^7–10^9 UFC d'*E. coli* par gramme de selles. Ces bactéries se retrouveront donc dans les eaux usées ou directement dans l'environnement **(56,321)**. L'un des principaux réservoirs de souches résistantes reste aussi le tube digestif y compris au sein de la communauté **(167)**. La quantité de germes résistants excrétée peut augmenter lors de traitements antibiotiques **(92)**. En effet, dans le cas d'une administration d'un traitement la composition du microbiote peut être profondément changée et il est possible d'observer un développement *in-vivo* de résistances **(115,153)**.

Les germes multirésistants sont dilués ou éliminés à différentes étapes du process d'acheminement et de traitement des eaux usées. Cependant, la surveillance microbiologique de cette matrice pourrait être complémentaire des données épidémiologiques classiques. Ceci permettrait d'avoir une image de l'état de santé de la population locale, des germes et des résistances qui circulent chez l'homme, comme cela a été réalisé pour le suivi des infections à SARS-CoV-2 en population générale **(340)**. En effet, les rapports de surveillance sur l'antibiorésistance sont généralement fondés sur des données hospitalières ce qui limite les connaissances sur le portage au sein de la communauté **(341)**. Ce suivi simplifié a notamment été proposée par l'équipe de Peacock S. J. en se concentrant sur la population globale d'*E. coli* (*i.e.* culture et phylogénie) **(15)**. Ces approches restent à améliorer et peuvent être biaisées par l'exposome et le microbiome propre aux eaux usées puisque l'on retrouve un « cocktail » de molécules chimiques qui ne reflète pas le microbiote humain. Ce type de suivi épidémiologique fondé sur les eaux usées est en pleine expansion et son champ d'application ne se limite pas qu'aux micro-organismes et aux gènes associés. Par exemple, la recherche et la quantification de molécules ou de métabolites spécifiques ont aussi été proposées dans le cadre du suivi d'activités illégales comme la consommation de drogues **(342)**.

L'intérêt de l'analyse des eaux usées est que cela ne pose pas de problème éthique et qu'il est possible d'aller encore plus loin avec des analyses de métagénomique pour ne pas se limiter aux micro-organismes « cultivables ». On parle aussi de « résistome-urbain » **(214)**. Un projet impliquant 60 pays a en effet développé cette approche globale en analysant les eaux usées avant traitement. Tous les sites analysés (n=79) contenaient des gènes de résistance, ce qui montre l'importance de cette matrice aquatique comme « véhicule » de la résistance à travers le monde. Des différences ont cependant été observées selon les continents. Les pays d'Amérique du Nord, l'Europe et l'Océanie présentaient une abondance et une diversité plus faible de gènes de résistance que les pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud. Par une analyse parallèle des données de surveillances nationales, ils ont aussi souligné que des facteurs socio-économiques et le niveau de santé de la population ont une forte influence sur la composition en gènes de résistance des influents de STEP. Grâce à ce constat et en mettant en parallèle les données génomiques et de surveillance ceci leur a permis de prédire l'abondance de la résistance chez l'homme à travers le monde (**Figure 27**) **(213)**.

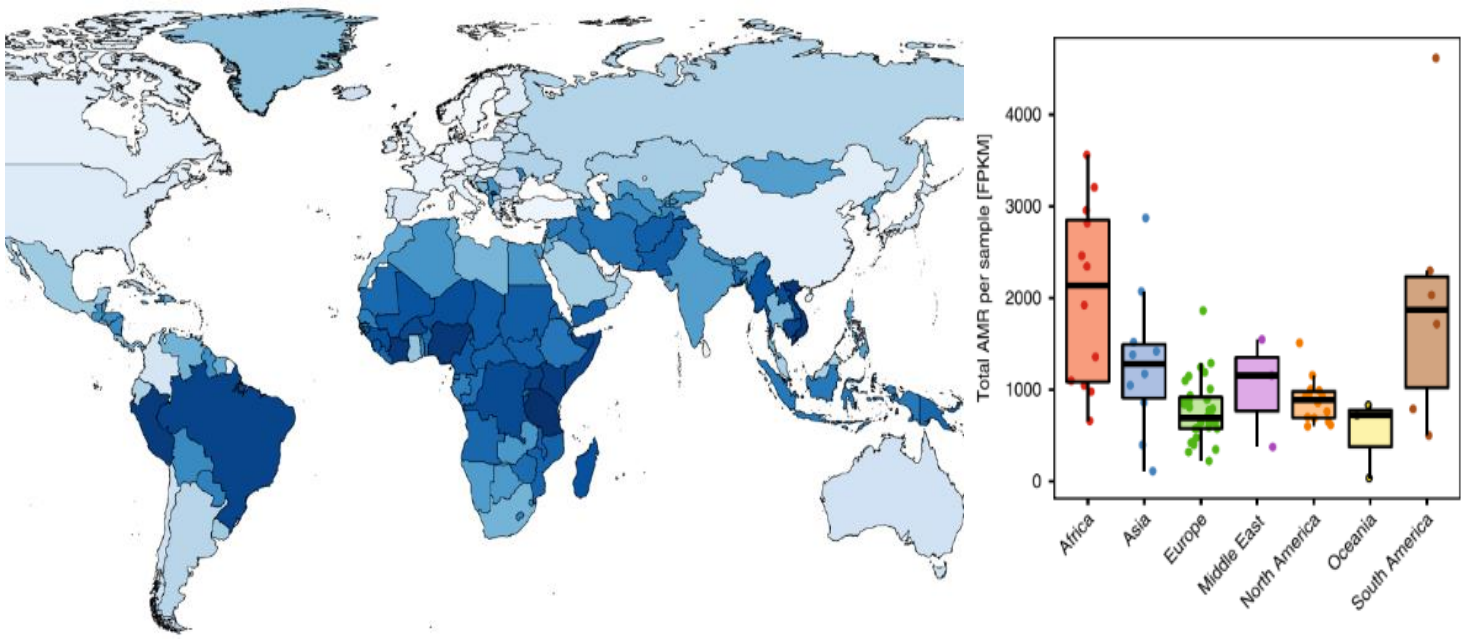


Figure 27. Estimations mondiales de l'abondance de la résistance aux antimicrobiens (213). Les pays en bleu clair ont une faible abondance contrairement aux pays en bleu foncé ; le graphique illustre les résultats obtenues pour les 79 échantillons analysés en métagénomique en entrée de STEP (total des fragments de gène de résistance par kbase par million de fragments par échantillon, FPKM).

Pour compléter ces observations mondiales, une étude européenne menée par un groupe de travail encadré par Manaia C. M. a pu mettre en évidence des relations entre gènes de résistance, antibiotiques et STEP. Les pays associés à ce projet étaient l'Allemagne, Chypre, l'Espagne, la Finlande, l'Irlande, la Norvège et le Portugal **(214,328)**. La première partie de l'étude a souligné une séparation de ces pays en fonction de leur consommation en molécules antibiotiques. Les pays les plus consommateurs d'antibiotiques (Chypre, Espagne, Irlande, Portugal) présentaient de façon significative une abondance relative en gènes de résistance dans les eaux usées urbaines supérieure à celle des 3 autres pays où la consommation d'antibiotiques était plus faible **(214)**. Comme l'analyse mondiale précédente, les gènes associés à une résistance aux β-lactamines, aminoglycosides, macrolides, sulfonamides et tétracyclines sont les plus abondants **(213,214)**. Il y a par ailleurs des variations selon les région du globe : sulfonamides et phénicols en Afrique et Asie ; macrolides en Amérique du Nord et Europe **(213)**.

b) Une efficacité de traitement variable

Comme l'illustre la **Figure 28**, les STEP sont un carrefour où vont s'accumuler les bactéries humaines pathogènes ou non, et plus ou moins résistantes aux antibiotiques **(343)**. Au vu du possible impact négatif sur l'environnement, de nombreuses études ont été mises en place afin d'évaluer l'efficacité du traitement sur l'élimination de ces germes. Plusieurs facteurs peuvent faire varier les résultats à commencer par les protocoles adoptés par les équipes, ce qui rend les comparaisons difficiles **(16)**. Par exemple, en adoptant une approche par culture de bactéries indicatrices, ceci ne permet pas de prendre en compte les gènes de résistances présents sur des bactériophages **(344)**. Or, la persistance de ces éléments après traitements secondaires et tertiaires (UV, chloration) a aussi été documentée et reste plus importante que la fraction bactérienne **(327)**. De façon générale en prenant en compte tous les marqueurs possibles, l'efficacité des systèmes de traitement reste partielle en ce qui concerne l'élimination des

bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports de la résistance. La plupart des études s'accordent à dire que les gènes de résistance, les éléments génétiques mobiles et les bactéries associées vont décroitre entre l'entrée et la sortie (**Tableau 4**) **(16)**.

Par ailleurs, une des préoccupations associées à la résistance concerne les eaux usées des établissements de santé qui concentrent initialement les résistances dans les services de soins. Les effluents des hôpitaux comme les eaux usées urbaines présentent une écologie relativement spécifique et stable en matière de résistome et de microbiome **(258)**. Selon un récent rapport de l'ANSES les effluents des établissements de santé sont généralement plus chargés en *E. coli* producteurs de BLSE que les eaux usées urbaines ($8{,}4\times10^6$ *vs* $6{,}5\times10^5$ UFC/L) **(345)**. Cependant, les eaux des établissements de santé sont ensuite très diluées dans le reste des eaux urbaines **(258)**. Il n'a pas été mis en évidence d'augmentation significative de l'abondance en gènes de résistance et d'éléments génétiques mobiles lorsqu'un hôpital est relié à une STEP **(257)**. Les traitements en station permettent de réduire la population d'*E. coli* productrices de BLSE d'environ 2 logs avant rejet. Par ailleurs selon les études, les STEP et d'éventuels traitements tertiaires, ces valeurs peuvent grandement varier. Il est possible de retrouver jusqu'à $2{,}5\times10^4$ UFC/L de ces germes résistants en sortie **(345)**.

c) Un exposome complexe et un microbiome « dynamique »

En plus d'être le point de collecte des matières fécales les eaux usées peuvent également concentrer différents éléments chimiques comme des métaux lourds, des détergents, des biocides ou encore des surfactants. Ce cocktail de molécules correspond à l'exposome **(258,346,347)**. Parmi les molécules antibiotiques utilisées en médecine, certaines ne sont pas totalement métabolisées par l'organisme et sont excrétées sous forme active dans les selles et/ou les urines. On retrouve notamment les quinolones/fluoroquinolones, les macrolides, les sulfonamides ou encore la colistine **(126,346)**. Au niveau des bassins ou des boues ces molécules ne seront que partiellement dégradées. À l'inverse, il est admis que les *β*-lactamines sont plus rapidement métabolisées et biodégradées. Par exemple, le ceftriaxone et la cefotaxime qui ont tous les 2 une excrétion biliaire ne sont en général pas détectés dans les selles par la suite **(153)**. En plus des gènes de résistance, les hôpitaux sont pourvoyeurs de ces molécules tout comme les eaux usées urbaines **(258,346)**.

Dans les systèmes de traitement, l'exposome peut engendrer une pression de sélection importante sur la population microbienne. Ceci va générer des déséquilibres, une modulation de cette population, et va faciliter le développement des micro-organismes résistants. Il y a donc une adaptation de la flore bactérienne en fonction des éléments en présence à l'image de l'ajout de carbazol dans les échantillons de rivière **(262)**. Il a notamment été démontré une corrélation significative entre la présence d'érythromycine dans les eaux usées et l'identification de gènes codant pour des résistances associées : *ere*(A), *ere*(B) et *mef*(A)/*mef*(E). La même équipe a aussi suggéré un effet similaire sur la présence de ces résistances avec une sélection croisée par le zinc et le triclosan **(346)**. Cependant ce type d'analyse reste généralement limité à quelques composés et ne prend pas en compte l'ensemble des facteurs pouvant influencer la résistance. Une autre analyse couplée à de la métagénomique a aussi trouvé une influence significative de cet exposome sur le résistome et notamment de la ciprofloxacine, du sulfaméthoxazole et de la vancomycine **(258)**.

L’action de l’exposome reste complexe à analyser dans sa globalité au vu du nombre de facteurs en jeu. De plus, même avec des approches de métagénomique cette corrélation antibiotiques/gène de résistance n’est pas toujours retrouvée selon les études, ce qui souligne toute la difficulté dans la compréhension des mécanismes en œuvre au sein des STEP **(213)**. Une récente analyse de données de métagénomique a en effet suggéré que l’abondance de gènes de résistance reste dans la majorité des cas modulée par la population fécale et non par des process de sélection au sein des eaux usées **(225)**. Dans l’étude européenne citée précédemment, l’analyse des résidus d’antibiotiques a montré des concentrations dans les effluents de STEP de l’ordre du ng/L voir du µg/L **(328)**. Il n’ont pas mis en évidence de corrélation avec l'abondance relative des gènes de résistance associés **(214,328)**.

Des échanges de gènes entre bactéries pathogènes et non-pathogènes peuvent tout de même avoir lieu au sein des eaux usées et des boues. En effet, les entérobactéries et les germes issus du microbiote intestinal de l’homme sont capables de partager des éléments génétiques mobiles dans ce microcosme complexe. Il a par exemple été démontré en laboratoire que les plasmides IncP (large spectre et *gfp*+) peuvent diffuser de façon importante vers de nombreux phylums de cette communauté (n=13) : de $3{,}39\times10^{-5}$ à $5{,}05\times10^{-4}$ CE/R (*i.e.* pKJK5 ; de 3 à 50 conjugaisons pour 100 000 souches réceptrices en milieu solide). La fraction microbienne qui va « capter » ce plasmide est dite « permissive » **(221)**. Ce haut potentiel de diffusion a aussi été mis en évidence par l’analyse métagénomique puisque l’abondance relative d’un marqueur spécifique de cet élément (*korB*) pouvait augmenter en sortie de station de façon significative **(257)**. Comme le résume la **Figure 28** la propagation des gènes de résistances et des pathogènes reste une combinaison de nombreux évènements. Ces derniers peuvent être amplifiés dans ce type d’environnement au vu de l’exposome et du résistome initiale. Les gènes de résistance vont pouvoir théoriquement mieux disséminer dans ces populations bactériennes **(343)**.

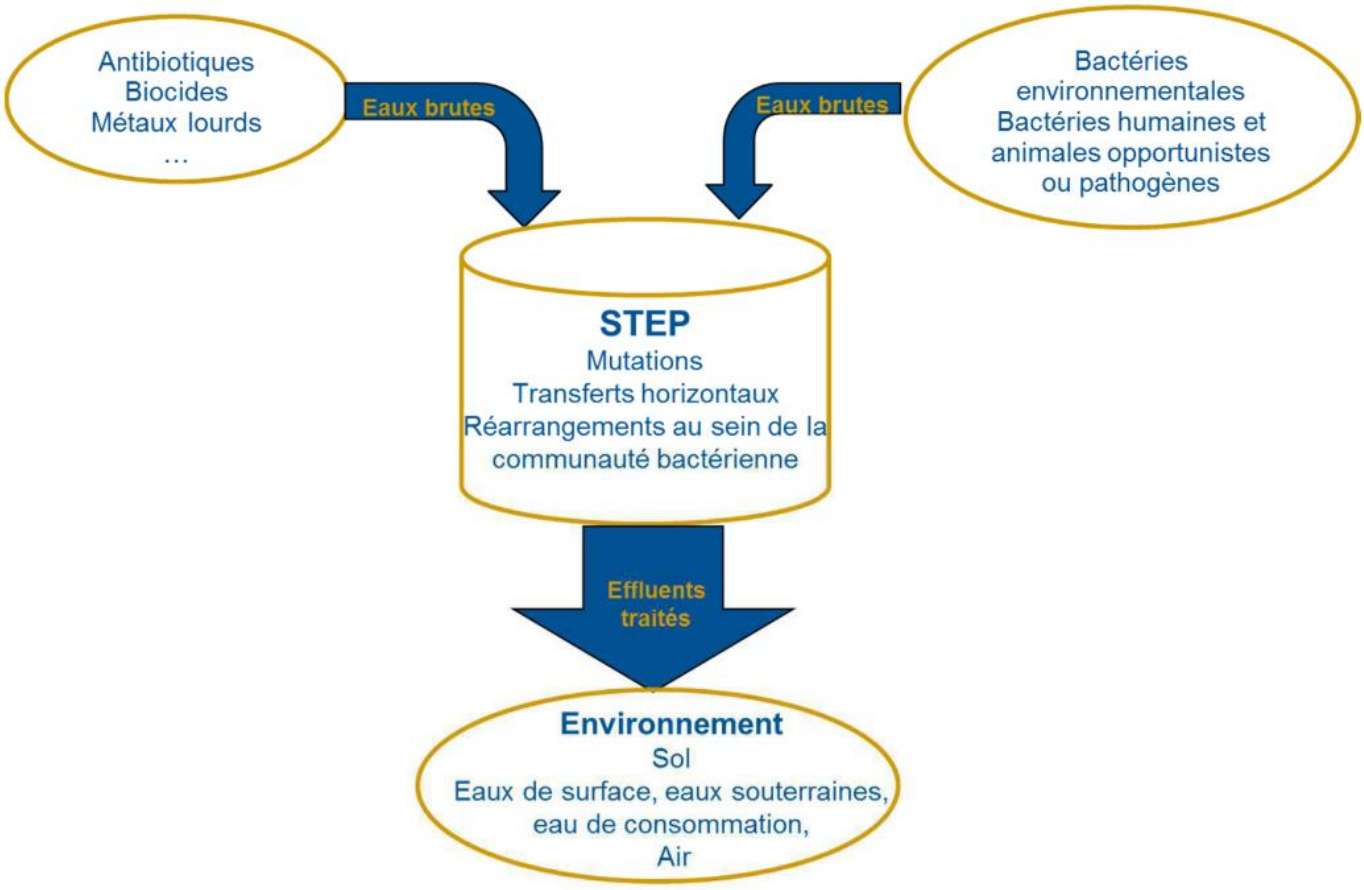


Figure 28. Représentation schématique d'une station d'épuration des eaux usées en tant que « bioréacteur » dans le développement et le maintien de la résistance aux antibiotiques (343).

Tableau 4. Résumé de la littérature sur la capacité des stations d'épuration des eaux usées à influencer la résistance aux antibiotiques (16). Ces données cumulent les conclusions de 118 articles d'intérêt publiés jusqu'en 2018 ; ATBR : antibiorésistance, ARB : bactéries résistantes aux antibiotiques, ARG : gènes de résistance aux antibiotiques, MGE : éléments génétiques mobiles ; les nombres d'articles dans chaque colonne sont indépendants les uns des autres.

	Concentration or absolute abundance	Proportion or relative abundance
ARB (measured in 54 studies)		
Decrease of all ATBR markers	$n=25$	$n=11$
Decrease of some ATBR markers	$n=2$	$n=19$
Increase of all ATBR markers or no variation	$n=1$	$n=10$
Not studied or not reported	$n=26$	$n=14$
ARG (measured in 61 studies)		
Decrease of all ATBR markers	$n=33$	$n=6$
Decrease of some ATBR markers	$n=14$	$n=18$
Increase of all ATBR markers or no variation	$n=3$	$n=3$
Not studied or not reported	$n=11$	$n=34$
MGE (measured in 43 studies)		
Decrease of all ATBR markers	$n=28$	$n=9$
Decrease of some ATBR markers	$n=3$	$n=2$
Increase of all ATBR markers or no variation	$n=4$	$n=3$
Not studied or not reported	$n=8$	$n=29$

d) Les effluents et les déchets associés : de possibles vecteurs de « contaminants émergeants » vers l'environnement et la faune sauvage.

La réglementation nationale et la surveillance des performances des STEP impliquent le suivi de différents paramètres qui sont : le pH, la température en sortie, la demande biochimique en oxygène (mesurée au bout de 5 jours ; DBO5), la demande chimique en oxygène (DCO) et les matières en suspension (MES). Selon les zones réceptrices une mesure des composés azotés et phosphorés est aussi exigée **(322)**. En ce qui concerne la résistance aux antibiotiques et les molécules pouvant être associées il n'existe pas de seuils spécifiques généralisés bien que cette élimination ait lieu en continu **(28,214,258,345)**. En effet, selon son niveau d'avancement (secondaire, tertiaire) le process de traitement des eaux usées est en mesure de diminuer la quantité de germes et de divers polluants, mais il ne peut pas supprimer totalement la diffusion de bactéries multirésistantes ou de pathogènes, même avec une étape de désinfection physique comme les UV **(15,49)**. La désinfection chimique présente aussi ses limites puisque la résistance au chlore a déjà été soulignée dans les bassins et des pathogènes peuvent toujours passer « entre les mailles du filet » **(29,348)**. Les fortes pluies et les possibles surrégimes observables dans des territoires comme la Guadeloupe peuvent aussi limiter l'efficacité du traitement et la réduction de la résistance **(257,318,349)**. Pour mieux comprendre cette problématique de la résistance et des mécanismes associés, les autorités européennes ont récemment mis en place une surveillance de certaines molécules antibiotiques dans l'environnement aquatique **(350)**.

Berendes D. *et al.* ont estimé à l'échelle mondiale et en se focalisant uniquement sur la population d'*E. coli*, que si 10% de celle-ci était représentée par des souches BLSE dans les selles humaines ceci revenait à une excrétion d'environ 19 milliards de kg de selles avec des lignées multirésistantes (2015) **(335)**. Malgré la création de systèmes d'assainissements, de fortes inégalités subsistent dans le monde et notamment dans les pays avec un revenu faible ou intermédiaire (*i.e.* efficacité limitée des STEP, défécation à l'air libre). Ceci va favoriser l'expansion de la résistance dans l'environnement **(321,335)**. Ce sont aussi les régions où le portage de BLSE au sein de la communauté est important, que les pratiques de défécation en plein air sont retrouvées et que les eaux usées sont les plus chargées en gènes de résistance **(167,213,321)**. Des pays comme le Brésil, l'Inde et le Vietnam sont ainsi considérés comme de possibles « hot-spots » dans le développement et la diffusion de nouveaux mécanismes de résistance *via* les eaux usées **(213)**.

Une mauvaise gestion des effluents va donc directement impacter l'environnement avec une possible surmortalité de la faune associée et des phénomènes d'eutrophisation (**Annexe 4**) **(322,326,351)**. Il peut y avoir une augmentation locale de la résistance aux antibiotiques au niveau du rejet des effluents traités **(16)**. À l'échelle microscopique on observe la création d'écosystèmes pouvant constituer un réservoir secondaire de résistances d'intérêt clinique, même dans des environnements très reculés et où l'influence anthropique reste faible (*i.e.* Arctique/Antarctique) **(47,255)**. Cette résistance diminue avec la distance du point de décharge grâce à des phénomènes de résilience et de dilution **(16)**. Par exemple, il est possible d'observer un gradient de gènes de résistance entre des sédiments de rivière impactés par les effluents urbains et des sédiments en aval dans des zones rurales ou en amont en milieu naturel

(184,306). À l'image du gradient de pression anthropique pour la faune sauvage, ce sont les zones où l'activité humaine est la plus dense qui concentrent ces résistances **(309)**. De même, la fréquence de transfert de plasmides conjugatifs pourrait être plus importante dans les échantillons des zones urbaines et près des effluents de STEP qu'en milieu naturel moins impacté **(184)**. En plus de possibles échanges plasmidiques de gènes de résistance, la problématique actuelle réside surtout dans la diffusion de souches d'importance clinique par le biais du milieu aquatique. En Thaïlande par exemple, des souches d'*E. coli* BLSE prélevées à différents points du continuum hydrique présentaient une très forte proximité phylogénétique (< 23 SNP) avec des isolats de patients hospitalisés dans la même région **(42)**.

Le passage en station ne supprime pas totalement le risque d'exposition des animaux en aval du process de traitement à commencer par la faune marine. En effet, ces animaux peuvent présenter à leur tour un portage de bactéries résistantes. Cette contamination indirecte a été suggérée par la présence de souches productrices de BLSE ($bla_{\text{CTX-M-15}}$) et de lignées généralement associées à l'homme chez des animaux prélevés près des côtes et dans des zones aquatiques sous influence anthropique **(84,182,255,352)**. C'est le cas notamment de poissons sauvages isolés en mer méditerranée qui présentaient des souches d'*E. coli* résistantes et majoritairement associées au phylogroupe A (59,1%) **(27,182)**. Au vu de ces connaissances il est toujours surprenant de savoir que certains hôpitaux en Europe déversent toujours leurs effluents dans l'environnement sans traitement en station au préalable **(204)**.

Les données sur l'exposition de la faune sauvage terrestre sont très hétérogènes **(16)**. Les process de traitement des eaux usées seraient à l'origine d'une augmentation du portage de résistance d'intérêt clinique au sein de la faune sauvage **(188,308,311)**. Sur les berges d'une rivière réceptionnant des effluents d'une STEP, Furness *et al.* ont par exemple souligné une charge plus importante de souches résistantes chez des rongeurs en comparaison avec d'autres individus prélevés dans un point moins exposé **(353)**. Par ailleurs, la possible « transmission silencieuse » entre compartiments évoquée par l'OMS dans l'environnement même de la station reste à ce jour très peu étudiée **(1)**. On compte notamment une étude comparative sur un portage fécal chez des oiseaux, ou encore une possible dissémination extérieure *via* des mouches (*Musca domestica*) ayant eu un contact avec les boues et d'autres déchets de STEP (*Enterococcus* spp.). Celles-ci ont aussi montré l'importante circulation de germes multirésistants chez ces animaux puisque par exemple des canards en contact direct avec les stations avaient une charge et une variété de gène de résistance bien plus importante que d'autres oiseaux sauvages prélevés dans des environnements « classiques » **(311,354)**. La majorité des études qui portent sur la sur faune en lien direct ou non avec cet écosystème ne présentent cependant pas d'analyses simultanées et approfondies par du séquençage complet de la population multirésistante retrouvée dans les eaux usées et en amont chez l'homme.

Les process de traitement secondaire mis en place ne permettent pas de supprimer totalement la diffusion de certains micropolluants. Il existe donc autour des zones d'activités humaines une contamination en continu de l'environnement et un gradient de molécules chimiques. Plus la consommation en antibiotiques est importante dans la population plus les molécules associées seront abondantes dans les eaux usées **(328)**. Parmi les secteurs impliqués dans cette diffusion on retrouve l'industrie pharmaceutique. En effet, la production

d'antibiotiques dans des pays comme l'Inde peut exposer l'homme à de fortes concentrations de ces molécules *via* les eaux usées associées et les points d'eau de consommation pollués dans ces régions. La persistance de certaines classes d'antibiotiques dans l'environnement aquatique est bien documentée. Par exemple, jusqu'à 14 mg/L de ciprofloxacine ont été mesurés en sortie de traitement dans la région de Patancheru. Le même antibiotique a été retrouvé à une concentration de 0,001 mg/L à 30 km en rivière en aval et dans des puits et lacs situés aux alentours **(355)**. À titre de comparaison la plus forte concentration détectée pour cet antibiotique en sortie de STEP dans le précédent projet européen était de 613,0 ng/L (Portugal) **(328)**. Dans des environnements impactés par l'homme, c'est principalement la contamination fécale qui est associée à des taux importants de gènes de résistance aux antibiotiques et non la présence de résidus d'antibiotiques pouvant induire le développement et la sélection secondaire de germes résistants **(225)**. Par ailleurs, une diffusion de molécules avec d'importantes concentrations (*i.e.* mg/L) reste très préoccupante puisqu'elles sont initialement conçues pour moduler les populations bactériennes. Ces zones environnementales spécifiques qui vont capter ces éléments peuvent être considérées comme des « hot-spots » de la résistance **(225,355)**. Les fluoroquinolones sont classées parmi les « antibiotiques critiques » particulièrement générateurs de résistances bactériennes lors d'une thérapie **(130)**. Ainsi, la ciprofloxacine fait partie des substances soumises à surveillance dans les eaux de surface de l'Union européenne puisqu'elle est « susceptible de présenter un risque significatif pour ou par l'intermédiaire de l'environnement ». Les macrolides dont l'azithromycine sont aussi susceptibles de présenter un risque environnemental notamment en Europe **(350)**. Des procédés de traitement supplémentaires pourraient limiter l'expansion de ces molécules dans l'environnement (filtration sur sable ou épuration biologique par membranes d'ultrafiltration) **(328)**. Les rejets des sites industriels selon les activités peuvent aussi excréter différentes molécules comme les métaux lourds dans l'environnement aquatique. Contrairement aux antibiotiques les métaux lourds ne sont pas biodégradables. Ils vont donc s'accumuler de manière plus importante engendrant un déséquilibre de la flore microbienne au niveau local. Dans des sédiments d'une rivière près d'un ancien site de métallurgie en France (MetalEurop, la Deûle) il a été clairement montré un enrichissement de la communauté bactérienne associée avec des plasmides de type IncP suggérant une forte adaptation locale médiée par des transferts horizontaux **(222)**. Enfin, les décharges par lixiviation peuvent aussi diffuser cette pollution et des bactéries résistantes **(356)**.

Enfin la problématique de ces « contaminants émergents » (gène de résistances / résidus d'antibiotiques) n'est pas seulement associée aux eaux usées urbaines. Les animaux de rentes peuvent aussi les excréter **(12,31,92,181,282**). L'exemple de la colistine en association avec les filières agricoles chinoises comme mentionnée plus haut a clairement souligné cette incidence environnementale et les préoccupations sanitaires qui en découle **(126)**. Un autre sujet qui met en lien STEP/élevage et environnement est la valorisation des déchets à des fins agricoles. Le devenir des boues de process varie selon les pays. La majeure partie est soit utilisée à des fins agricoles, épandue comme compost, soit incinérée **(325)**. Même si les filières agricoles peuvent être réticentes à l'utilisation de compost à base de boue de STEP comme engrais et conditionneur des sols, ces produits soumis à des normes spécifiques pourraient être de plus en plus utilisés **(331)**. Avec les déchets d'élevage (fiente, fumier, lisier) ces composts peuvent

théoriquement avoir un impact dans la diffusion de germes résistants, pathogènes, et d'éléments pharmaceutiques dans l'environnement et ont fait l'objet de recherches spécifiques sur le territoire guadeloupéen **(185,357)**. La quantité de gènes de résistance mais aussi de pathogènes probables suggère que l'utilisation incorrecte de ces amendements peut entrainer comme le lisier une diffusion de gènes de résistance dans les sols, mais aussi un risque d'acquisition de gènes de résistance ou une colonisation par des bactéries d'origine fécale au niveau des végétaux (*i.e. Lactuca sativa*) **(5,233)**. Une récente méta-analyse sur le traitement des déchets organiques a permis de conclure à une bonne efficacité du compostage et du séchage dans la réduction de la résistance (gènes et éléments génétiques mobiles). En effet, cette réduction serait de 84% pour le compostage contre 98% avec une approche par séchage **(16)**. Une autre problématique environnementale se pose aujourd'hui lorsque l'on utilise les boues de STEP. En effet elles peuvent concentrer une partie des micro-plastiques systématiquement retrouvés dans les eaux usées (de $4{,}40\times10^{3}$ à $2{,}40\times10^{5}$ particules par kg) **(325)**. Le devenir de ces éléments après épandage reste encore peu étudié. On retrouve aussi différentes molécules dont des résidus d'antibiotiques. En Guadeloupe par exemple, ces boues présentaient notamment des résidus de tétracycline (70 µg/kg) et de doxycycline (74 µg/kg) **(259)**.

Enfin, les défis de l'accès à l'eau ont aussi amené de nombreux pays à promouvoir l'utilisation d'eaux usées traitées pour l'irrigation des champs dans certaines régions du globe afin de pallier à une faible pluviométrie. On estime que plus de 20 millions d'hectares dans le monde sont sujets à ce type de procédé de recyclage **(358)**. Au Mexique, une irrigation sur une longue durée (100 ans) n'a pas mis en évidence d'enrichissement de la communauté bactérienne du sol en résistances, intégrons et plasmides de type IncP dû à l'irrigation ou à une sélection potentielle par des concentrations croissantes de métaux lourds et de composés antibiotiques **(358)**. En Israël, des analyses complémentaires sur une durée plus courte ont aussi souligné que les bactéries résistantes apportées par les effluents ne vont pas persister dans les sols irrigués. Ils peuvent toutefois présenter une charge initiale de bactéries résistantes « natives » **(347)**. Par ailleurs, un second projet mené dans ce pays a souligné que l'utilisation intensive de ces eaux pouvait aussi exposer le consommateur à différentes molécules chimiques. En effet, de très nombreux composés pharmaceutiques sont susceptibles de se retrouver dans les eaux traitées utilisées pour l'irrigation à de très faibles concentrations (ng/L à µg/L). Ils peuvent persister et s'accumuler dans les sols (ng/g), pour ensuite migrer jusqu'au produit cultivé sur ces parcelles. Les propriétés du sol et la physiologie de la plante vont faire varier ces valeurs avec une plus forte concentration pour les légumes à feuilles **(359)**. Ces différentes notions environnementales suggèrent qu'une amélioration des traitements des effluents urbains et une surveillance de composés spécifiques sont aujourd'hui primordiales pour limiter tout risque sanitaire à court et long termes.

e) Approches et méthodes pour l'appréciation de la résistance dans cette matrice

Il existe de nombreuses approches pour apprécier la résistance dans un échantillon donné **(16)**. Elles sont regroupées dans deux grands groupes qui sont culture-dépendant ou culture-indépendant. Si l'on se concentre sur les eaux usées, l'approche par culture est la plus classique. Elle implique généralement la recherche d'un germe indicateur avec parfois au

préalable une sélection de phénotypes de résistance (milieux sélectifs avec antibiotique). Les approches par cultures sélectives peuvent être utilisées pour mettre en évidence des « résistances fantômes » peu représentées dans des échantillons **(126)**. Il est aussi possible de coupler les deux approches, phénotypique/génotypique par du séquençage complet afin d'approfondir les relations phylogéniques entre isolats mais surtout connaitre les gènes de résistance et éléments génétiques en présence **(15)**. Par ailleurs, selon l'antibiotique utilisé et les résistances analysées ceci peut aussi conduire à des faux-positifs. C'est notamment le cas des mutations pour les enzymes TEM avec des C3G **(162)**. L'induction de la céphalosporinase chromosomique et les mutations associées peuvent aussi être biaisées par l'utilisation d'antibiotiques comme les aminopénicillines, les C1G et la céfoxitine **(145,146)**.

Cependant, les résistances peuvent aussi être présentes soit sur des bactéries non recherchées, soit sur des bactéries « viables mais non cultivables ». Ce qui ne permet pas d'avoir une vision globale et peut s'apparenter à un faux négatif pour les résistances. Par exemple, les genres *Acinetobacter* ou encore *Acidovorax* restent peu recherchés à l'inverse des entérobactéries, mais ils peuvent être très abondants parmi les germes résistants au sein des eaux usées **(213)**. L'approche moléculaire avec la présence ou l'absence de gène par des PCR spécifiques mais aussi par la quantification (qPCR) sur des échantillons vont permettre d'apporter une mesure plus directe des gènes de résistances en présence ou de leur vecteur (*i.e.* gène de résistance, groupe d'incompatibilité, *intI*1). Cette approche peut aussi se faire sur des échantillons très anciens et apporter des données historiques **(184,214,254,305,306,327)**.

Les approches métagénomiques avec des marqueurs spécifiques sont aussi de plus en plus utilisées **(16,257,258,344,360)**. Il y a cependant pour le moment une hétérogénéité dans les indicateurs sélectionnés et dans les protocoles développés par les équipes ce qui limite la bonne compréhension du problème de diffusion de la résistance **(16)**. Ce manque d'uniformisation limite les comparaisons entre études mais aussi entre les pays. Des projets européens ont par exemple été mis en place pour réduire cette variabilité **(214,328)**.

Enfin d'autres approches pour mettre en évidence une partie des plasmides conjugatifs d'un échantillon impliquent l'utilisation de souches de capture marquées. Ce type de protocole a notamment été utilisé par Dang B. *et al.* pour rechercher des plasmides conjugatifs dans des sédiments. L'idée est de d'utiliser comme transconjugant une souche d'*E. coli gfp+*, kanamycine et rifampicine R. Cette dernière lorsqu'elle sera mise en contact avec un échantillon brut (et non une seule souche donneuse) pourra acquérir les plasmides conjugatifs circulants notamment chez les entérobactéries. Le marqueur de fluorescence *gfp+* permet ensuite de mettre plus facilement en évidence les transconjugants après culture sélective **(184)**.

IV. L'antibiorésistance en Guadeloupe

Selon les chiffres de l'Institut national de la statistique et des études économiques (Insee), l'archipel comptait au 1er janvier 2018, 387 629 habitants. Comme en Martinique, la région présente une diminution de sa population, avec ici -0,7% tous les ans (2013 – 2018) **(361)**.

A) Focus sur le secteur hospitalier

Au fil des années, plusieurs réseaux et systèmes de surveillance des bactéries multirésistantes ont vu le jour en France. Les résultats associés restent cependant comparables et globalement homogènes. En ce qui concerne le secteur hospitalier, ces suivis vont principalement varier selon le nombre d'établissements et d'indicateurs considérés **(341)**. Sur l'ensemble du territoire national, l'incidence des infections à entérobactéries productrices de BLSE a été estimée à 0,52 infections pour 1 000 journées d'hospitalisation. Les espèces *E. coli*, KPNC et ECC étaient les plus représentées avec plus 90% des souches recueillies pour cette famille (n=12 415) lors du rapport de suivi 2018 de la mission Spares **(341)**. Une diminution de ce taux d'infections nosocomiales a été initiée à partir de 2016 (**Figure 29**) **(362)**. L'incidence de ces germes était bien plus importante que celle des SARM à la même période (0,17). Cette seconde incidence est en constante diminution depuis 2003 (**Figure 29) (341,362)**.

L'incidence nationale de *Klebsiella* et *Enterobacter* reste relativement stable tandis que celle d'*E. coli* diminue d'année en année (**Figure 30**) **(362)**. En Guadeloupe, les souches de KPNC BLSE présentaient une incidence élevée en 2018 et 2019 en comparaison avec l'ensemble du territoire français. En effet, l'estimation de ce taux était de 0,86 pour 1 000 journées d'hospitalisation dans cet archipel contre 0,18 en France en 2018, et de 0,26 contre 0,17 en 2019. C'est l'Ile-de-France qui présentait le plus haut taux d'incidence pour ce complexe en 2019 (0,28) **(39)**. La Guadeloupe reste toujours le territoire avec la plus faible incidence d'*E. coli* BLSE (0,09 et 0,01), contrairement aux données nationales qui placent cette espèce comme prédominante sur la même période (0,32 et 0,25 ; suivi GEODES ; **Figure 30**) **(39)**. Enfin à titre de comparaison, les données nationales disponibles de la mission Spares de 2018 étaient de 0,17 pour KPNC et 0,27 pour *E. coli*. Ce réseau de surveillance a aussi indiqué une incidence de 0,05 pour ECC **(341)**. La Guadeloupe présente également une faible incidence des SARM : 0,12 contre 0,21 sur le territoire national en 2018, et 0,02 contre 0,17 en 2019 **(39,176)**.

La prévalence de souches d'entérobactéries BLSE aux Antilles et dans le reste des Caraïbes reste cependant importante **(110)**. La Guadeloupe présente d'autres spécificités. Elle n'est pas pour le moment une région avec une forte prévalence de producteurs de carbapénèmase (S. Breurec, communication personnelle, 2016). Aucune souche n'a été rapportée au niveau communautaire, et « seulement » 2 ont été et publiées au CHUG depuis 2015 **(13,111,176,194)**. Même si l'incidence d'*E. coli* BLSE reste faible, une première étude de séquençage a mis en évidence la circulation des principales lignées pathogènes chez l'homme avec surtout le ST131, suivi des lignées ST38, ST69, ST95, ST410 et ST1193 (bactériémie période 2013 – 2014) **(4,40,43)**. Les gènes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ et $bla_{\text{CTX-M-27}}$ étaient prédominants dans ces prélèvements infectieux multirésistants (**Figure 33**).

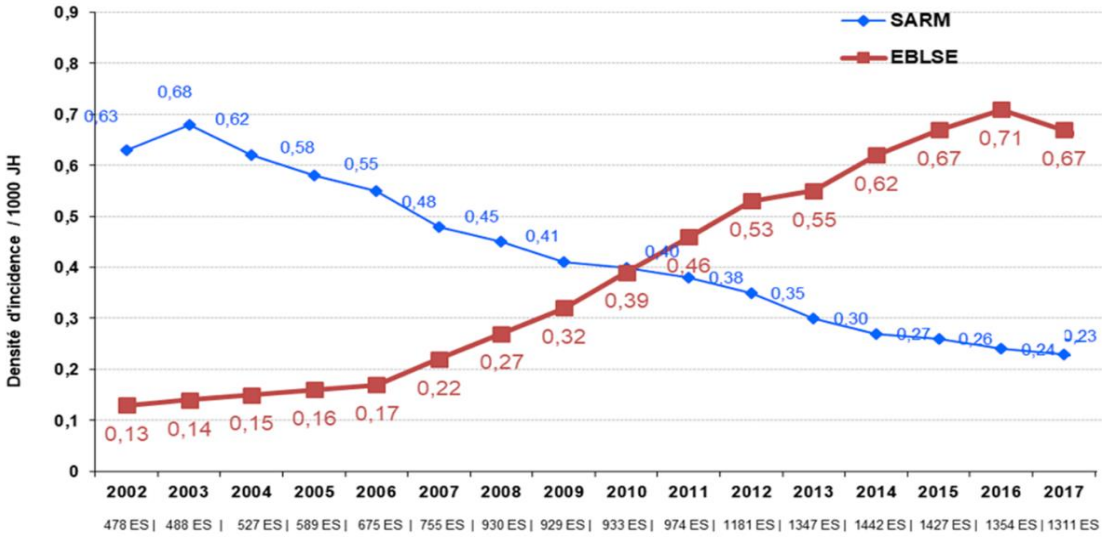


Figure 29. Densités d'incidence nationales des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline et des *Enterobacteriaceae* productrices de *β*-lactamase à spectre étendu pour 1 000 journées d'hospitalisation entre 2002 et 2017. Chaque année est associée à une densité d'incidence globale ; ES : établissement de santé ; le graphique est adapté des données du site Santé Publique France **(362)**.

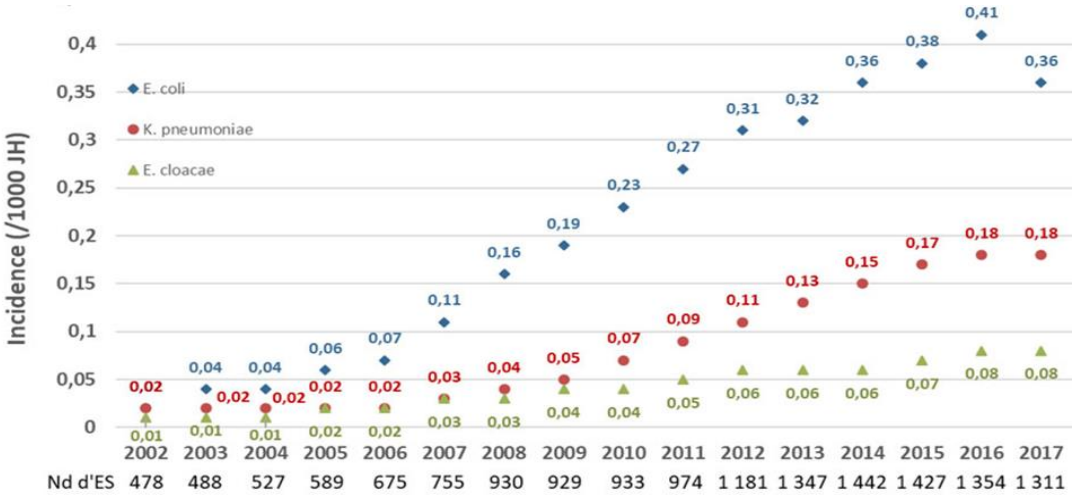
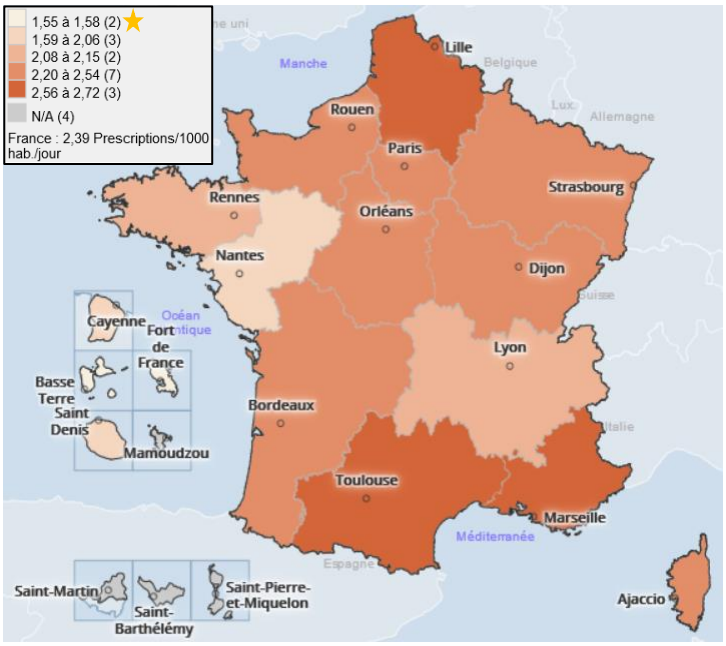
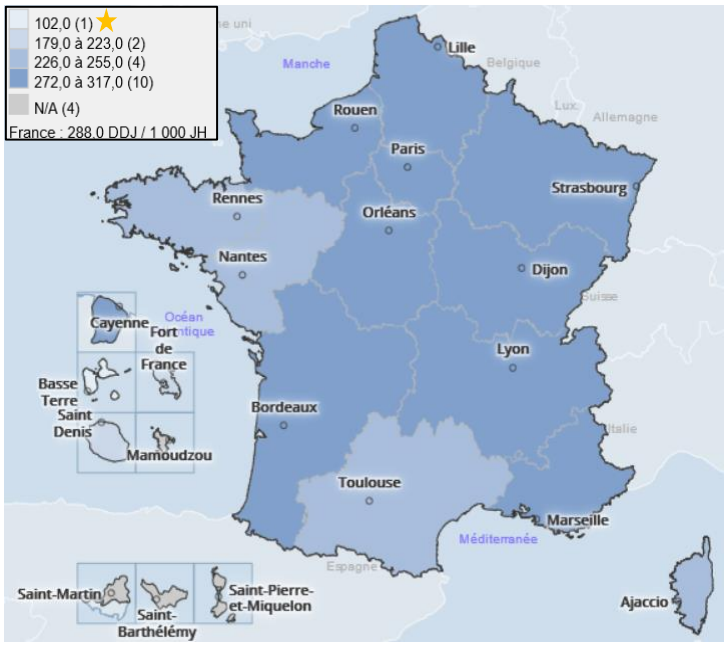


Figure 30. Densités d'incidence nationales des principales *Enterobacteriaceae* productrices de *β*-lactamase à spectre étendu pour 1 000 journées d'hospitalisation entre 2002 et 2017. Chaque année est associée à une densité d'incidence globale ; ES : établissement de santé ; le graphique est adapté des données du site Santé Publique France **(362)**.

En ce qui concerne la consommation en antibiotique, il y a une décroissance globale dans les établissements de santé (Mission Spares ; 2012 – 2018 : -6,7%). Celle-ci serait en lien avec l'application des différentes recommandations pour le bon usage de ces molécules **(190)**. En Guadeloupe, cette consommation reste très faible en comparaison avec l'hexagone : 102 doses définies journalières /1000 journées d'hospitalisation contre une moyenne de 228 (GEODES 2018 ; **Figure 31) (39)**. Les unités de soins intensifs sont les plus gros consommateurs **(190)**. Dans cette optique, les professionnels de santé en Guadeloupe ont engagé des changements pour adapter leurs pratiques en réanimation. Une stratégie restrictive est appliquée depuis 2015 au CHUG. Elle vise à limiter les antibiothérapies empiriques par des molécules à large spectre et surtout à raccourcir leur durée. Les traitements généralement à spectre étroit ne sont mis en place qu'après concertation avec les microbiologistes et réalisation d'un antibiogramme (sauf cas graves). Cette optimisation a permis une nette réduction de l'incidence des entérobactéries BLSE dans ce service (12,1 % *vs* 19 % en 2014). De plus, ces mesures n'ont pas eu d'effet négatif sur le patient puisque la mortalité a aussi reculé (22,5 % *vs* 28,6 % en 2014) **(176)**.



Nombre de prescriptions en ville de tous les antibiotiques à usages systémiques pour tous les âges (prescriptions/1 000 hab./jour).



Consommation de tous les antibiotiques surveillés en établissement de santé (FQ, C3G et CARB) (Dose Définie Journalière/1 000 journées d'hosp.).

Figure 31. Consommation nationale des antibiotiques en secteur de ville et dans les établissements de santé en 2018 (39). Les cartes sont issues du site de surveillance GEODES (rubrique déterminant antibiotiques) ; seul le nombre de prescriptions a été conservé pour la ville ; l'étoile orange correspond à la région Guadeloupe ; FQ : fluoroquinolones, C3G : céphalosporines de 3ème génération, CARB : carbapénèmes.

B) Données au niveau communautaire et agricole

La France reste l'un des plus gros consommateurs d'antibiotiques en médecine de ville (2017 : 6ème/28) avec une marge de 30% supérieure à la moyenne des autres membres de l'Union européenne recensés **(363)**. Pour la Guadeloupe les chiffres sont à l'image du secteur hospitalier. En effet, les prescriptions d'antibiotiques en ville semblent très faibles en comparaison avec le reste du territoire : 1,58 prescriptions/1 000 hab./jour contre une moyenne de 2,39 (2018 ; **Figure 31**) **(39)**. Celle-ci a d'ailleurs diminué de 14% depuis 2009, mais pourrait aussi être en lien avec des variables démographiques (*i.e.* âge et état de santé de la population) **(363)**. Les pénicillines à large spectre font partie des antibiotiques les plus prescrits.

Malheureusement aucune donnée de surveillance pour la résistance en secteur de ville n'a été communiquée, et seuls des travaux de recherche en ce qui concerne les infections urinaires communautaires à entérobactéries ont été publiés en 2016 **(13)**. Dans cette analyse, l'espèce *E. coli* était la plus retrouvée (57,0%) mais généralement non-BLSE, suivi par KPNC (15,5%). La présence de producteurs de BLSE était faible dans les prélèvements urinaires (3,5%, 39/1109), et 29 souches présentaient un gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ contre 7 avec $bla_{\text{CTX-M-1}}$ **(13)**.

En Guadeloupe, le secteur agricole représentait environ 3% des emplois salariés en 2018, et un peu moins d'un tiers de l'espace terrestre de l'archipel (**Figure 32**). La surface utilisée pour des cultures est estimée à 30 162 hectares avec majoritairement des parcelles de canne à sucre (13 390 ha). La Guadeloupe compte environ 6 000 exploitations et ce chiffre

diminue d'année en année. Il y a très peu d'élevages hors-sol ou de grandes fermes (environ 300). La répartition des élevages en nombre de têtes pour l'année 2018 était la suivante : 507 000 volailles, suivie par les bovins (39 012), puis la filière porcine (14 495), et les caprins/ovins (8 479) **(364)**. D'après une récente enquête menée par l'Institut Pasteur la tétracycline reste la molécule antibiotique la plus utilisée dans ces exploitations suivie par les *β*-lactamines et la streptomycine. Au même titre que la médecine humaine, l'utilisation de ces agents antimicrobiens reste modérée et rationnelle sur le territoire **(365)**. Les analyses bactériennes associées ont pu mettre en évidence la présence d'entérobactéries productrices de BLSE chez des chevaux (traités aux antibiotiques), mais aussi chez des bovins, des porcs et des poules (en élevage ou avant abattage). Pour les animaux de rente le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ était majoritaire chez *E. coli*, et dans une moindre mesure $bla_{\text{CTX-M-15}}$. Cette prévalence de résistance était cependant faible (< 15%). Enfin, chez des chevaux traités aux antibiotiques le gène $bla_{\text{SHV-12}}$ était prédominant et retrouvé pendant plusieurs mois **(185,259,365)**. Enfin la filière aquacole n'a pas pour le moment été sujette à ce type d'investigation. Elle reste cependant très minoritaire en Guadeloupe, surtout depuis la pollution par la chlordécone.

C) Données sur la situation de la faune sauvage en Guadeloupe

1. Une très grande richesse à protéger

L'archipel guadeloupéen présente un patrimoine naturel très riche et diversifié au niveau terrestre mais aussi marin en termes d'habitats et de paysages, de flore et de faune. Si l'on se concentre sur la faune terrestre, celle-ci est notamment retrouvée au sein des grands espaces forestiers de la Basse-Terre (**Figure 32**). On compte tout d'abord un très large éventail d'insectes, avec plus de 2 700 espèces répertoriées actuellement. Les oiseaux aussi représentent une très grande diversité avec plus de 250 espèces **(351,366)**. On compte ensuite une vingtaine d'espèces de reptiles (iguanes, lézards, serpents, tortues) et 7 de batraciens. De nombreuses espèces endémiques sont identifiées dans tous ces groupes **(58,351,367)**. Enfin les mammifères sont représentés par 5 espèces de micromammifères terrestres et des chauves-souris.

Avec les autres îles caribéennes, la guadeloupe fait partie des zones critiques ou « hot-spots » de la biodiversité mondiale, directement menacées par l'activité humaine **(351,368,369)**. En effet, ce petit territoire de la France d'outre-mer (1 434 km²) présente une densité de population importante de plus de 200 habitants/km^2. Celle-ci reste très inégale selon les sites, comme par exemple la ville de Baie-Mahault, avec plus de 600 habitants/km^2. Cette ville comprend notamment la zone d'activités de Jarry qui est le cœur économique et industriel de l'archipel. C'est une zone largement artificialisée qui regroupe à elle seule 85% des entreprises industrielles (**Figure 32**) **(43,364,370)**. La faune sauvage vit donc en partie en forte proximité avec l'homme et les activités associées (constructions, agriculture…). Ceci a obligé la mise en place d'un contexte réglementaire de protection du patrimoine naturel. C'est le cas pour la délimitation de la forêt marécageuse de Jarry, ou le parc national de la Basse-Terre, où les animaux mais aussi la flore sont « théoriquement à l'abri des pressions humaines » **(351,370)**.

2. Une prévalence limitée de l'antibiorésistance au sein de ce compartiment

Les rats [*Rattus norvegicus*, *R. rattus*] et les souris [*Mus musculus*] sont très présents sur l'île en raison d'une mauvaise gestion des déchets et de pratiques agricoles favorisant leur prolifération **(343)**. D'autres espèces exotiques envahissantes sont aussi mentionnées comme la mangouste (*Herpestes auropunctatus*), le crapaud buffle (*Rhinella marina*), l'iguane commun (*Iguana iguana*), la tortue de Floride (*Trachemys scripta elegans*) ou encore le raton laveur (*Procyon lotor*) **(370)**. Le portage de bactéries résistantes aux antibiotiques et plus particulièrement d'entérobactéries au sein de la faune sauvage guadeloupéenne a fait l'objet d'une précédente étude menée sur une large population (n=884). L'analyse a été réalisée sur 163 sites différents et sur 28 espèces représentatives de la diversité de l'archipel entre 2013 et 2014 **(43,343)**. Les observations locales essentiellement fondées sur une approche par culture et de prévalence des germes résistants ont permis de mettre en évidence une très faible prévalence de portage de producteurs de BLSE (*E. coli* n=7 ; 0,8%). Au vu du faible nombre d'échantillons positifs, aucun lien avec le degré d'anthropisation n'a pu être décelé **(43)**. Pour aller plus loin, une approche phylogénétique a souligné l'absence de circulation de lignée entre l'homme et cette faune sauvage (**Figure 33**). Cependant, par un séquençage hybride Illumina/MinION, un plasmide relativement conservé a été observé entre les deux compartiments ($bla_{CTX-M-1}$/IncI1/ST3) et à l'international **(43,282,296)**.

Une seconde observation de ce projet local était la forte prévalence d'ECC présentant une céphalosporinase hyperproduite au sein de la population d'*Anolis marmoratus*. Cependant aucune donnée génétique par séquençage complet n'a été produite jusqu'à présent pour approfondir ces seconds résultats. Or, la comparaison entre génomes isolés de différents compartiment proches dans l'espace et dans le temps est primordial pour approfondir et comprendre cette prévalence de résistance et une possible diffusion de clones entre compartiments **(58,343)**.

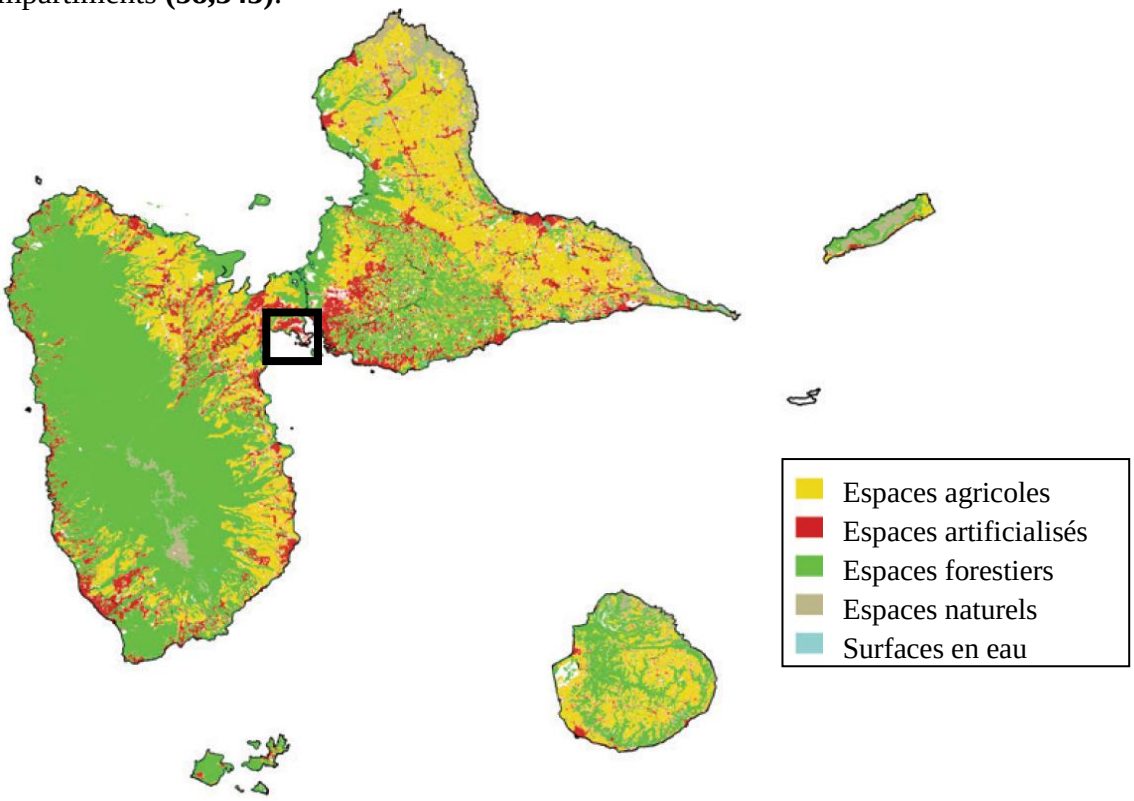


Figure 32. Carte d'occupation du territoire guadeloupéen (364). La zone d'activités de Jarry, est encadrée en noir.

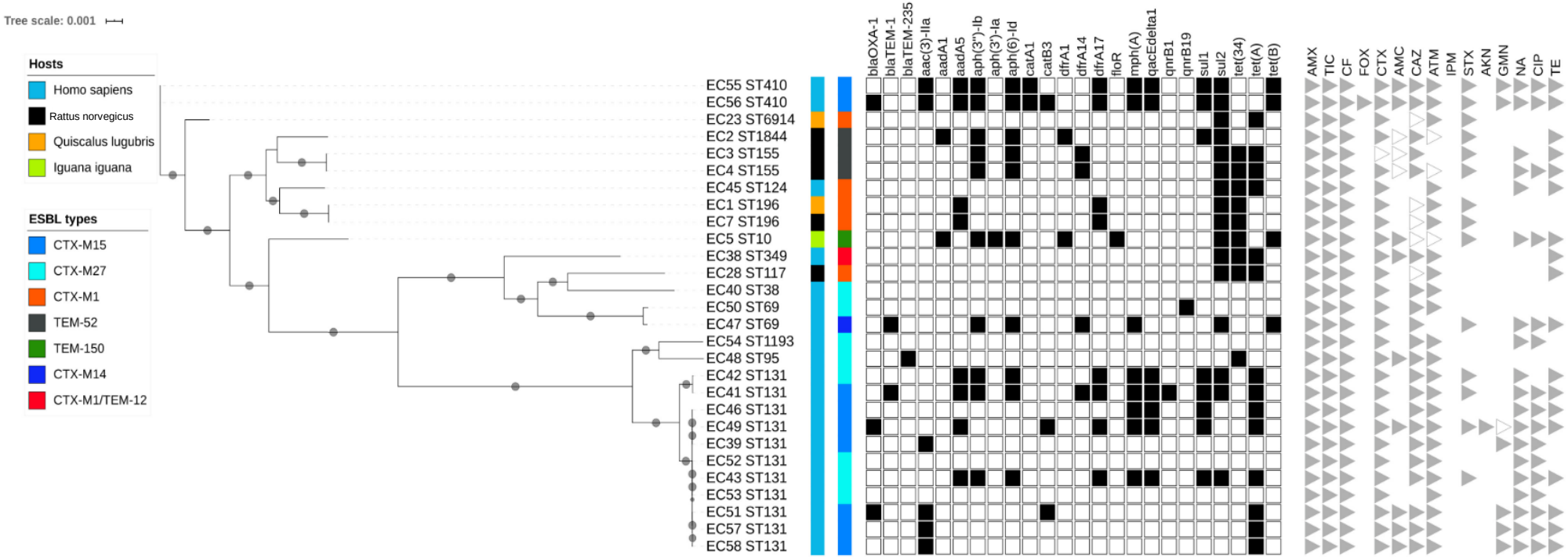


Figure 33. Arbre phylogénétique d'isolats d'*E. coli* BLSE de Guadeloupe retrouvés chez des animaux sauvages en comparaison avec une collection de souches humaines (2013 – 2014) (43). Les souches humaines proviennent du laboratoire de microbiologie du CHU de Pointe-à-Pitre/les Abymes et ont été à l'origine de bactériémies ; l'origine ainsi que les gènes de type BLSE sont indiqués par des bandes colorées ; les souches EC1 et EC23 ont été isolées du même oiseau ; le séquence type (ST) est noté après chaque code isolat ; la présence d'autres gènes de résistance aux antibiotiques est indiquée par un carré noir (ResFinder) ; la résistance aux antibiotiques suivants est indiquée par un triangle gris (triangle blanc, intermédiaire) : AMX, amoxicilline ; AMC, amoxicilline-acide clavulanique ; TIC, ticarcilline ; CF, céfalotine ; CTX, céfotaxime ; CAZ, ceftazidime ; FOX, céfoxitine ; ATM, aztréonam ; IPM, imipénem ; GMN, gentamicine ; AKN, amikacine ; SXT, triméthoprime-sulfaméthoxazole ; NA, acide nalidixique ; CIP, ciprofloxacine ; TE, tétracycline.

D) Situation du traitement des eaux usées et filières associées en Guadeloupe

1. Vue d'ensemble du réseau d'assainissement guadeloupéen

Cette partie a pour objectif de résumer la situation globale en Guadeloupe en ce qui concerne le traitement des eaux usées urbaines lors des campagnes d'échantillonnage (2018 – 2019). Il a été estimé que seulement 44% de la population guadeloupéenne était raccordé à un système collectif de traitements des eaux usées. Par ailleurs, des défauts de raccordement et de vétusté du réseau persistent (*i.e.* entrée d'eau pluviale avec risque de surrégime, point de rejet accidentel) **(318,349,370,371)**. Ces infrastructures sont soumises au risque sismique et aux aléas climatiques dans la région (saison cyclonique ; pluviométrie importante en Basse-Terre) **(330,364)**. Au total, 126 systèmes ont été recensés en 2018, et la conformité de ces ouvrages d'assainissement avec une filière plus ou moins complexe (boues activées, dénitrification, centrifugation…) était de 57% (n=72 ; **Figure 34**) **(372)**. Les autres structures (n=54) présentaient soit une non-conformité d'équipement selon la réglementation, ne permettant pas de traiter de façon optimale les pollutions entrantes et obligeant des travaux sur les ouvrages ; soit une non-conformité en performance ponctuelle ou chronique, selon les analyses d'auto-surveillance et de contrôle qui ont été effectuées pour la période **(322,372)**. Parmi les plus grandes structures, 18 présentent une taille supérieure ou égale à 2 000 équivalent habitants (EH) et sont réparties sur l'ensemble du territoire guadeloupéen (**Figure 35**) **(349)**. La plus grande de ces structures est celle de Jarry Pointe-à-donne (45 000 EH ; code Sandre : S079710300026) suivie par la station de Baie-Mahault Trioncelle dans le même secteur (18 330 EH ; S079710300008) **(372)**. Ces deux stations sont raccordées aux agglomérations les plus densément peuplées de l'île : Les Abymes, Pointe-à-Pitre, Baie-Mahault, et sont exploitées par Eau d'Excellence **(361,372)**. Comme le suggère la **Figure 35**, de nombreux grands ouvrages (67% ; 12/18) n'étaient pas en conformité lors de ce projet. Cette non-conformité découlait dans une majorité des cas de limites de performance ou de manquement dans l'auto-surveillance **(318,372)**. À titre de comparaison le nombre de stations de cette taille sur tout le territoire national était estimé à 3 920 avec seulement 3,58 % de non-conformité fin 2018 **(372)**.

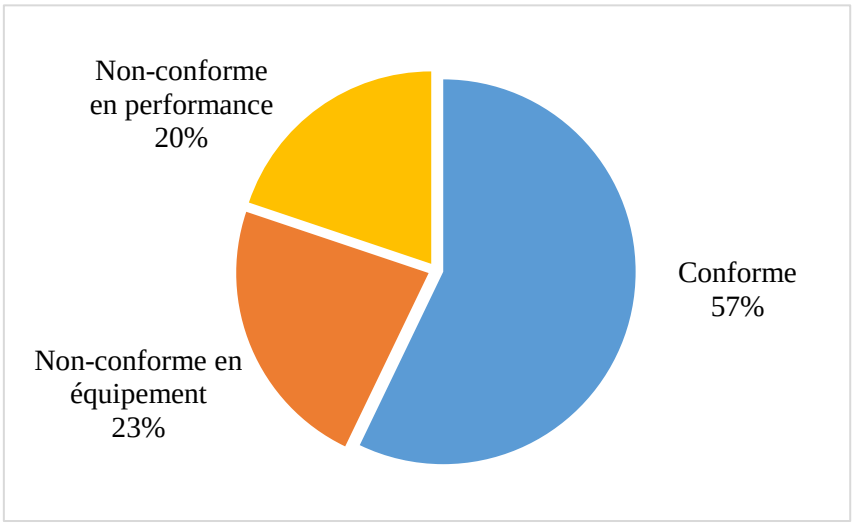


Figure 34. Statut de l'ensemble des stations d'épuration des eaux usées recensées en Guadeloupe (n=128) vis-à-vis de la législation en vigueur pour l'année 2018 (372).

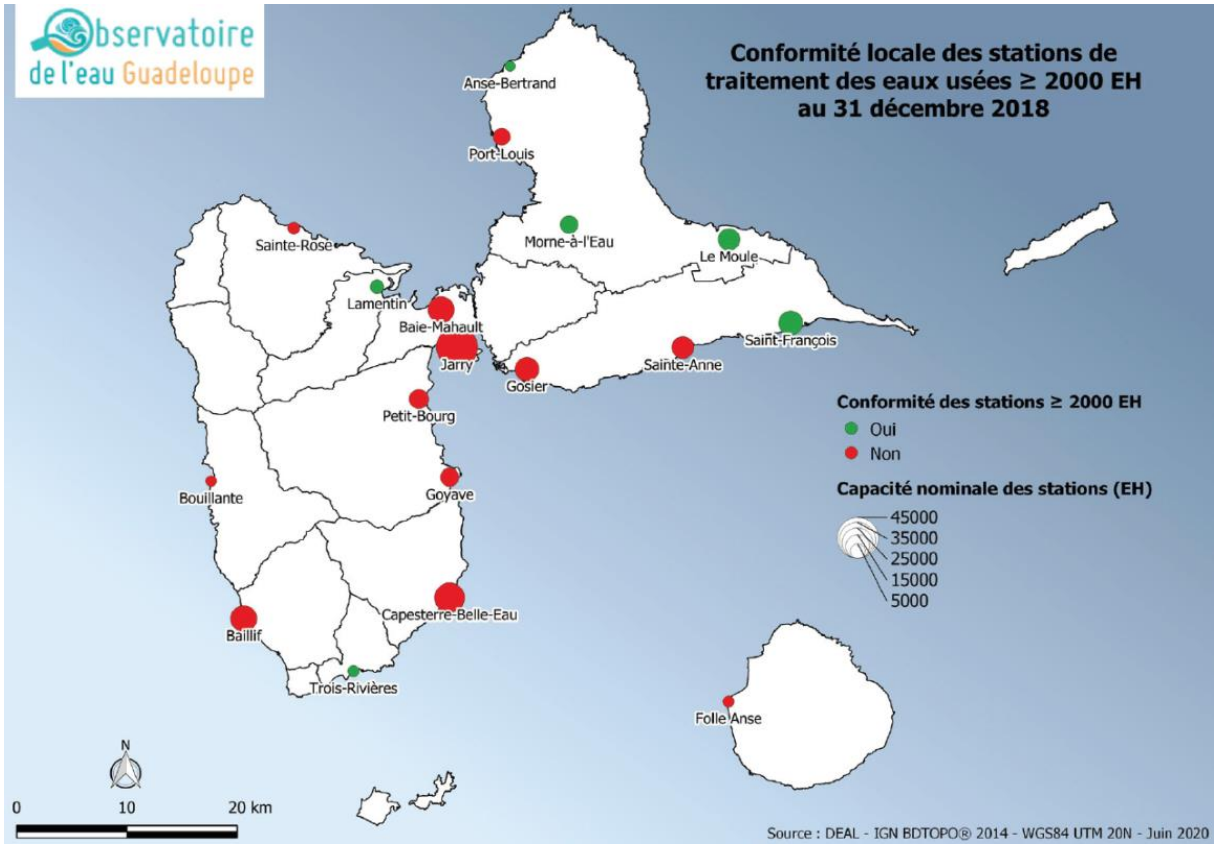


Figure 35. Localisation et statut des 18 plus grandes stations d'épuration des eaux usées de l'archipel guadeloupéen en 2018 (349).

2. Une filière en difficulté et une pollution environnementale palpable

La politique nationale et européenne d'assainissement est centrée sur la mise en conformité des ouvrages. La mise en place de plans d'action spécifiques initiés en 2011 a permis des avancées notables sur le territoire **(318,372)**. Cependant comme le souligne la Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DEAL) de la région, chargée des contrôles en tant que police de l'eau : « ces avancées restent néanmoins insuffisantes et trop lentes face à l'ampleur de la problématique de l'assainissement en Guadeloupe » **(318)**. De nouvelles mesures d'urgence sont en œuvre dans le cadre du Plan Eau Dom **(318,349)**. En effet, des défauts d'entretien, d'autorisation, d'exploitation, de performance, une vétusté de certaines portions des réseaux de collecte comme soulignés dans les réseaux de distribution de l'eau potable, et des difficultés de gouvernance et financières ont été énoncées dans différents rapports de suivi annuel **(349)**. Ce mauvais fonctionnement des systèmes de traitement des eaux usées de toutes les tailles a pour conséquence finale en plus de procédures administratives et européennes, une dégradation des eaux de baignade et une pollution environnementale notable **(318)**. Cette situation est fréquemment relayée dans la presse régionale et touche la majeur partie des communauté d'agglomération comme l'attestent ces différents titres : *Eau et assainissement : la dure réalité du Sud Basse-Terre* ; *Eaux usées sur le littoral de Saint-François : la municipalité compte intervenir* ; *Le préfet de Région somme de remettre en service la station d'épuration de Capesterre Belle-Eau* ; *Les insupportables odeurs de Cailloux au Lamentin* ; *Baignade interdite à la plage de Petite Anse à Bouillante* (**Figure 36**) **(371,373–376)**. En novembre 2020, une lettre ouverte sur le dossier de l'eau en Guadeloupe a été

transmise au préfet de région par la Fédération des Associations des Usagers de l'Eau de Guadeloupe (FADUEG) afin de demander des actions plus rapides et concrètes **(377)**.

Par ailleurs, la situation en Guadeloupe reste à « relativiser » si l'on compare les données avec le reste du territoire caribéen (2,75 million de km²). En effet un récent rapport sur la situation dans cette région du monde a souligné une dégradation importante de l'écosystème marin. La majorité de la pollution marine résulte de l'activité humaine généralement concentrée aux abords des côtes. Les eaux usées plus ou moins traitées, les rejets agricoles mais aussi un déficit dans le traitement des déchets solides (plastiques…) et des dépôts d'ordures sauvages sont à l'origine d'une eutrophisation et d'une sédimentation importante, d'une dégradation de la mangrove, des récifs coralliens (blanchiment) et d'une diminution de la faune (**Figure 37**). Ce rapport souligne notamment qu'environ 85% des eaux usées de ces territoires ne sont pas traitées de manière efficace avant de rejoindre le milieu naturel. Ceci est le résultat de structures de collecte et de traitement absentes, vétustes, trop petites ou inadaptées (**Figure 38**) **(368)**.



Figure 36. Illustration des défaillances dans les process d'assainissement et de collecte des eaux usées en Guadeloupe. Photos de presse 2018 – 2021 ; https://la1ere.francetvinfo.fr/guadeloupe/.



Figure 37. Illustration de la pollution aquatique aux Antilles et au Mexique (368).



Figure 38. Estimation du taux de traitement actuel des eaux usées domestiques dans les territoires caribéens (368). La position de la Guadeloupe est indiquée par une flèche.

3. Développement d'une valorisation locale des déchets d'assainissement

Parmi les déchets solides associés aux traitements des eaux usées, les boues présentent une valeur agronomique reconnue et leur valorisation par épandage se développe sur le territoire **(330,357,372)**. La Guadeloupe compte actuellement une filière spécifique de traitement par co-compostage de ce sous-produit de station développée par l'entreprise Sita Verde (Suez) **(331)**. Depuis 2008, elle récupère et composte par fermentation naturelle une partie des boues du site de Pointe-à-donne et d'autres stations sur sa plateforme de Gardel au Moule. Ces boues sont traitées avec divers déchets verts, des Fractions Fermentescibles des Ordures Ménagères (FFOM), des déchets d'élevage et de l'industrie agro-alimentaire **(330)**. Ces amendements organiques répondant à des normes spécifiques sont ensuite destinés à être principalement épandus sur les terres agricoles. Le reste de la production des stations d'épuration (boues, refus de dégrilleur…) est éliminé en décharge ou en centre de stockage des déchets ultimes (CSDU ; Énergipole Espérance à Ste-Rose). Un rapport sur la valorisation de la biomasse au sein du territoire en 2015 indiquait que seulement 4 000 à 5 000 tonnes des boues de STEP sont revalorisées sur les 17 000 produites annuellement sur le territoire **(357)**. Ce faible développement du co-compostage s'explique notamment par des dysfonctionnements au sein du parc des stations, limitant un apport régulier et conséquent de boue. De plus, les conséquences de la crise du chlordécone aux Antilles françaises, le manque de communication et divers a priori laissent une partie du milieu agricole méfiant pour ce type de produit, rendant son usage difficile **(331,357)**. Comme vu précédemment, certaines données scientifiques concernant cette valorisation étayent certaines préoccupations **(325)**. Un élargissement de la valorisation de certains déchets solides de station, notamment énergétique avec l'installation d'un incinérateur était en projet dès 2008 mais reste actuellement en suspens car contesté (*i.e.* plateforme multifilière de la Gabarre) **(357,378)**.

4. Une diffusion de l'antibiorésistance dans l'environnement aquatique

Les projets menés à l'Institut Pasteur de Guadeloupe depuis 2012 ont notamment souligné la forte présence d'indicateur fécal (*i.e. E. coli*) et d'autres entérobactéries dont certaines présentaient des gènes de résistance codant pour une BLSE ou une céphalosporinase au niveau des eaux de surfaces impactées par les rejets de STEP (*i.e.* Rivière salée, Ste-Rose). La même équipe a également souligné la diffusion de lignées pathogènes dans ces environnements aquatiques (notament *E. coli* ST131) **(28,343)**. Ces observations sont en accord avec les résultats scientifiques mondiaux traitant de cette problématique. Des mesures de pollution microbiologiques ont été effectuées sur eau de mer en aval de la STEP de Jarry Pointe-à-donne, dans la baie du Petit-Cul-de-Sac marin en sortie de l'émissaire et dans une zone de mangrove adjacente. Des huitres de mangrove (*Crassotera rhizophorae*) ont été prélevées dans la mangrove adjacente. Les bivalves filtrant ont en effet la possibilité d'accumuler des micro-organismes et les polluants de leur environnement. Aucune souche d'entérobactérie productrice de BLSE n'a été isolée en aval du site que ce soit dans l'eau de mer ou dans la chair des bivalves. La diffusion dans l'environnement aquatique et l'exposition de la faune sauvage marine à ces germes reste probablement limitée en Guadeloupe **(343)**. Par ailleurs aucune mesure de résidus d'antibiotiques n'a été effectuée sur les effluents pour le moment. De plus, aucune donnée de surveillance de ces molécules n'existe sur le point le plus proche du rejet dans la surveillance

des contaminants marins et du littoral effectuées par l'Ifremer (16.230714 N, 61.555763 W ; https://wwz.ifremer.fr/surval/).

5. Une limitation des indicateurs de la résistance après compostage des boues

Un second projet portant sur le devenir des boues et leur utilisation dans la filière agricole locale après co-compostage a pu mettre en lumière une limitation de la diffusion des entérobactéries résistantes lors des process de compostage et de culture maraichère. L'un des produits analysés correspondait au compost de la gamme « Fertigwa B » élaboré par l'entreprise Sita Verde. Il est le seul produit composé de boues d'épuration (¼) associées à des déchets verts (¾) **(259,330)**. Ce compost répond à la norme NF U 44-095 et est « recommandé pour les grandes cultures et l'aménagement des espaces urbains » **(330)**. La STEP de Jarry Pointe-à-donne, fait partie des fournisseurs de matière première après une étape de prétraitement sur place par épaississement et filtration à bande (déshydratation mécanique des boues par pressage) **(259,372)**. Le produit commercialisable après 1 mois de maturation reste moins utilisé par les professionnels que des composts intégrants des déchets d'élevage (*i.e.* fientes de poules) **(259)**. Des expérimentations de culture après amendement ont été effectuées sur une exploitation agricole (Pitaya, Petit-Bourg). Les intrants avant compostage dont les boues de station, le compost obtenu, le sol de culture et les légumes cultivés (*Ipomoae batatas* – *Curcumis sativus*) ont été analysés. La concentration des entérobactéries au sein des boues a été évaluée à $9{,}51\times10^{7}$ UFC/gramme de matière sèche (GMS) avant compostage. Dix-sept souches résistantes ont été isolées des boues provenant de la STEP de Pointe-à-donne (n=5). Elles appartenaient toutes à l'espèce *E. coli* et 6/17 étaient C3G-R et présentaient un phénotype de type BLSE ($bla_{\text{CTX-M-1}}$). **(259)**. Des germes cultivables similaires ont été retrouvés dans d'autres intrants dont les fientes de poules. Cependant après le processus de co-compostage aucune entérobactérie n'a été détectée sur gélose (seuil de détection de $9{,}9\times10^{1}$ UFC/GMS). De manière générale, « après compostage, ces bactéries ne persistent pas dans les sols amendés ou les cultures » analysés **(259)**. Divers gènes de résistance, et des résidus d'antibiotiques appartenant à la famille des cyclines ont été détectés dans les échantillons de boues de STEP (antibiotiques non recherchés dans les sols amendés). Une analyse plus poussée, sur la portion non cultivable et la résilience des sols seraient cependant à prévoir, car certains composts issus notamment des fientes de poule présentaient des charges plus importantes en gènes de résistance et leur utilisation répétée auraient un impact sur leur persistance dans la parcelle.

6. Antibiorésistance et environnement : une situation générale peu connue du grand public

Toutes ces observations indiquent qu'en dépit d'une utilisation raisonnée des traitements antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, la Guadeloupe n'est pas exempte de la problématique de diffusion de bactéries d'intérêt clinique et multirésistantes dans l'environnement. Les STEP et les déchets associés en seraient les principaux pourvoyeurs. Les analyses menées restent portées sur une culture de germes spécifiques, à l'exception d'une approche par séquençage en recherche de gènes marqueurs de la résistance dans les boues. Ces données ne sont pas présentées dans les rapports de suivi annuel, et mériteraient d'être mieux prises en considération en raison de l'impact sanitaire que représente la diffusion et l'accumulation de tels germes en plus des difficultés de non-conformité actuelles (objectif n°1

OMS) **(1,129,139,349)**. Après de précédentes analyses sur les eaux et le devenir des boues, ce présent manuscrit se concentre sur l'environnement même de la STEP et notamment la faune terrestre associée.

Objectifs et description de l'étude

Ces travaux de recherche ont bénéficié d'un financement FEDER apporté par l'Union européenne et la Région Guadeloupe. Ils avaient pour principale ambition de décrire la dissémination de souches humaines multirésistantes et des gènes associés, dans l'environnement et chez les animaux selon une approche One-Health. Nous nous sommes focalisés sur les entérobactéries qui peuvent être retrouvées dans ces différents compartiments, mais surtout en raison de leur importance chez l'homme et de la problématique associée au développement de résistances aux antibiotiques. La thèse est divisée en deux parties qui découlent des constats liés aux précédents projets menés au sein de l'Unité Transmission Réservoir et Diversité des Pathogènes de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe depuis 2012. Ils portent sur le lien entre antibiorésistance et environnement. Ces études locales ont permis de montrer que la Guadeloupe, d'une manière générale, n'est pas un territoire à forte prévalence d'entérobactéries C3G-R hors contexte hospitalier, à quelques exceptions près :

- ✓ Une forte prévalence d'ECC résistants par hyperproduction de leur céphalosporinase chromosomique a été soulignée dans la faune sauvage, particulièrement au sein de la population d'*Anolis marmoratus* **(43,343)**. Ces observations étaient fondées sur des données phénotypiques et aucune analyse génétique par séquençage complet n'avait été produite pour approfondir ces résultats.

- ✓ Les eaux usées produites en Guadeloupe contiennent des germes BLSE, qui ne sont pas totalement éliminés lors des traitements, impactant de ce fait l'environnement aquatique. Cependant, aucune donnée n'existe concernant l'environnement terrestre direct **(28,343)**. Une approche par séquençage et des analyses plus approfondies nous ont donc semblé nécessaires pour rechercher une possible diffusion vers l'environnement terrestre et notamment la faune avoisinante.

<u>Partie 1 – Projet *Enterobacter* :</u> Appréciation de la distribution et de la diversité d'*E. cloacae* complex résistant ou non aux antibiotiques dans les 3 compartiments de l'approche One-Health, dans un contexte « naturel » et de pression de sélection limitée.

Afin de conforter les précédentes observations et de mieux comprendre la présence de souches d'ECC C3G-R au sein de la faune sauvage de Guadeloupe, une première analyse a été effectuée sur une large collection de lézard endémique de cet archipel (*Anolis marmoratus*), mais aussi d'animaux de rente (cochon, vache) entre 2017 et 2018. Une collection a également été constituée à partir des eaux de captage, de fruits et de légumes locaux sur la même période. Le but était en adoptant une approche phylogénétique, de mieux comprendre cette forte prévalence de résistances chromosomiques au sein de ce complexe d'espèces, et de comparer

avec les données de résistance et de distribution observées au sein d'une collection de souches humaines. Cette première partie est présentée dans la publication : *"Wide distribution and specific resistance pattern to third-generation cephalosporins of Enterobacter cloacae complex members in humans and in the environment in Guadeloupe (French West Indies)".*

<u>Partie 2 – Projet ECHANGENE :</u> Appréciation de la dissémination de gènes d'antibiorésistance et des supports génétiques associés dans un contexte de pollution anthropique importante.

<u>Les objectifs de cette seconde partie étaient :</u>

1) D'étudier la diversité du génome et des plasmides de souches cliniques isolées au CHU de Pointe-à-Pitre / Les Abymes en se concentrant sur trois espèces d'entérobactérie : ECC (dans la continuité de première partie), *E. coli* (dans la continuité des précédents travaux de l'Institut), et KPNC.

2) D'étudier la diversité des gènes de résistance en se concentrant notamment sur les gènes associés au profil BLSE, le long des rejets des eaux usées de l'hôpital, à l'entrée et à la sortie de la STEP de Jarry Pointe-à-donne qui reçoit les effluents urbains et hospitalier associés, et parmi les animaux sauvages et domestiques prélevés autour de la station.

3) De comparer une sélection de plasmides de résistance isolés de souches humaines, de souches animales ou issues de prélèvements environnementaux, entre bactéries de même espèce, mais également entre les espèces étudiées.

Pour cette seconde partie nous avons de nouveau adopté une approche One-Health en réalisant des prélèvements en simultané dans les 3 compartiments entre 2018 et 2019. Les eaux usées ont fait office d'interface entre l'environnement et les activités humaines. Nous avons comparé la diversité génomique des souches, ainsi que les plasmides et les gènes de résistance entre les différents compartiments afin de mettre en mettre en évidence l'influence anthropique importante exercée par les STEP sur la population bactérienne, et d'apprécier l'écologie et le partage des résistances dans cet écosystème.

Nous avons tout d'abord apprécié la prévalence et la distribution des entérobactéries productrices de BLSE dans les compartiments humains et non-humains en se focalisant sur les espèces choisies (**Chapitre 1**). Après une sélection de germes à séquencer, l'analyse globale des gènes de résistance et des éléments génétiques mobiles en présence a été réalisée au **Chapitre 2**.

Nous avons ensuite réalisé une première étude phylogénétique focalisée sur la population d'ECC dans les STEP. Cette seconde analyse a fait l'objet d'une publication : "*Dissemination of extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacter cloacae complex from a hospital to the nearby environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 lineage coding for a successful IncHI2/ST1 plasmid"* (**Chapitre 3**).

La diversité d'ECC a fait l'objet d'une étude plus approfondie au sein des souches hospitalières afin de mieux cerner la diffusion de la résistance et les principales lignées associées dans les secteurs de soins. Ces résultats cliniques sont résumés dans l'article : *"Nosocomial extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacter cloacae complex members in Guadeloupe (French West Indies): emerging of a novel lineage and large spread of a bla$_{CTX-M-15}$/IncHI2/ST1 plasmid"* (**Chapitre 4**).

Enfin, en plus de cette espèce nous avons donc inclus KPNC et *E. coli* dans ce projet ECHANGENE, afin de mieux cerner la possible diffusion de résistances chez ces deux autres représentants des entérobactéries. En effet, comme détaillé dans la partie bibliographique ces germes présentent aujourd'hui un intérêt particulier en santé humaine **(74,139)**. KPNC reste la principale entérobactérie productrice de BLSE au sein de cet hôpital, tandis que l'espèce *E. coli* est généralement utilisée comme indicateur de diffusion de la résistance dans les 3 compartiments de la démarche One-Health **(39,341)**. Les résultats pour les approches phylogénétiques et la structure génétique de ces populations sont inclus dans les **Chapitres 5 et 6**. Le dernier chapitre de résultats présente une étude plus approfondie d'une sélection de plasmides en lien avec les précédentes observations et un approfondissement des séquences long-reads (MinION, nanopore ; **Chapitre 7**).

Tous les résultats obtenus et observations faites ont par la suite été analysés dans la section **Discussion** du présent manuscrit et des perspectives ont été suggérées pour la suite de ce projet.

MATERIEL & METHODE

INSTITUT PASTEUR

I. Caractéristiques et description des sites étudiés, projet ECHANGENE

A) Le Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre / Les Abymes

L'actuel CHUG a été créé en 1986. Les activités principales au sein de l'hôpital sont la partie MCO : médecine, chirurgie, gynécologie-obstétrique. On retrouve une partie psychiatrie générale et infantile. L'établissement présente aussi une partie soins de suite et de réadaptation et une portion importante de dialyse. L'effectif est de 3 302 personnes tout personnel confondu. Fin 2017, l'hôpital comptabilisait 23 949 hospitalisations en temps complet et 402 lits et places dont 26 de réanimation **(176,379)**.

Lors du projet, l'établissement était certifié V2010 après des remises à niveaux. En effet, concernant les thématiques associées à cette thèse, une réserve majeure sur le bon usage des antibiotiques (critère 8.h) a été émise en 2014. En cause, un manque de traçabilité des réévaluations des antibiothérapies. De plus, comme indiqué dans le rapport initial de certification, « l'établissement [n'avait] pas mis en place un suivi régulier de l'ensemble des rejets ». Le suivi était seulement focalisé sur les effluents des laboratoires et du service de médecine nucléaire (critère 7.a) **(380)**. À noter que l'établissement a depuis mis en place des actions. Il a aussi passé la certification V2014 à la fin de l'année 2020, avec cependant une obligation d'amélioration (niveau C ; **Annexe 3**) **(381)**.

Les entérobactéries productrices de BLSE sont les germes multirésistants les plus fréquemment rencontrés, avec par ordre décroissant de prévalence, KPNC, ECC et *E. coli*. De plus, l'incidence de ces germes en réanimation au sein de cet hôpital représente environ 5 fois la médiane des incidences retrouvées dans les services de réanimation de France métropolitaine (S. Breurec, communication personnelle, 2016).

Le 28 novembre 2017 l'hôpital a subi un incendie au niveau d'un local technique. Celui-ci a pu être maitrisé mais pour prévenir tout risque humain, le plan blanc « élargi » a été activé. Des services proches des émanations de fumées et de l'origine de l'incendie ont été évacués et les patients placés dans d'autres établissements. Cet évènement a fortement impacté le fonctionnement du centre hospitalier, et la section « parcours des patients » de la dernière certification (niveau C ; **Annexe 3**). Afin d'assurer la meilleure activité possible un hôpital de campagne a été réquisitionné et déployé sur le site du CHUG entre le 4 décembre 2017 et le 29 janvier 2018. Ceci a aussi engendré un changement d'organisation avec des délocalisations et un éclatement de plusieurs services. L'activité a aussi été revue à la baisse (environ -20%), avec pour exemple un nombre de places et de lit initiaux qui était de 916 (contre 402 à l'heure actuelle). La réintégration progressive des services et des relocalisations étaient toujours en cours à la fin de ce projet de thèse. Enfin, l'hôpital a aussi dû mettre en place une adaptation supplémentaire pour la prise en charge des patients atteints du COVID-19 **(379)**.

B) La station d'épuration de Jarry Pointe-à-donne

La station de Jarry Pointe-à-donne a été choisie puisqu'elle possède la plus grande capacité nominale sur l'ensemble de l'île avec 45 000 EH depuis sa dernière mise à niveau. Les communes connectées à ce réseau d'assainissement sont : Les Abymes, Baie-Mahault et Pointe-à-Pitre **(372)**. Elle est donc en charge du traitement des eaux usées du CHU de Pointe-à-Pitre / Les Abymes situé à environ 8 km (**Figures 39 et 40**). Les effluents du centre hospitalier mettent environ 2 h avant d'atteindre la station et représentent une faible part des rejets traités au vu de l'ensemble des communes prises en compte. Les eaux usées ont donc principalement une origine urbaine. Une petite portion de la zone industrielle de Jarry est aussi raccordée à cette STEP. Cette zone comprend des installation classées pour la protection de l'environnement (ICPE) **(370)**. La capacité de la station sera cependant limitée et insuffisante pour répondre efficacement aux besoins de l'agglomération dans les prochaines années.

La station a été inaugurée en 1978 (code Sandre S079710300026) et comporte aujourd'hui 2 files de traitement parallèles (notées a et b). Elles fonctionnent selon le principe des boues activées (**Figure 25**). La STEP s'étend sur 3 hectares environ (**Figure 39**). Selon la réglementation, l'ouvrage correspond à la tranche d'obligation de 10 000 à 100 000 EH. La STEP est reliée à une agglomération de 30 890 EH actuellement. Le débit enregistré en entrée était estimé à 13 999 m^3/j pour l'année 2019. La station était considérée comme conforme en équipement mais non-conforme en performance lors de l'étude (*i.e.* manuel d'auto-surveillance non validé, rabaissement non atteint) **(372)**. Comme les autres stations de l'archipel un risque de surrégime existe lors d'épisodes pluvieux **(370)**. Des points de relevage et une répartition différée permettent de limiter cet impact. Elle produit par ailleurs environ 2 000 tonnes de boues et des travaux sont à prévoir dans les années à venir **(357)**. Pour des raisons topographiques la station présente en entrée un système de pompage pour relever les eaux brutes et les répartir dans les lignes de traitements (point C ; **Figure 41**). Le dépotage des camions hydrocureurs de société privées (vidange de fosse septique, travaux d'assainissement) est aussi effectué ponctuellement sur le site. La station de Jarry Pointe-à-donne ne comporte pas d'étape de traitement tertiaire et de désinfection des effluents en fin de processus. L'eau épurée est rejetée en mer dans la baie du Petit-Cul-de-Sac marin (16.219913 N, 61.561047 W), à environ 1 km du rivage et sans atteinte de la zone humide de Jarry, situé au Nord **(370,372)**. Cette baie reste cependant une « zone sensible » à risque d'eutrophisation ce qui implique un traitement supplémentaire (azote/phosphore) **(322,324,372)**. Par ailleurs, des mesures spécifiques et un suivi en mer sont régulièrement effectués en plus des contrôles journaliers pour ajuster les paramètres de traitement. À noter que les indicateurs mesurés pour le suivi réglementaire par la DEAL sont effectués par un sous-traitant situé dans l'hexagone (délai important pour l'obtention des résultats). Les sous-produits d'épuration : refus de dégrillage, sables et autres particules décantées, ainsi que les corps gras sont récupérés et principalement placés en décharge dans la commune de Ste-Rose. Les boues sont quant à elles prétraitées sur place après une étape d'épaississement et de coagulation puis un passage dans un filtre à bande. Ce système permet une déshydratation mécanique des boues par pressage. Elles sont ensuite revalorisées en co-compostage (Sita Verde) **(259,372)**. Des conteneurs spécifiques et ouverts sont présents sur le site pour collecter les déchets d'épuration.

Le site de traitement entièrement protégé par un grillage est entouré d'arbres et de bosquets sur ses 2/3 environ (**Figure 41** – photo satellite). En ce qui concerne la faune et la flore, le site étant installé au Sud d'une zone industrielle, la végétation reste limitée dans ces alentours. En effet, la zone de mangrove et de forêt marécageuse de Jarry est située au Nord du secteur d'activités. Près de la STEP, au plus près de la côte on observe cependant la présence de champs, de cultures maraichères et d'arbres. Le site très propre et bien entretenu présente un certain intérêt pour la faune sauvage puisque très végétalisé. Il y a en effet des arbres fruitiers (jubuier, manguier, cocotier, papayer, corossolier) et quelques bananiers aux abords, en plus de l'eau en abondance. Des cucurbitacées sont aussi plantées à différents points du site selon la saison et consommées par les employés. Seul le parcours autour des bassins est aménagé, le reste étant de l'herbe régulièrement entretenue. De façon globale, « la plupart des espèces retrouvées sur Jarry […] sont des espèces communes » de l'archipel **(370).** On retrouve sur le site de la STEP des espèces envahissantes souvent observées dans un contexte urbain (rat, souris). Les caches sont nombreuses près des bâtiments, du réseau de tuyauterie et du matériel stocké. Des amphibiens sont aussi présents en nombre (crapaud, grenouille) notamment sous les bassins de dégrillage qui apportent humidité, ombre et flaques d'eau. Des iguanes, plus discrets sur le site ont aussi été observés nageant dans les bassins en fin de process (clarificateur), avec les têtards et les crapauds. Des crabes de vase dans les coins où la terre est à nu ont aussi été observés. Les employés du site ont mentionné la présence ponctuelle de prédateur comme des mangoustes. Toutes ces espèces restent très communes sur l'île tout comme les *Anolis* présents sur les troncs et le grillage. De nombreuses espèces d'insectes ont aussi été observées (papillon, mouche, cafard, moustique, fourmis, mille-pattes…). Enfin des groupes d'oiseaux comme des hérons garde-bœuf, des Quiscales merles sont présents en continu près des bassins ou dans les arbres, mais la diversité pourrait être bien plus importante selon un rapport compilant des données sur l'ensemble de Jarry (n=27 espèces) **(370).** La faune que nous avons observée lors des campagnes semble bien installée sur ce grand site et profite des déchets présents, comme le suggère l'observation de merle et de rat près des bacs de refus de dégrilleur. Ce type de stockage prolongé est en effet connu pour attirer cette faune **(323,382)**.

Lors de cette étude, des animaux domestiques ont aussi été prélevés aux alentours de la station. En effet en plus de quelques champs et cultures maraichères dans le Sud et l'Ouest du site, une propriété privée est installée dans le Sud-Est, à environ 300 m des premiers bassins (**Figure 41** ; 16.232137 N, 61.562910 W). Cette dernière est entourée d'arbres et présente une végétation abondante et bien entretenue. Rappelons que selon la réglementation en vigueur, « les stations de traitement des eaux usées sont implantées à une distance minimale de 100 m des habitations et des bâtiments recevant du public » **(322).** On y retrouve en extérieur, un petit élevage informel avec des enclos séparés, des poules, des cochons et des oies. Des chiens sont aussi présents dans le jardin de la propriété. Ces animaux n'ont pas reçu de traitement antibiotique lors du projet ni dans les 6 mois le précédant. Bien entendu, des oiseaux sauvages ont aussi été observés autour des animaux domestiques (*i.e.* Quiscale merle). De plus, des vaches tenues au piquet étaient présentes dans les pâturages autour de la station. Tous ces animaux on fait l'objet de campagnes de prélèvements.

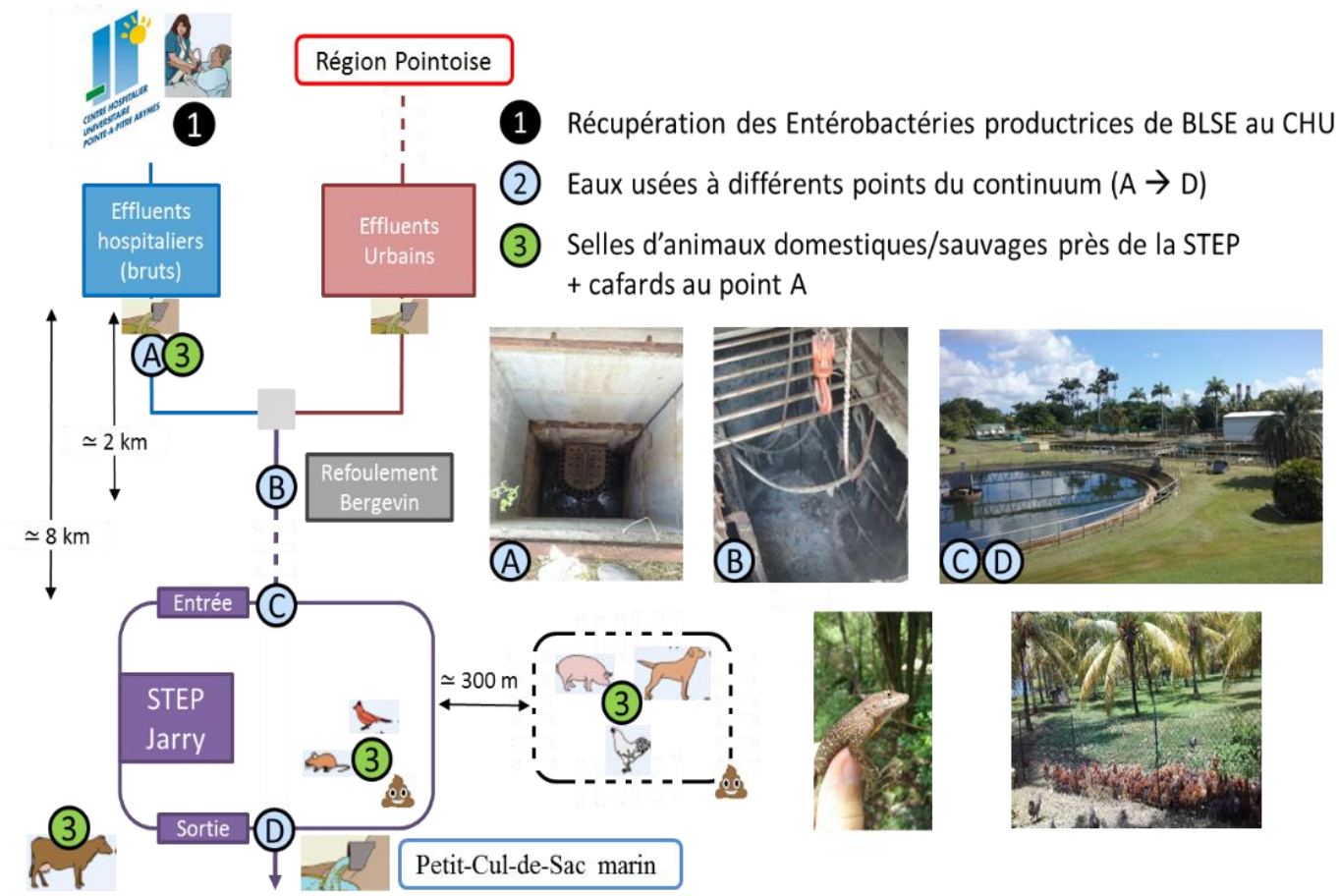


Figure 39. Représentation schématique des différents types de prélèvements effectués sur le projet ECHANGENE. Eléments d'illustration adaptés de https://doi.org/10.1128/CMR.00023-13 et photos de Pot M.

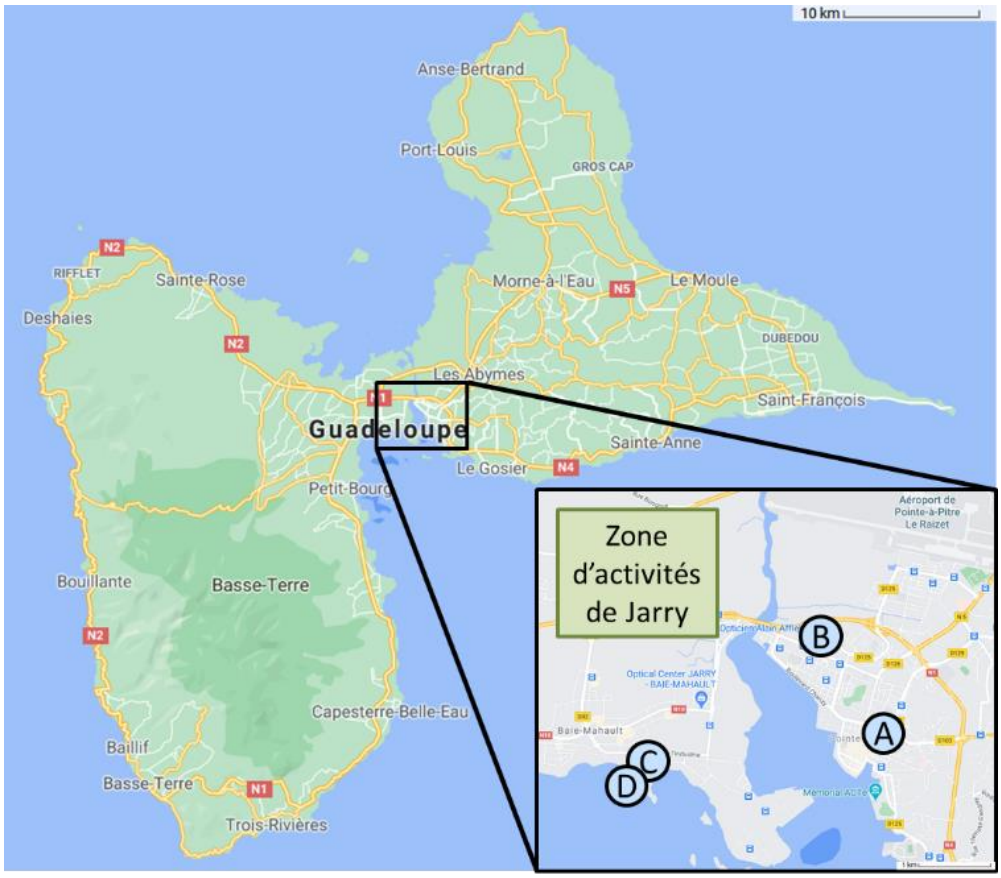


Figure 40. Disposition des différents points de prélèvements sur le continuum des eaux usées. Carte adaptée à partir de Google Maps (https://www.google.fr/maps/).

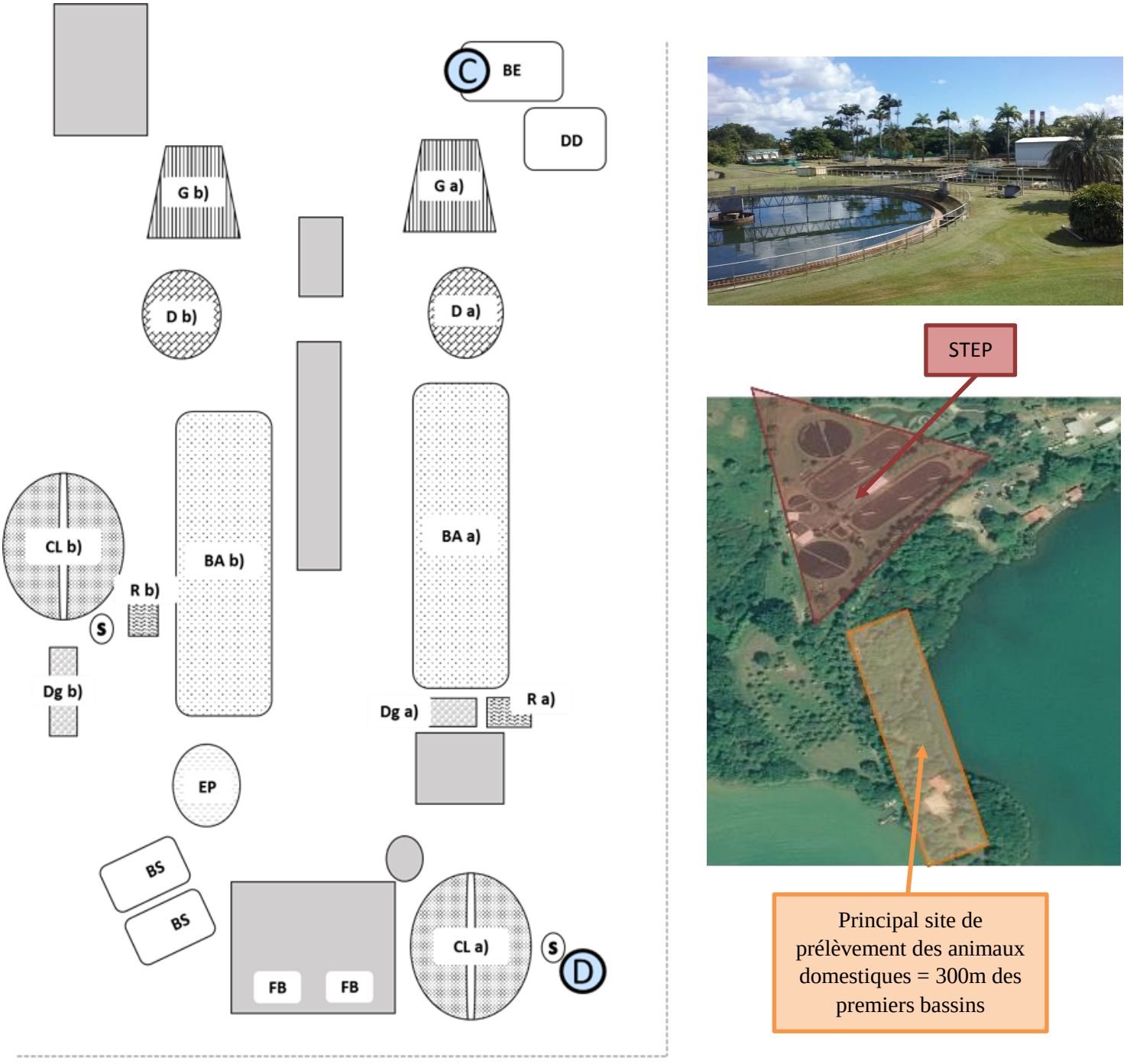


Figure 41. Disposition des différents bassins de traitement des eaux usées au sein de la station d'épuration (STEP) de Jarry Pointe-à-donne. BE : bassin d'entrée – répartiteur, DD : déchets de dégrilleur (conteneur), G : dégrilleur, D : dégraisseur, BA : bassin d'aération, Dg : dégazeur, R : pompe de recirculation des boues, CL : clarificateur, EP : épaississeur, FB : filtre à bande, S : sortie, BS : boue sèche (conteneur). La STEP est divisée en 2 lignes de traitement parrallèles a) b). Seule la ligne de traitement a) a été prise en considération dans ce projet (points C et D). Les deux sorties se rejoignent par la suite au niveau d'un points de mesure des différents paramètres de contrôle avant d'atteindre la zone de rejet en mer.

C) Prélèvement des échantillons

Le processus expérimental pour l'étude ECHANGENE a été divisé selon les différents compartiments de la démarche One-Health, avec en premier lieu le secteur hospitalier pour la partie humaine. Ensuite nous nous sommes focalisés sur le continuum des eaux usées jusqu'au traitement final. Cette partie a été considérée comme étant l'interface entre l'homme et l'environnement. Le dernier compartiment comprenait la faune présente le long des effluents et notamment au niveau de la station d'épuration.

1) Sélections des souches humaines

Les souches hospitalières ont été collectées de manière ponctuelle en collaboration avec le laboratoire de microbiologie du CHU de Pointe-à-Pitre/Les Abymes entre avril 2018 et août 2019. Les prélèvements initiaux avaient tous une visée diagnostique dans le cadre d'infections bactériennes. Nous avons conservé seulement les souches d'ECC, d'*E. coli* et de KPNC considérées comme productrices de BLSE. Dans le cadre de ce projet, seul le site de prélèvement, la date, l'identification de la souche et le phénotype de résistance pour les antibiotiques utilisés à l'hôpital nous ont été communiqués afin de préserver l'anonymat des patients. Afin de discriminer les possibles doublons épidémiologiques, nous avons pu noter le service et le numéro patient. Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique de l'hôpital (autorisation A5-19-12-05-TRAMID). Au sein du laboratoire de l'Institut un antibiogramme complémentaire a été effectué pour chacune des souches recueillies afin d'apprécier le phénotype de résistance en utilisant le panel d'antibiotiques sélectionnés en interne pour les prélèvements non-cliniques. En parallèle, de cette prospection et afin d'apprécier la représentativité de la collection ECHANGENE, les données générales concernant le nombre d'infections nosocomiales dues à une bactérie multirésistante (*Enterobacteriaceae* BLSE et SARM) ont été recueillies en collaboration avec le service de contrôle de gestion et le CLIN de l'hôpital.

2) Prélèvements des eaux usées

Les 4 points de prélèvements pour le continuum hydrique sont illustrés sur les **Figures 39 et 40**. Les échantillons d'eaux usées ont été prélevés et analysés en simultané par campagne de prélèvement afin de garantir une continuité des rejets. Dix sessions d'échantillonnages des effluents ont été réalisées. La première campagne a débuté en avril 2018. Les autres prélèvements ont été étalés jusqu'en mars 2019 à raison d'un prélèvement par mois en moyenne. Cette procédure a permis d'effectuer des prélèvements en saison sèches, de décembre à mai (n=3) et en saison pluvieuse de juin à septembre (n=7) **(330)**. Au vu du nombre limité de préleveurs automatiques présents à l'Institut et des difficultés pour placer le matériel, nous avons eu recours à des prélèvements manuels avec l'utilisation d'une perche. Le flacon stérile fixé au bout de la perche a permis de recueillir 500 mL d'eau à au moins 20 cm de profondeur dans une zone bien homogène. Ce dernier a ensuite été placé dans une glacière puis au réfrigérateur (4°C) afin de limiter toute multiplication des germes. Le traitement des échantillons par filtration a été effectué dans les 24 h. Aucun paramètre comme les indicateurs de pollution (DBO, DCO, MES), micropolluants (métaux, résidus d'antibiotiques) ou la quantification de germes n'a été suivi lors de ce projet **(324)**.

Point A : Eaux usées du CHU de Pointe-à-Pitre/Les Abymes (16.238407 N, 61.527032 W)

Un premier point de prélèvement à l'hôpital se trouve sur le dernier regard avant que les effluents ne rejoignent les eaux urbaines. À l'exception d'un dégrillage, ces eaux usées hospitalières n'ont subi aucun traitement particulier.

Point B : Eaux urbaines en amont de la STEP (16.245533 N, 61.539352 W)

Un point de prélèvement intermédiaire a été choisi au niveau du poste de refoulement des eaux usées de Bergevin. Celui-ci est situé dans la ville de Pointe-à-Pitre à environ 2 km de l'hôpital et précède le poste de refoulement de Jarry avant la STEP. À noter qu'un échantillon de ce site n'a pas pu être effectué lors des 10 campagnes.

Point C : Eaux usées en entrée de la STEP (16.235413 N, 61.562432 W)

Les prélèvements ont été effectués par l'équipe du laboratoire autorisée par l'exploitant du site. Ces échantillons ont été recueillis dans des flacons stériles de 500 mL et conditionnés de la même manière que décrit précédemment. En entrée le prélèvement a été effectué sur le bassin d'entrée regroupant tous les effluents de l'agglomération connectée.

Point D : Effluents traités en sortie de la STEP (16.234046 N, 61.563603 W)

Comme mentionné dans la présentation générale de la station, celle-ci comporte 2 lignes de traitement parallèles. Lors de ce projet, une seule ligne était totalement opérationnelle jusqu'à la fin des campagnes (ligne a ; **Figure 41**). En effet des travaux ont été entamés sur la ligne b en 2019 avec une réfection du clarificateur notamment. Le dernier prélèvement d'eau usée a donc été effectué en sortie du clarificateur (CL a) avant rejet en mer. Aucun prélèvement n'a été effectué sur des points intermédiaires du process d'épuration ou dans le milieu naturel.

3) Prélèvements des fèces d'animaux

Différents animaux ont été prélevés au sein de la STEP et dans son voisinage selon les méthodes décrites ci-dessous (autorisation 971-2016-12-20-001). Des cafards ont aussi été capturés dans les égouts de l'hôpital (Point A ; **Figure 39**). À la suite des différentes campagnes, les écouvillons, les flacons ou les pots à coprocultures ont été rapidement placés à 4°C jusqu'à l'analyse ultérieure en laboratoire. Une étape d'enrichissement a systématiquement été réalisée dans 9 mL d'eau peptonée. Les écouvillons ont directement été placés dans le tube d'eau peptonée. Pour les échantillons plus conséquents, 2 öeses de 10 µL ont été placées dans la solution. Les mélanges ont ensuite été vortexés et placés dans l'étuve à 37°C pour un enrichissement pendant 18 h. De manière générale, les animaux prélevés étaient en bonne santé. Pour les animaux domestiques, nous n'avons pas observé lors des prélèvements dans les enclos de selles liquide ou d'autres phénomènes pouvant indiquer une santé fragile. Il en va de même pour la faune sauvage même si cette observation restait plus difficile à appliquer.

Anoles (n=20)

La technique de capture consistait en premier lieu à positionner un nœud coulant autour du cou de l'animal en veillant à ce que l'individu soit « positionné la tête en haut » pour faciliter la mise en place du nœud. Le fil en nylon utilisé avait un diamètre de 0,16 mm et était fixé à l'extrémité d'une marge de feuille de palmier. Cette première manœuvre permettait de prévenir

toute fuite de l'animal qui était ensuite immobilisé à la main. Le lézard était maintenu par la peau du dos et défait de son lien. Le prélèvement de déjection a été effectué dans les temps impartis (5 minutes maximum). L'objectif était de récupérer à la sortie du cloaque et sans intrusion, à l'aide d'un écouvillon sec et stérile, un volume d'échantillon analysable correspondant à une goutte de selle. Un massage de l'abdomen a été réalisé sur les individus n'ayant pas déféqué spontanément. Par ailleurs si cette seconde manipulation ne donnait pas le résultat souhaité, les anoles étaient systématiquement libérés pour éviter tout risque de morbidité suite à une manipulation trop longue et stressante pour l'animal. À noter que la même technique a été mise en place pour l'étude plus approfondie des ECC présents chez ces lézards sur l'ensemble de l'île (**Partie I** ; Arrêté DEAL/RN n°971-2016-12-20-001) **(58)**.

Cafards (n=29)

Les cafards ont été piégés dans des bouteilles d'eau minérale propres avec un appât alimentaire. Ces bouteilles ont été placées au niveau de différents regards au sein de la STEP puis récupérés après 24 h (n=9). Un prélèvement a également été effectué au niveau de la sortie des effluents au CHUG selon la même méthode (*i.e.* Point A, n=20 ; **Figure 39**). Au laboratoire, le piège a été placé au congélateur (-20°C) pendant 15 minutes afin de tuer les cafards. Ces derniers ont ensuite été triés individuellement dans des tubes Falcon stériles de 15 mL. Un lavage a été réalisé en ajoutant 5 mL d'éthanol à 70% et en mélangeant pendant 5 min au vortex. Après élimination de l'éthanol et séchage, un rinçage dans 10 mL d'eau ultrapure (EUP) pendant 2 minutes a été effectué en mélangeant de nouveau au vortex. La dissection de l'insecte en conditions aseptiques a ensuite été réalisée afin de prélever la fin du contenu du tube digestif. La méthode a été adaptée d'un précédent protocole **(383)**.

Crapauds (n=19)

Les crapauds buffles ont été capturés à l'aide d'une épuisette. Les animaux piégés ont ensuite été placés dans des cages individuelles préalablement lavées et stérilisées à l'éthanol. La captivité dans une pièce ombragée et fraîche a duré 24 h au maximum. Passé ce délai, si une selle était émise, celle-ci était récupérée dans sa totalité à l'aide d'un tube Falcon de 50 mL, l'animal a ensuite été relâché à l'endroit de la capture. Pour éviter des doublons, les prélèvements de crapaud ont été réalisés à des points différents lors de chaque campagne.

Quiscales merles (n=11) et oies (n=2)

Au sein de la STEP, différents groupes d'oiseaux ont été observés. Ces derniers ont été suivis lors des campagnes d'échantillonnage. Lorsqu'une fiente était émise, elle était récupérée au sol à l'aide d'un écouvillon stérile. Les fientes de 2 oies ont été prélevées de la même façon dans le voisinage de la STEP.

Poules (n=11) et cochons (n=10)

Un écouvillonnage rectal ou cloacal a été effectué chez les animaux présents dans le voisinage de la STEP, à l'aide d'un écouvillon stérile après immobilisation de l'animal en veillant à ne prélever qu'une fois chaque animal.

Rats (n=8)

Pour les rats, des cages de capture ont été déposées à différents endroits du parc de la STEP. Après capture les rats ont été euthanasiés, puis un échantillon de fèces a été récupéré après dissection du colon en conditions aseptiques.

Vaches (n=3) et chiens (n=6)

Des excréments frais de chiens (race Fila brasileiro) et de bovins ont été prélevés au sol à l'aide de pots à coproculture stériles. Les bovins étaient au piquet et présents près du grillage de la STEP tandis que les chiens étaient en semi-liberté au sein du jardin de la propriété voisine.

D) Culture et isolement sélectif des souches d'intérêt

1) Culture Initiale

Echantillons d'eau

Les échantillons ont été traités selon la méthode de dilution-filtration. Après avoir réalisé une série de dilutions dans une solution de NaCl stérile à 0,85%, les échantillons ont été filtrés sur un système de rampe (100 mL) en utilisant des membranes stériles de nitrocellulose avec une porosité de 0,45 µm (Merck Millipore, Billerica, USA). La dilution appliquée (jusqu'à 10^{-6} selon la turbidité) a permis de limiter la teneur en bactérie et d'éviter la surcharge de la membrane, étant donné les fortes concentrations possibles selon les points de prélèvement.

Pour la recherche des souches d'intérêt, la membrane a ensuite été déposée à la surface d'un milieu sélectif et chromogène : Chromogenic Coliform Agar (CCA) (Chromagar, Paris, France) sans antibiotique d'une part pour apprécier l'ensemble des bactéries coliformes (gélose de contrôle), et supplémenté en antibiotique afin d'isoler de façon adéquate les entérobactéries C3G-R sans qu'elles soient « noyées » dans la masse. L'antibiotique utilisé pour cette recherche était le ceftriaxone (CRO4 ; 4 mg/L). Cette concentration a été choisie en corrélation avec les précédentes observations lors des projets initiés à l'Institut **(343)**. Les milieux ont ensuite été incubés en condition aérobie pendant 24 h à 48 h à 37°C. Ce milieu de culture a été développé pour la numération des coliformes et d'*E. coli* dans des échantillons d'eau à faible concentration bactérienne selon la norme ISO 9308-1. Dans notre cas, compte tenu de la charge importante de bactéries cultivables au sein des eaux usées l'avantage d'un tel milieu était de rapidement discriminer les coliformes (bleu – rose).

Echantillons de fèces

Pour les fèces les bouillons d'enrichissement ont été préalablement vortexés puis 10 µl ont été étalés en stries sur un milieu CCA simple d'une part et un milieu CCA+CRO4 d'autre part.

2) Isolement des bactéries d'intérêt

Après incubation des milieux CCA et CCA+CRO4 à 37°C 24 h à 48 h, une sélection de colonies C3G-R présentant les colorations précédemment citées sur CCA a été repiquée sur le même milieu (CCA) ou sur une sur gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Jusqu'à 5 Unités Formant Colonie (UFC) selon les aspects

caractéristiques ont été sélectionnées à partir du milieu supplémenté en ceftriaxone. Le milieu BCP est non sélectif et généralement utilisé sur des échantillons alimentaires. Ce dernier permet de faciliter l'isolement des entérobactéries de par leur aspect caractéristique et d'en assurer la pureté. Les colonies d'intérêt sur gélose BCP présentent l'aspect suivant : rondes à contours irréguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, légèrement mucoïdes et généralement jaunes ou à défaut pourpres (la dégradation du lactose pouvant être +/- rapide selon les souches). Ce second milieu utilisé selon les prélèvements et l'aspect des colonies sur CCA, avait pour principal objectif de mieux différentier les colonies roses du milieu sélectif. En effet les souches de KPNC sont généralement plus muqueuses sur BCP que les souches d'ECC ou d'autres genres non recherchés (*Citrobacter* spp.).

La recherche d'oxydase en utilisant une solution de phénylènediamine (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) a pu être réalisée avant repiquage. Seules les colonies ne produisant pas le cytochrome oxydase présentent un intérêt dans cette étude car c'est un des caractères des entérobactéries. De plus des observations au microscope après la coloration de Gram ont aussi aidés à la sélection des colonies (*i.e.* Bacilles Gram –).

3) Identification des bactéries

Par spectrométrie de masse

Pour terminer une identification des souches a été effectuée par une analyse des molécules totales avec un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (AXIMA Performance) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Cet acronyme correspond à Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight. Le protocole suivi pour le dépôt des échantillons est celui du « Direct Smear plus Formic Acid (On-Target) » fourni par Shimadzu. Une colonie pure repiquée 24 h auparavant a été déposée et étalée sur un spot de la plaque de lecture. Puis 0,5 µL d'une solution d'acide formique à 25% ont été ajoutés sur le spot. Cette étape permet de faciliter la lyse des bactéries. Ensuite, 2 µL de matrice reconstituée de α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (α-CHCA ; LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France) à 50mg/mL ont été ajoutés et mélangés de façon homogène. La plaque support a enfin été introduite dans l'appareil après séchage et co-cristallisation du mélange matrice/échantillon (jaunissement). Un spot contenant la souche de référence *E. coli* DH5α a aussi été préparé pour la calibration de l'appareil et comme témoin positif. Le témoin négatif correspond à la matrice supplémentée de la solution d'acide formique.

L'identification par cet automate fonctionne selon le principe suivant : chaque échantillon placé sur la plaque de dépôt est irradié par un faisceau laser pulsé au sein de la chambre d'ionisation. Ceci a pour effet de désorber le mélange matrice/analytes et d'ioniser les molécules en présence. Cette ionisation de particules initialement non volatiles résulte de l'absorption des photons du laser UV par la matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI). La matrice présente en effet une forte réactivité aux longueurs d'ondes émises par la lumière du laser. L'énergie apportée engendre une transmission de protons de la matrice aux molécules de l'échantillon. Ces molécules se détachent et passent à l'état gazeux (vaporisation). Les ions chargés positivement et volatils sont ensuite soumis à un champ électrique émis par une grille d'électrode. Ce champ électrique va accélérer leur déplacement jusqu'à l'analyseur. Ce dernier correspond à un tube de vol sous vide. La vitesse

de migration des ions dans le tube de vol est proportionnelle à leur masse moléculaire, les ions ayant généralement la même charge (z=1). Ils sont donc séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le temps de vol (Time of Flight, TOF) d'un ion est inversement proportionnel à sa masse. Ce sont donc les ions les plus légers qui vont dériver plus rapidement jusqu'au détecteur. En atteignant ce dernier en fin de migration, un signal électrique est émis et amplifié. L'intensité du signal donne une indication sur le nombre d'ions captés à un temps donné. Le signal est transmis sous forme de pic moléculaire. Après l'acquisition de l'ensemble des pics ceci sont traités et triés puis converties en spectre de masses. Ce spectre présente en ordonnée le rapport m/z exprimé en Daltons (Da) et en abscisse l'intensité relative du signal en %. L'empreinte spectrale de l'échantillon est ensuite soumise à une base de données de spectres du serveur SARAMIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). L'acronyme correspond à Spectral Archive And Microbial Identification System. Une comparaison est initiée avec les spectres de référence de la base afin d'identifier la bactérie en présence en associant un indice de fiabilité. Les résultats sont apportés avec une identification la plus précise possible au niveau de la taxonomie. L'identification peut indiquer la famille, le genre, et l'espèce selon les cas. Les résultats restent cependant influencés par les conditions expérimentales, l'échantillon analysé et la banque de données interrogée **(384)**. Pour l'appareil utilisé dans le laboratoire, une identification est considérée comme acceptable à partir d'un pourcentage de fiabilité de 75% selon le constructeur.

Par approche biochimique

Lors de ce projet des difficultés concernant le bon fonctionnement du spectromètre de masse ont été rencontrées. Afin de pouvoir sélectionner les germes d'intérêt dans les temps impartis nous avons aussi eu recours à l'identification plus classique par galerie Api20E (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). La galerie utilisée comprend 20 tests biochimiques sous forme déshydratée. Après préparation des galeries et incubation 24 h à 37°C. Les réactions étaient interprétées selon les instructions du fabricant et les possibles chan*g*ements de couleur dans les puits. Afin d'identifier le germe en présence, les résultats positifs et négatifs des galeries ont été confrontés avec la base de données ApiWeb (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

E) Caractérisation du phénotype de résistance par antibiogramme

En se fondant sur la méthode de Kirby-Bauer de diffusion sur gélose, les profils de résistance et de sensibilité des espèces identifiées ont été déterminés en utilisant un panel de 13 antibiotiques appartenant à différentes classes. Les composés antibactériens suivants ont été utilisés (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) : ampicilline (AMP, concentration en antibiotique : 10 µg), amoxicilline-acide clavulanique (AMC, 20 – 10 µg), céfoxitine (FOX, 30 µg), céfotaxime (COX, 5 µg), ceftazidime (CAZ, 10 µg), céfépime (FEP, 30 µg), ertapénème (ETP, 10 µg), acide nalidixique (NAL, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), gentamicine (GMN, 10 µg), amikacine (AKN, 30 µg), tigécycline (TGC, 15 µg), triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT, 1,25 – 23,75 µg). Le protocole de préparation des cultures suivait les recommandations CA-SFM/EUCAST 2018 (http://www.sfm-microbiologie.org).

Un inoculum à 0,5 McFarland confirmé au densitomètre a été préparé extemporanément à partir d'une culture pure de moins de 24 h sur milieu TSA, dans 9 mL de NaCl stérile à 0,85%. Les géloses Müeller-Hinton (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) ont été ensemencées par écouvillonnage de la surface avec un écouvillon en coton stérile. Ensuite, les disques d'antibiotiques ont été déposés à l'aide d'un distributeur et les boites mises à incuber en aérobiose à 35 ±2ºC pendant 20 ±4 h. L'ensemble de ces manipulations a été réalisé dans des conditions aseptiques, sous hotte à flux laminaire. Pour la lecture et l'interprétation des tests de diffusion, le système automatisé ADAGIO (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) a été utilisé. L'interprétation des diamètres de zone d'inhibition était fondée sur le référentiel de concentrations critiques proposé par le CA-SFM/EUCAST 2018 et directement intégré dans le module de lecture.

F) Biologie moléculaire, approche globale

Au vu du nombre important de souches isolées toutes espèces confondues dans le continuum des eaux usées, nous avons fait le choix de limiter l'analyse moléculaire détaillé ci-après sur un panel homogène d'isolats provenant des 3 compartiments. Ces derniers ont notamment été sélectionnés en fonction des principaux phénotypes de résistance observés, aussi noté ARP (*i.e.* antibiotic-resistance profils) **(385)**. Cette réflexion partant de l'hypothèse qu'un même profil de résistance sur gélose pouvait souligner la présence de plasmides ou de gènes de résistance similaires entre les souches.

1) Extraction de l'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN total a été effectuée avec le kit Qiagen QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant le protocole fourni. Chaque souche utilisée provient de culture pure de moins de 24 h sur gélose CCA+CRO4. Ce kit est fondé sur une lyse des cellules par la protéinase K. Une grosse colonie de bactéries est tout d'abord mise en suspension dans un tube eppendorf avec la protéinase K et un tampon (ATL). Après l'étape de lyse cellulaire à 56°C, un tampon (AL) et de l'éthanol sont ajoutés successivement afin de précipiter et dégrader les contaminants cellulaire puis précipiter l'ADN. La solution est placée dans une colonne avec membrane de silice, sur laquelle l'ADN va se lier. Les contaminants sont éliminés par une succession de centrifugations et de lavages avec différents tampons (W1 et W2). Enfin, les ADN fixés sur la membrane de silice sont élués en utilisant le tampon d'élution (BE).

2) Évaluation de la concentration et de la pureté des ADN extraits

Afin de s'assurer de la qualité des extractions une mesure de la concentration d'ADN et de sa pureté ont été effectuées. Un spectrophotomètre Genova Plus a été utilisé (Bibby Scientific Ltd, Stone, Royaume-Uni) aux longueurs d'onde à 260, 280 et 230 nm. L'ADN est mesuré à 260 nm sur un volume d'échantillon de 2 µL. Le rapport d'absorption A260/A280 permet d'apprécier la contamination par les protéines, la valeur obtenue doit être supérieure ou égale à 1,8 pour une bonne pureté. Le second rapport (A260/A230) permet d'évaluer la présence d'autres contaminants comme les composés aromatiques, les glucides, les peptides et les phénols et doit être compris entre 1,8 et 2,2.

L'ADN a été quantifié spécifiquement avec le fluorimètre Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) et le kit associé dsDNA BR Assay (0.1 – 1,000 ng/µL) selon

les instructions du fabricant et une calibration de l'appareil. Le système est fondé sur une réaction fluorimétrique entre un fluorophore spécifique et l'ADN qui en s'intercalant va émettre un signal qui sera d'autant plus intense que la concentration d'ADN est haute.

Pour apprécier une éventuelle dégradation des ADN, un contrôle par électrophorèse a été effectué. Un gel d'agarose à 0,5 % avec du Gel Red (Interchim, Montluçon, France) à 0,5 µg/mL a été préparé extemporanément. Huit microlitres d'échantillon extrait ont été additionnés de 2 µL de bleu de bromophénol 5X (BBP) puis placés dans les puits du gel. Le BBP permet de suivre l'évolution de l'électrophorèse, ce marqueur chargé négativement migre en même temps que l'ADN. La migration a été effectuée à 90 V pendant 1 h en présence d'un tampon 1X de Tris borate EDTA (TBE). Le gel a été visualisé sous UV à l'aide d'un Gelscan. La fluorescence émise par le Gel Red sous UV permet d'apprécier les ADN puisque ce dernier s'intercale parmi les acides nucléiques.

G) Séquençage complet des souches d'intérêt

Les échantillons d'ADN ont ensuite été traités avec le système NextSeq 500 de la Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), de l'Institut Pasteur de Paris. Ce système de seconde génération est fondé sur un séquençage Illumina **(292)**. Après une fragmentation de l'ADN, les bibliothèques (ligation des adaptateurs sur les fragments de génome ≤ 300 bp) ont été préparées avec un kit Illumina Nextera XT. Chacun de ces fragments est ensuite fixé au flow-cell de lecture puis amplifié par grappe avec synthèse des brins complémentaires. Le séquençage illumina correspond à la détection d'un marqueur fluorescent spécifique à chaque nucléotide lorsqu'ils sont incorporés. La séquence est donc interprétée en temps réel selon l'image à un instant T et l'intensité du signale. Un contrôle qualité du séquençage est ensuite posé après superposition des lectures, les données de mauvaises qualité sont supprimées avant analyses bio-informatiques en interne **(386)**.

Une première analyse de ces séquences a donc été effectuée (assemblage *de novo*, annotation, phylogénie…). Cette analyse nous a permis d'identifier notamment des profils de gènes de résistance proches associés à une présence de réplicon plasmidique. Ces observations pouvant indiquer la présence de plasmides proches sans pour autant permettre la reconstruction du ou des plasmides en présence **(296)**. Après sélection des souches à analyser plus finement, le séquençage MinION a été effectué au laboratoire. Cette technique de séquençage de 3ème génération ne présente pas d'étape de fragmentation du génome. Ceci permet de produire des séquences bien plus longues. La technologie utilisée est associée à des nanopores (protéines cellulaires transmembranaires) présents à la surface de la flow-cell. Les brins d'ADN passant à travers ces pores engendrent une modification du courant électrique auquel est soumis la flow-cell. L'amplitude de cette modification étant spécifique à chaque nucléotide elle est donc traduite dans un second temps en données de séquence.

H) Vision globale de l'analyse des ADN

Le pipeline ci-dessous résume la méthode mise en place pour les données Illumina afin d'harmoniser les approches selon les articles en liens avec ce travail de thèse et les 3 espèces analysées.

- Assemblage *de novo* : SPAdes **(295)**
- Analyse qualité des assemblages : QUAST / BUSCO **(387,388)**
- Annotation : Prokka (https://github.com/tseemann/prokka)
- CoreSNP alignement : Snippy (https://github.com/tseemann/snippy)
  ou analyse du pangénome : Roary **(389)**
- Suppression des recombinaisons : ClonalFrameML **(390)**
- Construction de l'arbre phylogénétique (Maximum likelihood) : RAxML **(391)**
- Observation de l'arbre : iTOL **(392)**

Bases de données utilisées et recherches spécifiques

- Typage MLST : PubMLST/BIGSdb **(393)**
  + Logiciel mlst (https://github.com/tseemann/mlst)
- Recherche de gènes de résistance : ResFinder **(293)**
- Indentification des plasmides (groupe d'incompatibilité) : PlasmidFinder **(268)**
- Recherche des gènes de virulence : VFDB **(394)**
  + Logiciel Abricate (https://github.com/tseemann/abricate)
  (Identité nucléotidique ≥ 75% couverture ≥ 95%)

- Typage plasmidique : pMLST **(268)**

Approche spécifique hybride Illumina/MinION

La sortie du séquençage par nanopore a été couplée aux données illumina correspondant afin de minimiser les erreurs de séquençage associées à cette nouvelle technologie (**Figure 42**) **(301)**.

- « Basecalling » : Guppy (https://github.com/nanoporetech/pyguppyclient)
- Débarcodage : EPI2ME (https://github.com/nanoporetech/epi2me-api)
- Assemblage hybride : Unicycler **(294)**
- Annotation initiale des plasmides : RAST **(395)**

Autres outils utilisés

- Kleborate **(94)**
- EzClermont **(396)**
- BactDating **(397)**
- Bowtie **(398)**
- mlplasmids / MOB-recon / RFPlasmid / PlasFlow (prédiction) **(261,297–299)**
- BioEdit **(399)**
- Mauve **(400)**
- PLSDB **(273)**
- ApE (https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/)
- Mash **(401)**
- EasyFig **(402)**

Sites web et services

- Serveurs Galaxy : Pasteur Guadeloupe – KaruBioNet : http://sasc3i.univ-ag.fr:8080/
  Pasteur Paris : https://galaxy.pasteur.fr/
  Europe : https://usegalaxy.eu/
- Center for Genomic Epidemiology : http://www.genomicepidemiology.org/
- EnteroBase : https://enterobase.warwick.ac.uk/
- National Center for Biotechnology Information (NCBI): https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

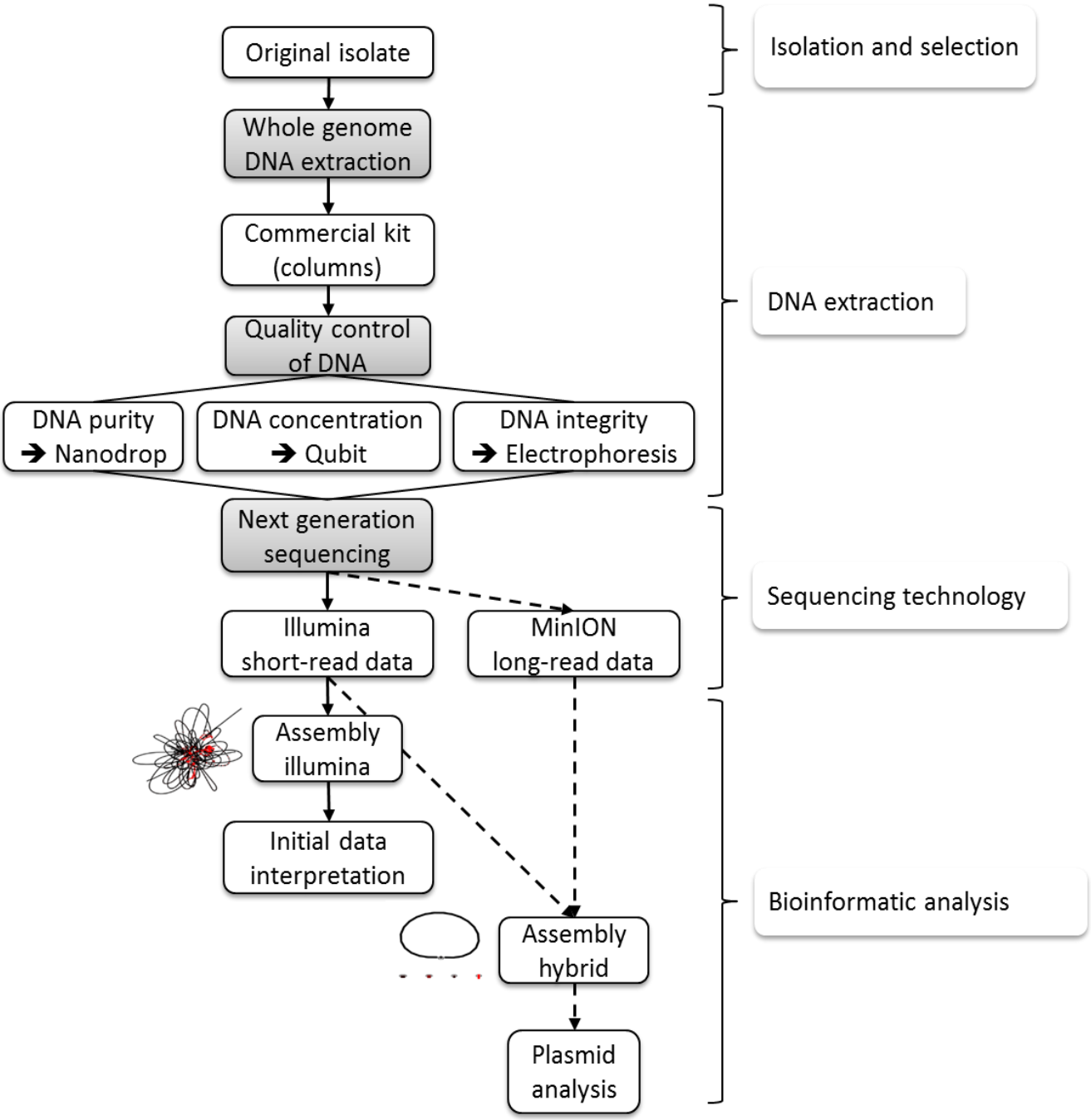


Figure 42. Vue d'ensemble du processus d'analyse de l'ADN. Schéma adapté de Berbers B. *et al*., les flèches en pointillé et en gras représentent les paramètres de reconstruction des plasmides utilisés dans un second temps sur une sélection de souches **(301)**.

I) Localisation prédictive des contigs portant les gènes codant pour une BLSE.

Comme évoqué en introduction, les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être présents sur le chromosome de façon stable ou sur des éléments génétiques mobiles extra-chromosomiques comme les plasmides. Ces derniers sont pour la plupart transférables au sein d'une population bactérienne. De fait, il est crucial de connaître la localisation de ces gènes afin d'évaluer le risque de diffusion. Pour se faire, nous avons utilisé une approche prédictive afin de connaître la localisation possible des gènes codant pour la résistance aux C3G **(300)**. L'approche utilisée a été calquée sur celle adoptée et recommandée par Worsley-Tonks K. E. L. *et al.* Celle-ci s'appuie sur les assemblages en utilisant les logiciels mlplasmids et MOB-suite (seuils : 70,0% pour mlplasmids, par défaut pour MOB-recon) **(261,297,313)**. Nous avons utilisé 2 autres outils de prédiction à savoir PlasFlow et RFPlasmids avec un seuil de 70,0% de probabilité. Chacun de ces outils est associé à des caractéristiques de séquences et des bases de données différentes pour apprécier la nature du contig (**Tableau 3**). Le but de cette mutualisation de résultats était de limiter au maximum les faux-positifs ou faux-négatifs inhérents à ces approches. La prédiction complète avec les 4 logiciels a été effectuée sur l'ensemble des séquences d'*E. coli* et de KPNC. En effet il n'existe pas actuellement de base de données spécifiques pour ECC sur mlplasmids **(297,298)**. Pour une séquence spécifique, les données prédisant la même localisation (*i.e.* plasmidique ou chromosomique) au-dessus du seuil spécifié pour au moins 3 logiciels ont été conservées dans l'analyse. Les autres, lorsque le seuil de prédiction n'était pas atteint, ou que les résultats n'étaient pas concordants, ont été considérés comme « non-définis »

J) Conservation des échantillons

Chaque échantillon brut a été divisé afin de conserver une partie au congélateur à -20°C pour de potentielles analyses ultérieures. Les souches d'intérêts ont été conservées dans une solution d'eau peptonée stérile et de glycérol à 25%, et stockés à -80°C. Les ADN extraits ont aussi été placés à -20°C.

RESULATS

INSTITUT PASTEUR

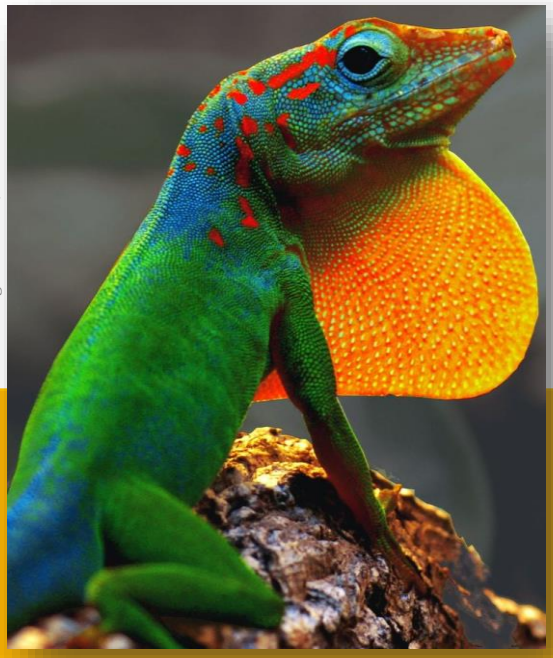
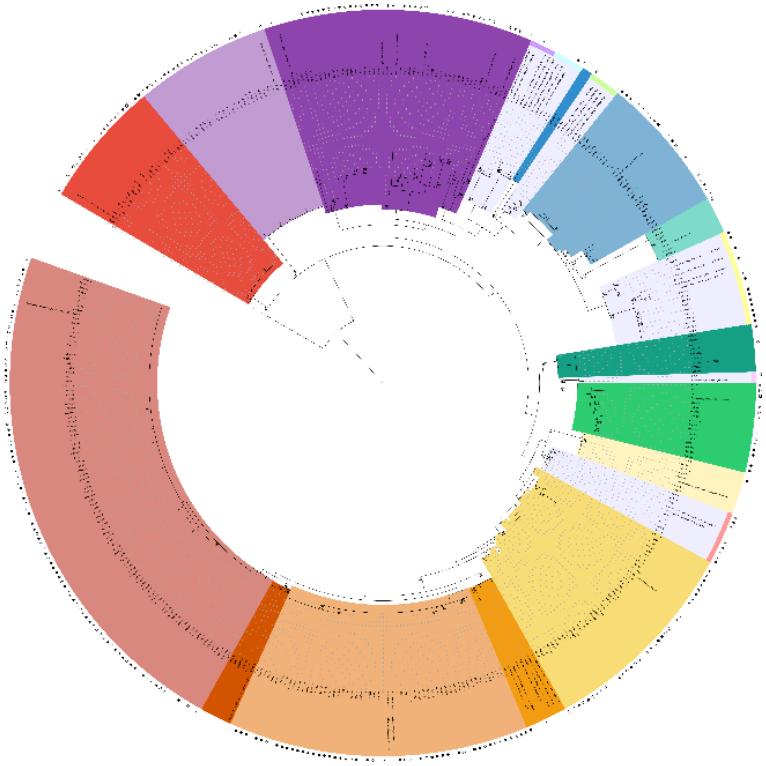


Photo: Gregor Weidlich, karibische-anolis.de

PARTIE I

<u>Projet *Enterobacter* :</u> Appréciation de la distribution et de la diversité d'*E. cloacae* complex résistant ou non aux antibiotiques dans les 3 compartiments de l'approche One-Health, dans un contexte « naturel » et de pression de sélection limitée.



Article n°1 accepté dans le journal *Frontiers in Microbiology* le 25 juin 2021.

DOI : https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628058

Contexte

En Guadeloupe, peu d'études ont été menées ces dernières années dans la recherche de bactéries résistantes aux antibiotiques au sein de l'environnement et de la faune associée. En effet, à ce jour on compte principalement une thèse effectuée à l'Institut Pasteur qui a répertorié pour la première fois la présence de germes multirésistants et d'intérêt clinique dans ces compartiments **(343)**. Ces résultats ont fait l'objet d'un premier article centré sur les souches d'*E. coli* productrices de BLSE chez les animaux **(43)**. Ce premier projet avait par ailleurs souligné une prévalence importante d'*Enterobacteriaceae* C3G-R chez les *Anolis marmoratus*, espèce de lézard endémique de l'archipel (89/234 ; 38,0%). Ces souches résistantes étaient principalement des *Enterobacter* et présentaient toutes une céphalosporinase hyperproduite (57/115 ; 49,5%) **(343)**. Contrairement aux deux autres genres étudiés dans ce manuscrit, les *Enterobacter* produisent naturellement une céphalosporinase qui confère une résistance aux C1G, aux C2G, ainsi qu'aux aminopénicillines et à l'association amoxicilline / acide clavulanique. Par ailleurs, des mutations aux niveau de la région qui régule cette enzyme peuvent apparaître sous certaines conditions et engendrer une résistance aux C3G par une hyperproduction enzymatique **(143,144)**.

L'un des objectifs de cette première étude qui compose la **Partie I** du manuscrit, était de mieux caractériser les souches d'*Enterobacter* au sein de la population d'*A. marmoratus* sur l'ensemble de l'archipel. Elle avait aussi pour but d'évaluer de façon plus globale si ces souches isolées dans les compartiments environnementaux et animaux pouvaient constituer un réservoir de résistance aux antibiotiques pour l'homme, et s'il y avait une circulation de différentes lignées entre ces compartiments. Enfin cette partie devait nous permettre de dresser un nouvel élément de comparaison pour le projet ECHANGENE, puisque la faune sauvage analysée dans la **Partie II**) évoluait dans un environnement différent sous forte pression anthropique **(43)**.

Démarche expérimentale

La recherche d'*Enterobacter* ayant débuté antérieurement au projet ECHANGENE, la démarche qui a été mise en place était légèrement différente de celle décrite dans la section **Matériels et Méthode**. Dans cette première partie expérimentale, nous nous sommes concentrés sur la population d'*A. marmoratus* pour la faune sauvage, car elle présentait la plus importante part de souches d'ECC C3G-R parmi tous les animaux analysés précédemment **(343)**. Au total 168 reptiles ont été prélevés sur 17 sites. Ces prélèvements ont été initiés lors de mon stage de Master II en 2017 **(58)**. Les sites de prélèvements présentaient un degré d'anthropisation variable, et 5 sous-espèces recensées sur la Grande-Terre et la Basse-Terre ont été échantillonnées à l'exception d'*A. m. marmoratus* **(43,367)**. Seule la population mâle a été analysée car bien plus facile à observer et à capturer **(58,403)**. En vue d'une comparaison avec les animaux d'élevage, des fèces de bovins (n=28) et de porcs (n=34) de différentes fermes ont aussi été prélevés à l'abattoir du Moule **(404)**. Enfin des campagnes de prélèvements parallèles ont aussi permis de récupérer des échantillons de fruits et de légumes locaux dans plusieurs marchés (n=76), ainsi que de l'eau de captage avant potabilisation pour la même recherche microbiologique (n=40) **(405)**. Les échantillonnages ont été réalisés entre janvier 2017 et décembre 2018. Afin de simplifier la technique pour l'ensemble du projet, l'isolement des *Enterobacter* des fèces, fruits, légumes et eaux a été réalisé sur milieu chromogénique CCA

supplémentée ou non en antibiotique (ceftriaxone à 4 mg/L) ainsi que sur BCP. Dans un souci de caractérisation plus approfondie de la population bactérienne, un typage par la méthode *hsp60* a été réalisé à la suite de l'identification par spectrométrie de masse ou galerie API20E. En effet, comme mentionné en introduction, l'identification par une approche « classique » des membres de ce complexe ne permet pas de caractériser les espèces et sous-espèces avec certitude. Cette étape supplémentaire nous a semblé primordiale ici étant donné le peu d'études décrivant la distribution des clusters *hsp60* dans des échantillons non-cliniques **(59,406)**. Le protocole décrit par Hoffman H. et Roggenkamp A. a été adopté avec un important panel de séquences de référence **(59)**. La résistance des souches a été appréciée contre une sélection d'antibiotiques homogénéisée entre les différents projets initiaux *via* la méthode par diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Des souches d'*Enterobacter* provenant du laboratoire d'analyses microbiologiques du CHUG (n=107), et isolées en parallèle, ont été ajoutées à ce projet pour représenter le compartiment humain. Une sélection de 128 souches avec différents antibiotypes et identifiées comme appartenant aux clusters majoritaires (C-VI et C-VIII) a ensuite été séquencée pour une analyse phylogénétique entre isolats cliniques et non-cliniques.

Résultats majeurs

Ce premier travail effectué en amont du projet ECHANGENE a permis d'apprécier la grande diversité et le caractère ubiquiste d'ECC en dehors du continuum des eaux usées **(2)**. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une première publication dans le journal *Frontiers in Microbiology* : **Wide distribution and specific resistance pattern to third-generation cephalosporins of *Enterobacter cloacae* complex members in humans and in the environment in Guadeloupe (French West Indies)**, présentée ci-après.

- ✓ Le genre *Enterobacter* a été isolé dans 44,5% des échantillons non-cliniques (154/346), et 16,2% présentaient des souches C3G-R (n=56). Cette étude a permis de confirmer les observations précédentes concernant la forte prévalence de souches résistantes chez les *Anolis* (35/168 ; 20,8%) **(343)**. Par ailleurs, la présence de résistances chez ces lézards n'était pas significativement plus importante dans des milieux urbanisés.

- ✓ La distribution des clusters *hsp60* était variable selon l'origine du prélèvement. Nous avons évoqué la possibilité d'une mise à jour de cette technique de typage afin d'être plus exhaustif. C'est notamment le cas pour un nouveau cluster spécifique de l'espèce *E. oligotrophicus* **(407)**.

- ✓ Le metacluster *E. hormaechei* restait prédominant dans ce set de données (139/313 ; 44,4%). L'étude phylogénétique associée a souligné une séparation des isolats entre souches cliniques et non-cliniques (clusters VI et VIII) comme évoqué pour d'autres genres (**Figure 33**) **(31,91)**.

- ✓ Cette compartimentation entre isolats se retrouvait aussi pour les gènes de résistance aux antibiotiques puisque la production de BLSE n'a été observée qu'au sein des prélèvements cliniques. Par ailleurs, les mutations à l'origine de l'hyperproduction de la céphalosporinase étaient semblables entre les souches des différents compartiments.

- ✓ La prévalence de souches mutantes hors contexte clinique nous amène à questionner la raison d'une telle mutation dans des environnements sans réelle pression de sélection identifiable jusqu'à présent. Des facteurs environnementaux ou intrinsèques au microbiote de ces lézards pourraient jouer un rôle dans cette sélection et restent à identifier.

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 25 June 2021
doi: 10.3389/fmicb.2021.628058

Wide Distribution and Specific Resistance Pattern to Third-Generation Cephalosporins of *Enterobacter cloacae* Complex Members in Humans and in the Environment in Guadeloupe (French West Indies)

Matthieu Pot[1], Yann Reynaud[1], David Couvin[1], Célia Ducat[1], Séverine Ferdinand[1], François Gravey[2], Gaëlle Gruel[1], François Guérin[2,3], Edith Malpote[4], Sébastien Breurec[1,5,6], Antoine Talarmin[1] and Stéphanie Guyomard-Rabenirina[1]*

[1] Transmission, Reservoir and Diversity of Pathogens Unit, Pasteur Institute of Guadeloupe, Les Abymes, France, [2] GRAM 2.0, Normandie University, UNICAEN, UNIROUEN, Caen, France, [3] Department of Clinical Microbiology, Caen University Hospital, Caen, France, [4] Laboratory of Clinical Microbiology, University Hospital of Guadeloupe, Pointe-à-Pitre/Les Abymes, France, [5] Faculty of Medicine Hyacinthe Bastaraud, University of the Antilles, Pointe-à-Pitre, France, [6] Centre for Clinical Investigation 1424, INSERM, Pointe-à-Pitre/Les Abymes, France

Species belonging to *Enterobacter cloacae* complex have been isolated in numerous environments and samples of various origins. They are also involved in opportunistic infections in plants, animals, and humans. Previous prospection in Guadeloupe (French West Indies) indicated a high frequency of *E. cloacae* complex strains resistant to third-generation cephalosporins (3GCs) in a local lizard population (*Anolis marmoratus*), but knowledge of the distribution and resistance of these strains in humans and the environment is limited. The aim of this study was to compare the distribution and antibiotic susceptibility pattern of *E. cloacae* complex members from different sources in a "one health" approach and to find possible explanations for the high level of resistance in non-human samples. *E. cloacae* complex strains were collected between January 2017 and the end of 2018 from anoles, farm animals, local fresh produce, water, and clinical human samples. Isolates were characterized by the heat-shock protein 60 gene-fragment typing method, and whole-genome sequencing was conducted on the most frequent clusters (i.e., C-VI and C-VIII). The prevalence of resistance to 3GCs was relatively high (56/346, 16.2%) in non-human samples. The associated resistance mechanism was related to an AmpC overproduction; however, in human samples, most of the resistant strains (40/62) produced an extended-spectrum beta-lactamase. No relation was found between resistance in isolates from wild anoles (35/168) and human activities. Specific core-genome phylogenetic analysis highlighted an important diversity in this bacterial population and no wide circulation among the different compartments.

OPEN ACCESS

Edited by:
Rustam Aminov, University of Aberdeen, United Kingdom

Reviewed by:
Astrid Louise Wester, Norwegian Institute of Public Health (NIPH), Norway
Alain Hartmann, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), France
Kai Zhou, First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology, China

***Correspondence:**
Matthieu Pot
mpot@pasteur-guadeloupe.fr

Specialty section:
This article was submitted to Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 10 November 2020
Accepted: 31 May 2021
Published: 25 June 2021

Citation:
Pot M, Reynaud Y, Couvin D, Ducat C, Ferdinand S, Gravey F, Gruel G, Guérin F, Malpote E, Breurec S, Talarmin A and Guyomard-Rabenirina S (2021) Wide Distribution and Specific Resistance Pattern to Third-Generation Cephalosporins of Enterobacter cloacae Complex Members in Humans and in the Environment in Guadeloupe (French West Indies). Front. Microbiol. 12:628058. doi: 10.3389/fmicb.2021.628058

In our setting, the mutations responsible for resistance to 3GCs, especially in *ampD*, were diverse and not compartment specific. In conclusion, high levels of resistance in non-human *E. cloacae* complex isolates are probably due to environmental factors that favor the selection of these resistant strains, and this will be explored further.

Keywords: *Anolis marmoratus*, cephalosporinase overproduction, *Enterobacter cloacae* complex, ESBL, *hsp60*, one health, phylogeny, Caribbean

INTRODUCTION

Bacteria in the *Enterobacter cloacae* complex (ECC) are widely distributed in numerous terrestrial and aquatic environments, and also in air and space equipment (Singh et al., 2018; Davin-Regli et al., 2019; Uchida et al., 2020). ECC are found in the gut microbiota of animals, including reptiles, mammals, and humans, and some studies have reported that the complex is endophytic (Liu et al., 2012; Singh et al., 2013; Davin-Regli et al., 2019). This bacterial complex also includes phytopathogenic clones (Humann et al., 2011), infection-causing strains in wild fauna and domestic animals (Haenni et al., 2016; Goldberg et al., 2019), and opportunistic pathogens that are involved in a wide variety of human infections, especially those associated with health care (Garinet et al., 2018).

The denomination "complex" refers to different *Enterobacter* species and subspecies, which are difficult to discriminate clearly only with phenotypic approaches. The current classification of ECC members is based on DNA analysis and specifically on partial sequence comparisons of heat-shock protein 60-gene (*hsp60*) fragments (Davin-Regli et al., 2019). The population structure of this complex was initially divided into 12 genetic clusters (C-I to C-XII) and a loosely knit group (C-xiii; Hoffmann and Roggenkamp, 2003). More recently, use of whole-genome sequencing (WGS) revealed a total of 22 phylogenetic clades (A–V), further illustrating the complex taxonomy of this genus (Chavda et al., 2016; Sutton et al., 2018). In addition, some phylogenetic clades are associated with previous *hsp60* clusters, and a novel cluster was reported (Beyrouthy et al., 2018).

The distribution of the ECC clusters was analyzed in studies related to clinical isolates (Kremer and Hoffmann, 2012; Garinet et al., 2018). Strains belonging to C-III, -VI, and -VIII usually predominated and were found to carry various determinants of antibiotic resistance (Stock et al., 2001; Hoffmann et al., 2005; Kremer and Hoffmann, 2012; Peirano et al., 2018). These clusters appeared to be adapted to the hospital environment (Paauw et al., 2008), and geographic specificities were recently reported (Zhou et al., 2018). Few studies, however, have provided information about the distribution of ECC members in animals and other sources, which limits comparisons and impedes understanding of their global epidemiology (Hoffmann and Roggenkamp, 2003; Kämpfer et al., 2008; Haenni et al., 2016).

Enterobacter cloacae complex belongs to the ESKAPE group which referred to *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp., and is recognized as a "priority pathogen" due to its clinical relevance and association with antibiotic resistance and virulence genes (Rice, 2008; World Health Organization, 2017). All members of this complex have similar susceptibility to antibiotics (Davin-Regli et al., 2019), except fosfomycin (Stock et al., 2001). They are intrinsically resistant to aminopenicillin, the combination amoxicillin–clavulanic acid, and the first two generations of cephalosporins because they express an inducible *ampC* cephalosporinase. Under selection pressure, derepressed mutants often emerge, which overproduce cephalosporinase, conferring a high level of resistance to third-generation cephalosporins (3GCs) and increasing the minimum inhibitory concentration required for the fourth generation, such as cefepime (Guérin et al., 2015; Kohlmann et al., 2019; Mizrahi et al., 2020). Since the emergence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), plasmidic acquisition of ESBL determinants has become an important mechanism in 3GCs resistance (3GC-R), especially among clinical ECC strains, as for most *Enterobacteriaceae*. These bacteria are also capable of acquiring genes that encode for carbapenemases, further restricting therapeutic management (Peirano et al., 2018). ESBL acquisition or cephalosporinase overproduction (CoP) appear to be distributed differently inside *hsp60* clusters, as illustrated by a higher frequency of ESBL production in C-VI and -VIII isolates (Stock et al., 2001; Garinet et al., 2018). As in other high resource countries, community resistance of ECCs to 3GCs is rare in Guadeloupe because of lower selection pressure (Guyomard-Rabenirina, 2016).

Although these bacteria have been described in the environment, the susceptibility of environmental strains is not well understood. There is little information in Guadeloupe, as in other South American countries, on the distribution of ECC members or on the resistance to antibiotics of strains isolated in the environment and in clinical samples. Resistance of *Enterobacteriaceae* to 3GCs was rare in community-acquired urinary tract infections (4.0%), due mainly to ESBL production (Guyomard-Rabenirina, 2016), in contrast to the high frequency of ESBL in clinical ECC (19.7%) from the University Hospital of Guadeloupe (S. Breurec, personal communication). In the local environment, we observed a high prevalence of 3GC-R *Enterobacteriaceae* carriage in feces of *Anolis marmoratus* (89/234, 38.0%), a small endemic lizard, and ECC members

Abbreviations: 3GC, third-generation cephalosporin; 3GC-R, third-generation cephalosporin resistant; ECC, *Enterobacter cloacae* complex; ESBL, extended-spectrum beta-lactamase; ESKAPE, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.; CoP, cephalosporinase overproduction; *hsp60*, heat-shock protein 60 gene-fragment; SNP, single nucleotide polymorphism; ST, sequence type; UD, undefined cluster; WGS, whole-genome sequencing; WT, wild-type.

were the most prevalent among isolated strains (57/115, 49.5%; Guyomard-Rabenirina, 2016).

We conducted this study to investigate the distribution of ECC *hsp60* clusters isolated from various sources in Guadeloupe and to characterize their antibiotic susceptibility patterns in a "one health" approach. Genomic analysis was conducted on the main clusters in clinical samples (C-VI and C-VIII) and in different biotopes to compare the strains and to investigate the high level of 3GC-R in non-human samples.

MATERIALS AND METHODS

Collection From Human

Between January and December 2018, clinical ECC isolates obtained during routine bacteriological diagnostics were collected prospectively from patients admitted to the University Hospital of Guadeloupe, a 900-bed teaching hospital in Pointe-à-Pitre/Les Abymes. The date and nature of the sample, and the results of antibiotic susceptibility analysis were recorded anonymously. Isolates were considered to be hospital-acquired if there were collected from patients hospitalized for more than 48 h after admission. The others were notified as to be community-acquired. Human samples were taken in accordance with the requirements of the local ethics committee and did not interfere with laboratory organization (reference A5_19_12_05_TRAMID).

Sampling for Animal and Environmental Isolates

Between January 2017 and December 2018, ECC strains were isolated from water catchment areas, local fruits and vegetables, and fresh fecal samples from *A. marmoratus* and farm animals sampled at different sites in Guadeloupe.

Overall, 168 free-living adult lizards were caught and sampled at 17 sampling sites throughout the island (**Supplementary Table 1**). All the procedures were approved by the regional environment, planning, and housing agency and by the Guadeloupe National Park. The project was also approved by the Committee for Ethics in animal experiments of the French West Indies and Guyana (reference 971-2016-12-20-001). Animals were cared for and used according to French decree No. 2013-118 of 1 February 2013 on the protection of animals, which meets European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (Guyomard-Rabenirina et al., 2020). To study a possible association between ECC carriage and the degree of human activity at the site at which wild individuals were caught, the sampling location and the type of environment (urban, coastline, and mountain forest) were recorded (**Supplementary Table 1**). Urban sites were considered to be associated with moderate to high human activity, and the coastline and mountain forest environments with limited human impact. Fresh fecal samples from 34 pigs and 28 beef cattle were collected at the only slaughterhouse in Guadeloupe, located in Le Moule. The municipality of origin of the sampled animal was recorded (**Supplementary Table 1**). No information was available on antibiotic treatment. A total of 76 samples of fresh, locally produced fruits and vegetables were collected aseptically at four local markets (Bergevin, Convenance, Gourdeliane, and Saint-Jules). The market and the farm of origin were recorded, as well as the type of fertilizer used (organic or chemical) on each identified farm ($n = 27$ in **Supplementary Table 1**). A total of 40 raw water samples, which corresponded to drinking water before treatment, were collected at 24 catchment points, in collaboration with the regional health agency and the hygiene laboratory of the Pasteur Institute of Guadeloupe. Most of these sampling points were located in Basse-Terre. All samples were transported rapidly to the laboratory, stored at $5 \pm 3°C$ and analyzed within 4 h.

ECC Isolation and Antibiotic Susceptibility Analysis

All non-human samples were enriched. Animal stools, fruits, and vegetables were mixed with buffered peptone water. For water samples, 100 mL of serially diluted samples were filtered through a 0.45-µm membrane filter (Millipore, Guyancourt, France), and the membranes were placed in 9 mL of buffered peptone water solution. The non-selective enrichment broth for all samples was incubated for 16–20 h at 37°C. Then, 100 µL were inoculated onto chromogenic agar (CCA, CHROMagar, Paris, France). In addition, to increase the chances of detection of 3GC-R strains in the bacterial population, the same medium supplemented with ceftriaxone at 4 mg/L was also inoculated. Plates were incubated for 16–20 h at 37°C. This antibiotic was selected as it is considered to be a weak inducer of CoP as other 3GCs (Mizrahi et al., 2020). A maximum of five presumptive ECC colonies from each plate were isolated and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan) and associated software.

Susceptibility to ampicillin (10 µg), amikacin (30 µg), amoxicillin–clavulanic acid (20–10 µg), aztreonam (30 µg), cefepim (30 µg), cefotaxime (5 µg), cefoxitin (30 µg), ceftazidime (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), ertapenem (10 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), temocillin (30 µg), ticarcillin (75 µg), tigecycline (15 µg), and trimethoprim–sulfamethoxazole (1.25–23.75 µg) was determined for all ECC strains by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Isolates were classified as resistant, intermediate, or susceptible according to the 2018 guidelines of CA-SFM/EUCAST[1]. Isolates of intermediate susceptibility were grouped with resistant isolates for data analysis (**Supplementary Table 2**). Production of ESBL was detected with the double-disk synergy test, according to CA-SFM/EUCAST recommendations.

DNA Extraction

Total bacterial DNA was initially extracted from pure cultures with the Qiagen QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.

ESBL Resistance Gene Screening

Extended-spectrum beta-lactamase-encoding genes were screened by polymerase chain reaction (PCR). On the basis of

[1] http://www.sfm-microbiologie.org

previous epidemiological evidence for ECC in the community, PCR was performed only for bla_{CTX-M} group 1 (Dallenne et al., 2010; Guyomard-Rabenirina, 2016). Amplicons were sequenced at Eurofins (Eurofins Genomic SAS, Les Ullis, France). Resistance genes were identified from the ResFinder database (Zankari et al., 2012).

ECC *hsp60* Typing

As ECC members cannot be differentiated reliably with classic identification methods, we conducted sequence analysis of the partial *hsp60* gene, as described previously on 313 local strains (Hoffmann and Roggenkamp, 2003). PCR products were sequenced at Eurofins, and DNA sequences and chromatograms were analyzed with ApE software[2]. Maximum likelihood phylogenetic reconstruction was performed with RAxML in 100 replications (Stamatakis, 2014). The tree was drawn with iTOL (Letunic and Bork, 2019) and rooted with *Klebsiella aerogenes hsp60* partial sequence (AB008141.1; Hoffmann and Roggenkamp, 2003). Accession numbers for previously identified *hps60* cluster sequences are listed in **Supplementary Figure 1**. To complete the analysis, *hsp60* partial sequences were extracted from the assembled genomes of ECC ST873 strains, characterized, and added as a new ECC cluster (C-XIV – Clade S; Beyrouthy et al., 2018). Similar initial bioinformatic analysis was conducted on a selection of different ECC strains used and identified by Chavda et al. (2016), and Sutton et al. (2018; **Supplementary Figure 1**). We also included *hsp60* partial sequences of recently named strains: *E. wuhouensis*, *E. quasihormaechei* (Wang et al., 2020), *E. huaxiensis*, *E. chuandaensis* (Wu et al., 2019), and *E. oligotrophicus* (formerly *E. oligotrophica*) (Akita et al., 2019). The collected strains were assigned to a cluster on the basis of the reference data set used and bootstrap values (**Supplementary Figure 1**). When multiple strains were found in the same sample, only one in each cluster or resistance phenotype profile against beta-lactam antibiotics was conserved for the analysis, to avoid duplicates.

Core-Genome Phylogenetic Analyses

To better describe possible circulation of ECC lineages collected from animals, fresh food, raw water, and humans and to gain understanding of the emergence of 3GC-R ECC from non-human samples, WGS was conducted on randomly selected strains in the two most prevalent *hsp60* clusters: C-VI (n = 45) and C-VIII (n = 86). Their origins were: 47 from *Anolis*, 5 from domestic animals, 14 from fresh produce, 10 from raw water samples, and 55 from human isolates. WGS was performed at the "Plateforme de microbiologie mutualisée" of the Pasteur International Bioresources network (Institut Pasteur, Paris, France). The method and software used for sequencing, quality checking and core-genome extraction were described previously (Guyomard-Rabenirina et al., 2020). Raw reads were trimmed and filtered with AlienTrimmer (Criscuolo and Brisse, 2014). Genomes were assembled with SPAdes software (Bankevich et al., 2012), and final quality was appreciated with QUAST and BUSCO score (Gurevich et al., 2013; Simão et al., 2015).

Total core single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected with Snippy software version 4.4.5, with GENC200 strain as reference for C-VI isolates and GENC071 strain for C-VIII[3]. Recombination elements were removed from the global core genome alignment with ClonalFrameML software (Didelot and Wilson, 2015), The two maximum likelihood phylogenetic reconstructions were performed with RAxML software in the GTR-CAT model and 1000 bootstrap replicates, and the trees were drawn with iTOL. Multilocus sequence typing was performed *in silico* with mlst software[4] against the PubMLST database (Jolley et al., 2018), and virulence gene factors were identified with Abricate software[5] associated with the Virulence Factor Database with a threshold of 95% coverage and 75% nucleotide identity (Chen et al., 2016). Abricate was used with these parameters to assess plasmid replicon and antibiotic resistance gene content associated with PlasmidFinder and ResFinder databases, respectively (**Supplementary Table 3**; Zankari et al., 2012; Carattoli et al., 2014).

Focus on Cephalosporinase Genes and Mutations

In the ECC collection, 11 wild-type (WT)/CoP pairs from the same sample were analyzed for mutations. Each strain pair differed by fewer than 45 SNPs (**Supplementary Table 4**). Nine pairs belonging to ECC C-VIII and two to C-VI were selected. Most of the strains (14/22) were isolated from reptiles. Mutation analyses were performed with Snippy software, and the corresponding GenBank flat file format for each gene was retrieved from the NCBI website[6] (Benson et al., 2018). The accession numbers of the sequences used as references were: NZ_CP012165.1 (*E. hormaechei* subsp. *oharae* strain 34978, complete genome) and NC_014121.1 (*E. cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 chromosome, complete genome). All genes which could be involved in CoP and 3GC-R phenotype were analyzed and listed in **Supplementary Table 4** (see **Reference.gbk**). An in-house Perl script was used to extract results from files generated by Snippy and to create a table of the numbers of non-synonymous and synonymous gene mutations in the ECC sequences retrieved from the same host but with different antibiotic resistance profiles.

Statistical Analyses

The analyses and data collection were performed with Microsoft Access 2003. Pearson's χ^2 or Fisher's exact test was used. P values < 0.05 were considered significant.

[2]https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/

[3]https://github.com/tseemann/snippy

[4]https://github.com/tseemann/mlst

[5]https://github.com/tseemann/abricate

[6]https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

RESULTS

Between January 2017 and December 2018, 313 unique ECC strains were isolated from various sample types, after removal of duplicates (**Table 1**). In non-human isolates, ECC strains (WT and 3GC-R) were isolated from 57.9% (44/76) of fresh produce and 42.9% (72/168) of anole samples; half of the raw water samples (20/40) were positive, while ECC strains were isolated from only 29.0% of livestock samples (18/62). Overall, resistance to 3GCs was found in 16.2% of non-human samples (56/346) and was due only to CoP. Most of these 3GC-R strains exhibited a 6 mm inhibition diameter on Mueller-Hinton agar plate for cefotaxime and ceftazidime antibiotics (data not shown). The prevalence of CoP was higher in anole samples (35/168, 20.8%) than in vegetable (13/76, 17.1%), livestock (6/62, 9.7%), or water isolates (2/40, 5.0%). Most of the anoles were trapped in areas impacted by human activities (n = 112, 66.7%); however, no significant difference was found in the rates of CoP by degree of human activity (**Table 2**). A positive association was found between the prevalence of positive for ECC and use of organic fertilizer (11/11) rather than chemical fertilizer (4/12; P = 0.001) from the 27 identified farms, but a similar association was not found for the CoP rate (P = 0.15, i.e., 4/11 and 1/12; **Supplementary Table 1**).

Most of human isolates were hospital-acquired (95/107) and 3GC-R were mainly associated to ESBL production (40/62; **Table 1** and **Supplementary Table 2**). Genes encoding for ESBL were identified in all clinical strains positive in the double-disk synergy test (40/107, 37.4%). Amplicon sequencing revealed a $bla_{\mathrm{CTX-M-15}}$ gene in 38 isolates (95.0%). In addition, WGS allowed us to identify a $bla_{\mathrm{GES-7}}$ gene on the two last ESBL producers (GENC084, GENC220). One strain of human origin carried a $bla_{\mathrm{OXA-48}}$ gene (GENC133).

Co-resistance against beta-lactams (including 3GCs) and other antibiotic families was observed mainly in human associated strains and was usually to fluoroquinolones (41/62, 66.2%; **Table 1**). Co-resistance to gentamicin and trimethoprim–sulfamethoxazole was also found frequently, in 29 3GC-R clinical strains (46.8%) but not in samples from other sources. Only one strain from a raw water sample was resistant to nalidixic acid (ECC403), and one strain from livestock was notified resistant to trimethoprim–sulfamethoxazole and tigecycline (ECC408).

Distribution of *hsp60* Clusters

Strain diversity was first investigated with *hsp60* typing. A neighbor-joining tree was constructed with 129 alignment patterns of 313 partial *hsp60* sequences from the different isolates, comprising 131 strains from the animal collection (110 from anole, 9 from pig, and 12 from beef cattle), 23 from water, 52 from fresh produce, and 107 from clinical samples (**Table 3** and **Supplementary Figure 1**). All *Enterobacter* Hoffman clusters except C-VII (*E. hormaechei* subsp. *hormaechei*) were represented in our study, including C-XIV (n = 2) in human and domestic animal samples

TABLE 1 | Prevalence of resistance to each tested antibiotic of *E. cloacae* complex (ECC) isolates.

Antibiotic	Human (N = 107)				*Anolis* (N = 110)		Fresh produce (N = 52)		Water (N = 23)		Livestock (N = 21)	
	WT (N = 45)	CoP (N = 21)	ESBL (N = 40)	CP (N = 1)	WT (N = 70)	CoP (N = 40)	WT (N = 38)	CoP (N = 14)	WT (N = 21)	CoP (N = 2)	WT (N = 15)	CoP (N = 6)
Ticarcillin	3 (6.7)	21 (100.0)	40 (100.0)	1 (100.0)	4 (5.7)	36 (90.0)	4 (10.5)	14 (100.0)	–	2 (100.0)	1 (6.7)	6 (100.0)
Temocillin	–	17 (81.0)	20 (50.0)	1 (100.0)	1 (1.4)	17 (42.5)	–	9 (64.3)	–	–	–	2 (33.3)
Cefotaxime	–	21 (100.0)	40 (100.0)	1 (100.0)	–	33 (82.5)	–	14 (100.0)	–	2 (100.0)	–	6 (100.0)
Ceftazidime	–	19 (90.5)	40 (100.0)	1 (100.0)	–	40 (100.0)	–	14 (100.0)	–	2 (100.0)	–	6 (100.0)
Aztreonam	–	14 (66.7)	39 (97.5)	1 (100.0)	–	34 (85.0)	–	13 (92.9)	–	1 (50.0)	–	6 (100.0)
Cefepim	–	–	40 (100.0)	1 (100.0)	–	–	–	–	–	–	–	–
Ertapenem	–	1 (4.8)	1 (2.5)	1 (100.0)	–	20 (50.0)	–	9 (64.3)	–	1 (50.0)	–	4 (66.7)
Nalidixic acid	4 (8.9)	4 (19.0)	38 (95.0)	1 (100.0)	–	–	–	–	1 (4.8)	–	–	–
Ciprofloxacin	3 (6.7)	4 (19.0)	36 (90.0)	1 (100.0)	–	–	–	–	–	–	–	–
Gentamicin	–	2 (9.5)	31 (77.5)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Amikacin	–	–	1 (2.5)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Tigecycline	3 (6.7)	1 (4.8)	5 (12.5)	–	–	–	–	–	–	–	1 (6.7)	–
Trimethoprim – sulfamethoxazole	3 (6.7)	2 (9.5)	35 (87.5)	1 (100.0)	–	–	–	–	–	–	1 (6.7)	–

*ECC strains (n = 313) were grouped according to their origin and resistance to beta-lactam antibiotics: wild-type (WT), cephalosporinase overproduction (CoP), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), or carbapenemase production (CP). All strains were resistant to ampicillin, amoxicillin–clavulanic acid, and cefoxitin (i.e., "R" **Supplementary Table 2**).*

TABLE 2 | Carriage of *E. cloacae* complex and third-generation cephalosporin-resistant (3GC-R) strains in the *Anolis* population, according to degree of human activity.

Sampling site			*Anolis marmoratus* sampled	*E. cloacae* complex isolation			
Type	**(*N* = 17)[a]**	**Degree of human activity**	**(*N* = 168)**	**Total of positive sample *N* (%)**	***p-value***	**3GC-R *N* (%)**	***p-value***
Urban	11	Moderate-high	112	53 (47.3)	0.1	25 (22.3)	0.5
Coastline or mountain forest	6	Limited	56	19 (33.9)		10 (17.9)	

[a] *GPS coordinates are provided in* ***Supplementary Table 1***.

(Hoffmann and Roggenkamp, 2003; Beyrouthy et al., 2018); 28 strains, mainly human isolates (14/28), did not correspond to any of the 14 previously defined *hsp60* clusters. They were grouped into six undefined *hsp60* clusters (recorded as UD1–6), which included ECC clades recently identified by WGS (K, L, P, N, T) and *E. oligotrophica* (**Table 3**, **Supplementary Table 2**, and **Supplementary Figure 1**; Chavda et al., 2016; Sutton et al., 2018; citealpBR1).

Cluster VIII was best represented, except in livestock and fresh produce. C-VI was the second most frequent in clinical strains, whereas C-xiii was over-represented among anole isolates (28.2%), and *E. asburiae* was more frequent in water samples (C-I, 17.4%). In livestock, C-XI, -VI, and -IX predominated (**Table 3** and **Supplementary Figure 1**). CoP strains were found in nearly all clusters except C-II, -V, and UD1, 3 and 5. The highest rate of CoP strains was found in cluster VIII (**Table 3**).

Genetic Analysis of ECC Clusters VI and VIII Populations

The WGS generated a mean of 149.87 bp paired-end reads, with an estimate coverage of 77.851-fold (AlienTrimmer; Criscuolo and Brisse, 2014). Quality of the assembly indicated a mean N50 of 309532 (minimum 43293, maximum 782933), and a mean single-copy BUSCO score of 98.6% completeness (Gurevich et al., 2013; Simão et al., 2015). Of the 45 sequenced isolates assigned to C-VI, 42 belonged to *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (clade A), and only three were identified as *E. hormaechei* subsp. *oharae* (clade C; **Table 3**; Sutton et al., 2018). These clade C strains were isolated from fresh produce and human samples (ECC 312, ECC336, and GENC003) and were not conserved for further analysis. Maximum likelihood phylogenetic analysis of *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* strains indicated wide diversity among isolates (mean SNP of all isolates n = 17973, minimum n = 4, and maximum n = 22821). Fifteen strains were not assigned to a well-known sequence type (ST) or identified as new, whereas the others belonged to nine clearly identified sequence types (**Figure 1**). The largest cluster contained 11 strains in the international clone ST114 (mean SNP between isolates n = 935, minimum n = 4, and maximum n = 2122), which were isolated only from humans. Most of the strains (8/11) were ESBL producers. Some genetically related clusters with isolates of different origins were observed, comprising a cluster with three ST98 strains (two from humans and one from a cucumber; SNP mean = 484, minimum = 68) and a second with three vegetables strains belonging to ST344. The samples, taken at the same time at Bergevin market on 12 January 2018 (**Supplementary Table 1**), were from two farms, had the same antibiotic resistance profile (3GC-R), and differed by a mean of 45 SNPs (minimum = 36). One strain from *Anolis* clustered with an isolate from fresh produce, with only 65 SNPs difference (**Figure 1**).

Phylogenetic analysis of C-VIII revealed greater diversity, especially among anole strains (mean SNP for all isolates n = 23125, minimum n = 8, and maximum n = 27680). Various lineages were observed in the same sample (samples a, e, and f in **Figure 2** and **Supplementary Table 4**). *In silico* analyses revealed the presence of two main groups in this second tree. The first (C-VIII-A, n = 32) consisted mainly of clinical isolates (20/32; mean SNP among isolates n = 26166, minimum n = 8, and maximum n = 31449), while reptile strains predominated in the second one (C-VIII-B, 31/49). ESBL producers were found only in C-VIII-A and, as expected, only in human isolates. Like ST114 in ECC C-VI, ST113 was well represented in human samples for C-VIII (n = 9), and four were ESBL producers. This ST was not found in other biotopes (**Supplementary Table 3**).

As observed in the C-VI phylogenetic tree, some strains of different origins were genetically related. ST90 was recovered from three different *A. marmoratus*, one water sample, and one human (two strains from the same patient, l in **Figure 2** and **Supplementary Table 4**; mean SNP among isolates n = 1283, minimum n = 8, and maximum n = 2221). Most of these strains presented a CoP (5/6). Two other STs found in wild fauna and human samples clustered together: ST50, (ECC239–GENC185, 225 SNPs) and ST304 (ECC273–GENC100, 7698 SNPs). The human strain GENC117 shared the same target sequence of seven housekeeping genes with ECC386 isolated from water and a difference of 123 SNPs (i.e., new ST1493). One strain from *Anolis* clustered with an isolate from water, with a difference of only 101 SNPs (ECC443–ECC426). Two strains isolated from two *Anolis* 28 km apart clustered, with a difference of only 81 SNPs (ECC140–ECC300).

Few different resistance gene types were shared by ECC isolates from the 5 origins (**Supplementary Table 3**). The genes belonged to bla_{ACT}, and one gene conferred resistance to fosfomycin (*fosA*). Genes encoding for efflux pumps (*oqxA–oqxB* and *mdfA*) were observed in human and non-human isolates. Genes encoding for cephalosporinase were specific for each cluster. *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* was related to the $bla_{\mathrm{ACT-16}}$ gene type, while $bla_{\mathrm{ACT-15}}$ and $bla_{\mathrm{ACT-7}}$ were associated with *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*. Human strains belonging to C-VI and C-VIII expressed more resistance genes (mean, nine) than those from other compartments (mean, three; **Supplementary Table 3**). All sequenced and analyzed

TABLE 3 | Distribution of *E. cloacae* complex (ECC) members in samples of different origin.

***Enterobacter* species or subspecies names**	***hsp60* cluster[a]**	**WGS clade[a]**	**Number of collected strains**	**Origin N (%)**					**3GC-R *N* (%)**		**ESBL[c] *N* (%)**
				Human	***Anolis***	**Fresh produce**	**Water**	**Livestock**	**Human**	**Non-human[d]**	
			(*N* = 313)	**(*N* = 107)**	**(*N* = 110)**	**(*N* = 52)**	**(*N* = 23)**	**(*N* = 21)**	**(*N* = 62)**	**(*N* = 62)**	**(*N* = 40)**
E. asburiae	I	J	13	6 (46.1)	–	2 (15.4)	4 (30.8)	1 (7.7)	4 (30.8)	–	3 (23.1)
E. kobei	II	Q	3	2 (66.7)	–	1 (33.3)	–	–	–	–	–
E. hormaechei subsp. *hoffmannii*	III	D	1	1 (100.0)	–	–	–	–	1 (100.0)	–	–
E. roggenkampii	IV	M	18	4 (22.2)	6 (33.3)	6 (33.3)	1 (5.6)	1 (5.6)	3 (16.7)	3 (16.7)	–
E. ludwigii	V	I	1	1 (100.0)	–	–	–	–	–	–	–
E. hormaechei subsp. *xiangfangensis*	VI	A	48	28 (58.3)	6 (12.5)	9 (18.8)	–	5 (10.4)	22 (45,8)	10 (20.8)	16 (33.3)
E. hormaechei subsp. *oharae*	VI	C	3	1 (33.3)	–	2 (66.7)	–	–	–	1 (33.3)	–
E. hormaechei subsp. *hormaechei*	VII	E	–	–	–	–	–	–	–	–	–
E. hormaechei subsp. *steigerwaltii*	VIII	B	87	31 (35.6)	43 (49.4)	3 (3.5)	10 (11.5)	–	13 (14,9)	18 (20,7)	7 (8.0)
E. bugandensis	IX	R	32	10 (31.2)	7 (21.9)	9 (28.1)	2 (6.3)	4 (12.5)	4 (12.5)	6 (18.6)	1 (3.1)
E. cloacae subsp. *cloacae*	XI	G	19	5 (26.3)	1 (5.3)	5 (26.3)	1 (5.3)	7 (36.8)	2 (10.5)	1 (5.3)	1 (5.3)
E. cloacae subsp. *dissolvens*	XII	H	21	2 (9.5)	8 (38.1)	8 (38.1)	1 (4.8)	2 (9.5)	1 (4,8)	4 (19,0)	–
E. cloacae complex	xiii	na	37	1 (2.7)	31 (83.8)	3 (8.1)	2 (5.4)	–	–	16 (43.2)	–
E. quasihormaechei	XIV	S	2	1 (50.0)	–	–	–	1 (50.0)	1 (50.0)	–	1 (50.0)
Undefined clusters[b]	UD1	P	1	1 (100.0)	–	–	–	–	–	–	–
	UD2	N	2	–	1 (50.0)	1 (50.0)	–	–	–	1 (50.0)	–
	UD3	K	2	–	1 (50.0)	1 (50.0)	–	–	–	–	–
	UD4	L	14	13 (92.9)	–	–	1 (7.1)	–	11 (78.6)	1 (7.1)	11 (78.6)
	UD5	na	1	–	1 (100.0)	–	–	–	–	–	–
	UD6	T	8	–	5 (62.5)	2 (25.0)	1 (12.5)	–	–	1 (12.5)	–

[a] *Details of the strains and sequences used as reference are provided in* ***Supplementary Figure 1*** *and in* ***Supplementary Table 2****.* [b] *Undefined cluster numbers proposed in this article.* [c] *Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers were only recovered from human samples.* [d] *Most of the third-generation cephalosporin-resistant (3GC-R) strains isolated from non-human samples were identified from CCA medium supplemented with ceftriaxone 4 mg/L (56/62; see* ***Supplementary Table 2****); na, not attributed.*

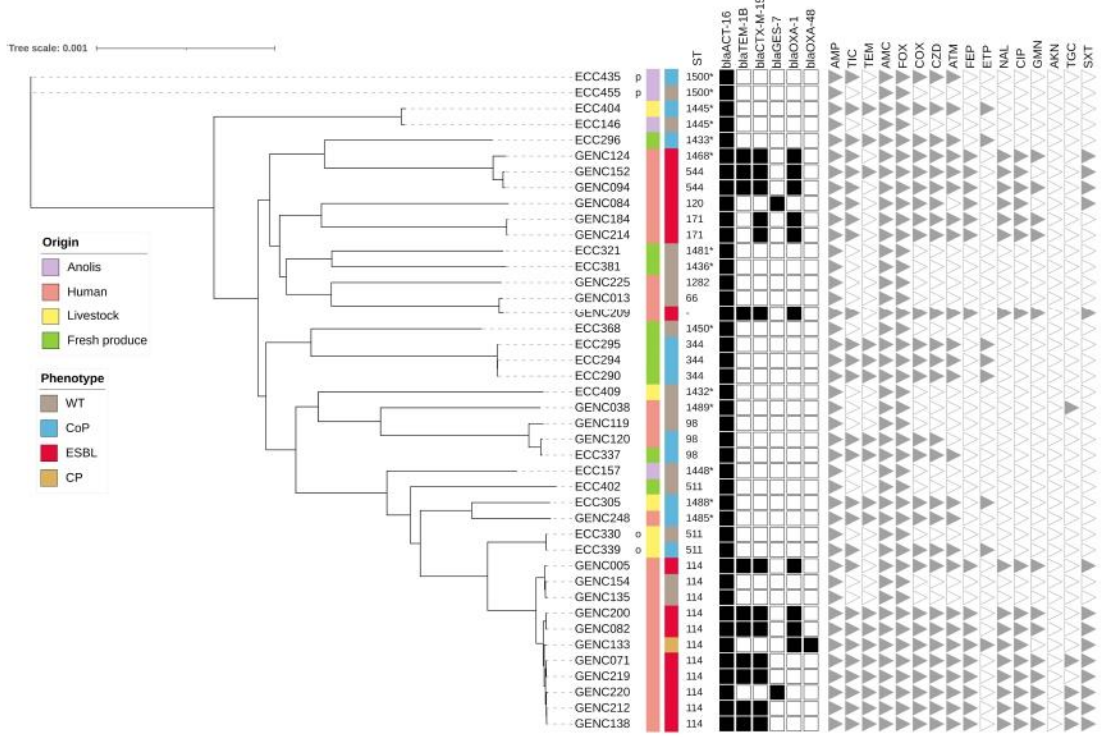


FIGURE 1 | Maximum likelihood phylogenetic tree of *E. cloacae* complex C-VI – clade A isolates recovered in Guadeloupe (n = 42). Maximum likelihood phylogenetic reconstructions were performed with RAxML software (1000 bootstrap replicates), and the tree was drawn with iTOL. Hosts and phenotypes are indicated by vertical colored strips. The letters indicate specific wild-type and cephalosporinase overproduction pairs in the same sample. New sequence types (STs) identified in this study are indicated by a star, while unknown ST is denoted by a dash. Only genes that confer resistance to beta-lactam antibiotics were included. They were characterized by ResFinder and are indicated by black squares; all genetic details are provided in **Supplementary Table 3**. Antibiotic resistance profiles are indicated by gray triangles; AKN, amikacin; AMC, amoxicillin–clavulanic acid; AMP, ampicillin; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacin; COX, cefotaxime; CZD, ceftazidime; ETP, ertapenem; FEP, cefepim; FOX, cefoxitin; GMN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TEM, temocillin; TGC, tigecycline; TIC, ticarcillin; and SXT, trimethoprim–sulfamethoxazole.

strains resistant to fluoroquinolones (28/128; except GENC200) harbored quinolone resistance genes (*qnrB1*, *qnrB19* or *qnrS2*). Regarding the plasmid distribution, 50.0% (64/128) of the sequenced C-VI and C-VIII carried at least one identifiable replicon type. Among them Col (48/64), IncFII (n = 24), IncHI2 (n = 21), and IncFIB (n = 20) were the most often identified. Only 24.3% (18/74) of non-human strains presented at least one replicon. This prevalence was higher in the human collection (46/54, 85.2%), and whole-genome sequenced ESBL-producing ECC were especially associated with an IncHI2 signature (19/22, 86.4%; **Supplementary Table 3**). We also identified genes associated with virulence in C-VI and C-VIII populations in both human and non-human strains, which are involved in bacterial adherence, iron uptake, motility, or toxin production (**Supplementary Table 3**). Globally, human and non-human isolates expressed a similar number of virulence genes (mean twenty-one). All sequenced C-VIII strains (n = 86) harbored genes involved in the salmochelin siderophore system (*iroB*, *iroC*, *iroD*, *iroE*, and *iroN*), while this system was not found in the C-VI population. The yersiniabactin system (*fyuA*, *irp1*, *irp2*, *ybtA*, *ybtE*, *ybtP*, *ybtQ*, *ybtS*, *ybtT*, *ybtU*, and *ybtX*) was identified in two non-human strains belonging to ST90 (ECC169 and ECC403).

Cephalosporinase Genes Mutation Profile Analysis

In isolates analyzed for cephalosporinase mutation, alignment of the AmpD protein sequences belonging to the WT ECC showed relatively good conservation (with an overall identity of 94.65%). Few mismatches were found (**Supplementary Table 4**). Comparison of 3GC-R with WT isolates from the same sample indicated that differences in mutations were found mainly in the *ampD* gene. Significant mutations are listed in the last column of **Supplementary Table 4**. Furthermore, other genes such as *dacB* and *ramR* could play a non-negligible role in the differentiation of resistant and susceptible strains. Our analysis indicates non-synonymous mutations different from those was observed previously, although Ala60Val substitution in *ampD* was also detected in ECC033 and ECC037 (Flury et al., 2016).

DISCUSSION

This study of ECC diversity in samples from different compartments in Guadeloupe showed by *hsp60* typing analysis that six clusters (C-IV, -VI, -VIII, -IX, -XI, and -XII) are identified in more than two thirds of the strains (228/313, 72.8%), and most

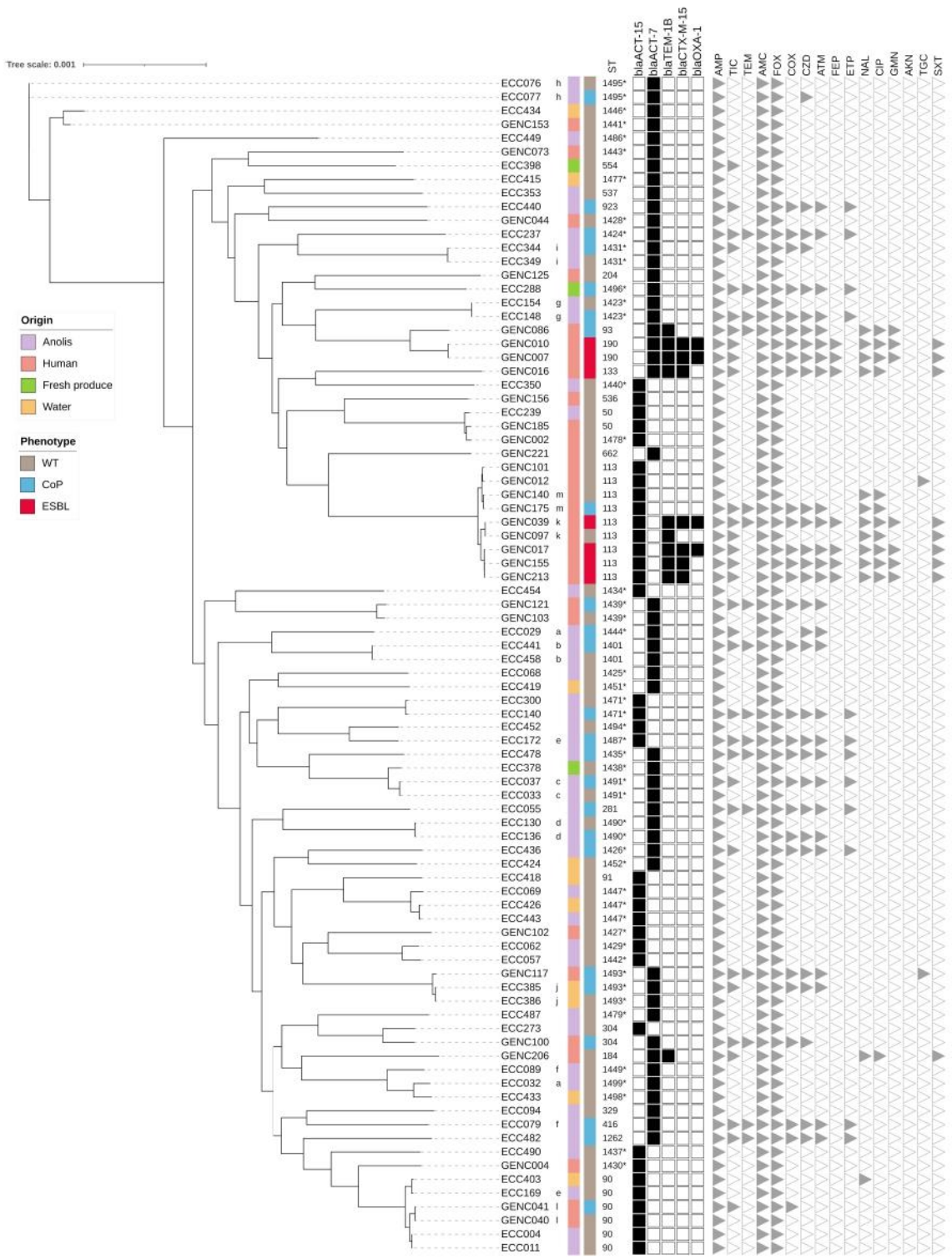


FIGURE 2 | Maximum likelihood phylogenetic tree of *E. cloacae* complex C-VIII isolates recovered in Guadeloupe (n = 86). Maximum likelihood phylogenetic reconstructions were performed with RAxML software (1000 bootstrap replicates), and the tree was drawn with iTOL. Hosts and phenotypes are indicated by vertical colored strips. The letters indicate specific wild-type and cephalosporinase overproduction pairs in the same sample. New sequence types (STs) identified in this study are indicated by a star. Only genes that confer resistance to beta-lactam antibiotics were included. They were characterized by ResFinder and are indicated by black squares; all genetic details are provided in **Supplementary Table 3**. Antibiotic resistance profiles are indicated by gray triangles; AKN, amikacin; AMC, amoxicillin–clavulanic acid; AMP, ampicillin; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacin; COX, cefotaxime; CZD, ceftazidime; ETP, ertapenem; FEP, cefepim; FOX, cefoxitin; GMN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TEM, temocillin; TGC, tigecycline; TIC, ticarcillin; and SXT, trimethoprim–sulfamethoxazole.

are present in all sample types. Although this typing method is limited and focus on only one gene (Hoffmann and Roggenkamp, 2003; Wu et al., 2020), it indicates a high degree of diversity of this bacterial complex which is present in a wide variety of compartments.

The *E. hormaechei* metacluster predominated especially with C-VI (51/313, 16.3%) and C-VIII (87/313, 27.8%), which were also the most frequent clusters in human infections (27.1 and 29.0%, respectively). Surprisingly, C-III was rare in Guadeloupe, with only one strain in a human sample, whereas this *E. hormaechei* subspecies is one of the most frequently reported in clinical studies (Hoffmann and Roggenkamp, 2003; Kremer and Hoffmann, 2012; Garinet et al., 2018). In contrast, we notified the high prevalence of the *hsp60* UD4 cluster in our set of clinical isolates which should referred to ECC clade L (Sutton et al., 2018), and a possible new successful ESBL-producing lineage.

Among other important clusters, *E. bugandensis* (C-IX) accounted for 10 of the 107 clinical strains, and 22 isolates were recovered from non-clinical samples. This species was found mainly in fresh produce (9/22) and reptile feces (7/22). It has been reported in wild fauna, livestock, and the environment in only a few studies (Khanna et al., 2013; Singh et al., 2018; Matteoli et al., 2019; Wu et al., 2020). *E. bugandensis* has been described as the most virulent and pathogenic of all ECC strains (Doijad et al., 2016; Pati et al., 2018), which raises concern, as fresh produce may be the origin of dissemination of virulent pathogens in the community, as for some *Escherichia coli* lineages (Luna-Guevara et al., 2019).

As C-VI and -VIII were the most prevalent *hsp60* clusters in this collection, the WGS analysis was conducted to investigate their potential clone diffusion among human, animal, and environmental samples. Among C-VI, *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* was overrepresented in comparison to the other related subspecies *E. hormaechei* subsp. *oharae* (3/45) as reported in previous studies (Peirano et al., 2018; Sutton et al., 2018). Core-genome analysis showed that clonal spread at hospital level was limited to a few genetic backgrounds which were previously found in human infections (i.e., ST113 and ST114; Peirano et al., 2018; Siebor et al., 2019). In accordance with our observations, they have rarely been observed in samples of other origins, except from companion and wild animals (Haenni et al., 2016; Harada et al., 2017; Goldberg et al., 2019). Different sample types shared a few lineages, one being ST90 (n = 5), which is also involved in human and animals infections (Peirano et al., 2018; Zhu et al., 2020). Moreover, two ST90 strains isolated from an anole and a raw water sample harbored genes encoding for the yersiniabactin system. The presence of this highly pathogenic island has previously been described in other *Enterobacteriaceae* species and was associated with a specific *E. hormaechei* clone that caused a hospital outbreak in Netherlands (Paauw et al., 2009). Another ST previously found in a clinical sample (ST98) was present in both a human collection and fresh produce (Izdebski et al., 2015). ST344 clones were found in three fresh products but from two different market stands, suggesting manual strain circulation.

This study also showed a high frequency of 3GC-R ECC members in non-human samples such as livestock and fresh local produce, and confirmed previous observations on the local anole population (Guyomard-Rabenirina, 2016). Three hypotheses have been proposed to explain this high prevalence of CoP ECC strains in these compartments. The first one was a human origin of these resistant strains, with the spread of successful lineages among compartments; however, *hsp*60 clusters distribution within each sample type and the WGS analysis of C-VI and -VIII, indicated a wide diversity, which was not in favor of exchanges. Although some whole-genomes sequenced strains isolated from humans, lizards, and other origins were genetically close, most of them were grouped separately.

The second hypothesis was an impact of human activities, which could exert selective pressure for resistant ECC strains, as few international ST were found in non-clinical isolates (ST90, ST98; Izdebski et al., 2015; Peirano et al., 2018). No significant difference was found between *Anolis* individuals sampled near or far from areas of human activity, which is congruent with the results of a study on 3GC-R *E. coli* carriage in lizard in Guadeloupe (Guyomard-Rabenirina et al., 2020). To go further in a recent survey, *Anolis* (n = 20) and other wild animals (n = 67; rat, bird, toad, and cockroach) living near the hospital sewers and at the associated wastewater treatment plant were sampled. Among them, 21.8% (19/87) carried 3GC-R ECC including one *Anolis*. These strains were exclusively ESBL-producers, and WGS analysis indicated the presence of a ST114 lineage closely related to human samples and the dissemination of an IncHI2/$bla_{CTX-M-15}$ plasmid. Taken together, these results suggested that only specific polluted environments associated with an important selective pressure are in favor of a large dissemination and maintenance of human related resistant strains in the wild fauna compartment (Pot et al., 2021). This second hypothesis is less well supported for fruits and vegetables, as the origin of the resistant clones in such samples could be multifactorial (Hölzel et al., 2018). Overall, the prevalence of 3GC-R clones in fresh produce was higher than in a previous larger collection, but only for CoP clones (van Hoek et al., 2015), in contrast to other published reports of ESBL producers (van Hoek et al., 2015; Hölzel et al., 2018). Our results suggest that organic fertilization is associated with a higher load of ECC strains in fresh produce but is not correlated with higher counts of CoP ECC, as described previously (Marti et al., 2013).

As it has been suggested that ECC members have higher mutation rates due to derepression than other genera with constitutive *ampC* (Kohlmann et al., 2018), we explored a third hypothesis, that non-human strains have a greater ability to acquire specific mutations in genes encoding for AmpC. This hypothesis was rapidly excluded by analysis of 11 WT/CoP pairs, in which most mutations were shared by strains from the different compartments and especially mutations in *ampD*, which has been suggested to be the leading mechanism in ECC with CoP in human samples (Guérin et al., 2015).

Our results increase the understanding of reservoirs definition and sources of ECC infections in a tropical setting. Several limitations should be pointed in this study. First, human

isolates were recovered from only infectious sites and were mostly specified to be hospital-acquired. Nevertheless, since ECC members are opportunistic pathogens and belong to *Enterobacteriaceae*, most of infections came from endogenous colonizing strains (Gorrie et al., 2018). As we used selective medium to facilitate resistance detection, it could led to the overrepresentation of 3GC-R ECC in non-human isolates. This selection bias was limited by using ceftriaxone as selective antibiotic, described as a weak CoP inducer (Mizrahi et al., 2020). Moreover, previous authors indicated a relatively low rate of derepressed mutant in ECC population (3×10^{-8}; Kohlmann et al., 2018), although we did not estimate the mutation rate in our non-human samples due to the presence of various cultivable genus and species in agar plates.

CONCLUSION

Our findings highlight the widely diverse distribution of ECC members in non-human and human samples. We found a high prevalence of 3GC-R ECC in non-human samples, due exclusively to CoP. None of our hypotheses could explain this prevalence, and higher mutation rate is not excluded. These results suggest that this characteristic confers a selective advantage for these strains. Unknown persistent environmental factors, which should be further explored, may favor such overproduction.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The 313 partial *hsp60* sequences are available in **Supplementary Table 2** with strain details, while the whole-genome sequences of C-VI, clade A ($n = 42$) and C-VIII ($n = 86$) are deposited in GenBank under BioSample accession numbers SAMN15680734 to SAMN15680861 (**Supplementary Table 3**).

ETHICS STATEMENT

The parts of this project involving human participants were reviewed and approved by Commission de recherche éthique, Direction de la recherche et de l'innovation, CHU de la Guadeloupe (A5_19_12_05_TRAMID). Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. The animal study was reviewed and approved by the Committee for Ethics in animal experiments of the French West Indies and Guyana (reference 971-2016-12-20-001). Written informed consent for participation was not obtained from the owners because feces were collected from livestock animals at the slaughterhouse, just before slaughter. No data concerning farm was avalaible. Only the municipality origin of screened animals batchs was recorded.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MP, SG-R, and AT conceived and designed the study. MP, SB, CD, SF, GG, SG-R, EM, and AT collected biological samples, isolates, and epidemiological data. MP, DC, FGu, SG-R, FGr, AT, and YR analyzed the data. MP, SB, DC, SG-R, and AT wrote the manuscript. All the authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by a European Regional Development Fund grant, financed by the European Union and Guadeloupe Region (Grant ID: 2018-FED-1084).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all the technicians and students for their participation in this project at the ARS (Agence Régionale de Santé), the University Hospital, the Pasteur Institute of Guadeloupe and the "Plateforme de microbiologie mutualisée." We thank the curator team of the *E. cloacae* typing PubMLST database for their co-operation. We extend special thanks to E. Heseltine for editorial assistance. We also express our gratitude to the employees of the slaughterhouse in Le Moule and all the farmers and fruit and vegetable merchants for their collaboration.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.628058/full#supplementary-material

Supplementary Figure 1 | Maximum likelihood phylogenetic tree based on the partial sequence *hsp60* gene of *E. cloacae* complex (ECC) isolates recovered in Guadeloupe ($n = 313$). Maximum likelihood phylogenetic reconstructions were performed with RAxML software (100 bootstrap replicates), and the tree rooted with *Klebsiella aerogenes hsp60* sequence (AB008141.1) was drawn with iTOL. All the sequences used as reference in the tree have a corresponding GenBank accession number, and only sequences extracted from whole-genome of ECC strains were labeled with current names. Each *hsp60* cluster is identified by a specific color, and bootstrap values ≥ 60 are indicated. *Hsp60* sequences from C-X, which correspond to *Lelliottia nimipressuralis* (formerly *Enterobacter nimipressuralis*) are inserted (AJ567887.1, AJ567900.1). For better readability, C-IV nodes are grouped. The hosts of each local strain are specified by a circle (human), a square (livestock), a star (fresh produce), a right-pointing triangle (water), or a left-pointing triangle (*Anolis*). Phenotypes are indicated by a white form for wild-type against beta-lactam antibiotics, and a black form for third-generation cephalosporin-resistant strains. The global distribution is provided in **Table 3**, and all *hsp60* partial sequences are available in **Supplementary Table 2**. List of ECC partial *hps60* sequences included in this figure (associated cluster: C or UD, and accession number): **C-I**: AJ417140.1, AJ567846.1, AJ567893.1, FXLQ00000000; **C-II**: AJ567849.1, AJ567862.1, AJ567886.1, AJ567888.1, AJ567899.1, CP017181.1, **C-III**: AJ543781.1, AJ543789.1, AJ567871.1, AJ567872.1, AJ567877.1, AJ567880.1, CP017186.1; **C-IV**: AJ543784.1, AJ543806.1, AJ543807.1, AJ543867.1, AJ543877.1, AJ543889.1, AJ543893.1, CP017184.1; **C-V**: AJ417114.1, AJ862859.1, AJ862861.1, AJ862862.1, AJ862863.1, CP017279.1; **C-VI**: AJ543778.1, AJ543782.1, AJ567878.1, AJ866507.1, CP017180.1, CP017183.1; **C-VII**: AJ417108.1,

AJ862866.1, AJ862867.1, AJ866491.1, CAI28773.1, MKEQ00000000.1; **C-VIII**: AJ543821.1, AJ543849.1, AJ543857.1, AJ543908.1, AJ567884.1, AJ567889.1, AJ567890.1, AJ567892.1, CAD66305, CAI28810.1, CP017179.1; **C-IX**: AJ543819.1, AJ543820.1, AJ543878.1, AJ543881.1, CAD66281.1, CAD66282.1, LT992502; **C-XI**: AJ417139.1, AJ417142.1, AJ543768.1, AJ543855.1, NC014121.1; **C-XII**: AJ417143.1, AJ543817.1, AJ543847.1, AJ862872.1, CP003678.1; **C-xiii**: AJ417128.1, AJ543837.1, AJ543870.1, AJ543872.1, CAD66299.1, CAD66332.1, CAD66334.1, CAD99100.1, LVUF00000000, FYBB00000000, SJOO00000000, AEXB00000000, QZCT01000000, FYBA00000000; **C-XIV**: ERS2281247, ERS2281248, LXPT00000000.1, LZEN00000000, NSIZ00000000.1, SJON00000000.1; **UD1**: JDWG00000000.1, JDWH00000000.1, JUZJ00000000.1, JUZQ00000000; **UD2**: BBUQ00000000.1, CP021851.1, JZYX00000000.1, NPNR00000000; **UD3**: AZXZ00000000.1, FCNC00000000.1, JACW00000000.1, JWAU00000000; **UD4**: CP043318.1, JVIL00000000.1, JZKT00000000.1, LEDN00000000; **UD5**: AP019007.1; and **UD6**: MTKD00000000, QZCS00000000.

Supplementary Table 1 | Details of non-clinical samples: sampling date, location, type of environment, farm characteristics.

Supplementary Table 2 | Details of strains: *hsp60* partial sequence and results for antibiotic resistance. Resistance profiles were obtained against 16 antibiotics. Intermediate or resistant results are labeled "R"; "s" corresponds to a susceptible phenotype.

Supplementary Table 3 | Details of genetic content of sequenced *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (C-VI – clade A; $n = 42$) and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (C-VIII – clade B; $n = 86$).

Supplementary Table 4 | Cephalosporinase gene complex mutation. *Clone numbers refer to letters used in **Figures 1**, **2** and correspond to two strains from the same sample with different resistance profile against beta-lactam antibiotics: wild-type or cephalosporinase overproduction. Each strain is considered to be a clone that differs by < 45 single nucleotide polymorphisms (SNPs). na: not attributed. The abbreviation "N/S" after the gene names indicates the number of non-synonymous mutations (N) versus the number of synonymous mutations (S) in comparison to the reference data. Please note that only the different non-synonymous mutations between strains from the same sample have been conserved in the observation column.

REFERENCES

Akita, H., Matsushika, A., and Kimura, Z. (2019). *Enterobacter oligotrophica* sp. nov., a novel oligotroph isolated from leaf soil. *MicrobiologyOpen.* 8, 1–11. doi: 10.1002/mbo3.843

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., et al. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 46, D41–D47. doi: 10.1093/nar/gkx1094

Beyrouthy, R., Barets, M., Marion, E., Dananché, C., Dauwalder, O., Robin, F., et al. (2018). Novel *Enterobacter* lineage as leading cause of nosocomial outbreak involving carbapenemase-producing strains. *Emerg Infect Dis.* 24, 1505–1515. doi: 10.3201/eid2408.180151

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., et al. (2014). *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 58, 3895–3903. doi: 10.1128/AAC.02412-14

Chavda, K. D., Chen, L., Fouts, D. E., Sutton, G., Brinkac, L., Jenkins, S. G., et al. (2016). Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: New insights into phylogeny, population structure, and resistance mechanisms. *MBio.* 7, 1–16. doi: 10.1128/mBio.02093-16

Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., and Jin, Q. (2016). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis – 10 years on. *Nucleic Acids Res.* 44, 694–697. doi: 10.1093/nar/gkv1239

Criscuolo, A., and Brisse, S. (2014). AlienTrimmer removes adapter oligonucleotides with high sensitivity in short-insert paired-end reads. Commentary on Turner (2014) Assessment of insert sizes and adapter content in FASTQ data from NexteraXT libraries. *Front Genetics.* 5:130. doi: 10.3389/fgene.2014.00130

Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C., and Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 65, 490–495. doi: 10.1093/jac/dkp498

Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., and Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 32, 1–32. doi: 10.1128/CMR.00002-19

Didelot, X., and Wilson, D. J. (2015). ClonalFrameML: Efficient inference of recombination in whole bacterial genomes. *PLoS Comput Biol.* 11:e1004041. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004041

Doijad, S., Imirzalioglu, C., Yao, Y., Pati, N. B., Falgenhauer, L., Hain, T., et al. (2016). *Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66, 968–974. doi: 10.1099/ijsem.0.000821

Flury, B. B., Ellington, M. J., Hopkins, K. L., Turton, J. F., Doumith, M., Loy, R., et al. (2016). Association of novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in AmpD with cephalosporin resistance and phylogenetic variations in AmpC, AmpR, OmpF, and OmpC in *Enterobacter cloacae* isolates that are highly resistant to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 60, 2383–2390. doi: 10.1128/AAC.02835-15

Garinet, S., Fihman, V., Jacquier, H., Corvec, S., Le Monnier, A., Guillard, T., et al. (2018). Elective distribution of resistance to beta-lactams among *Enterobacter cloacae* genetic clusters. *J Infect.* 77, 178–182. doi: 10.1016/j.jinf.2018.05.005

Goldberg, D. W., Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Costa, D. G. C., Loureiro Bracarense, A. P., and Lincopan, N. (2019). Genetic background of CTX-M-15-producing *Enterobacter hormaechei* ST114 and *Citrobacter freundii* ST265 co-infecting a free-living green turtle (*Chelonia mydas*). *Zoonoses Public Health* 66, 1–6. doi: 10.1111/zph.12572

Gorrie, C. L., Mirceta, M., Wick, R. R., Judd, L. M., Wyres, K. L., Thomson, N. R., et al. (2018). Antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital. *Clin Infect Dis.* 67, 161–170. doi: 10.1093/cid/ciy027

Guérin, F., Isnard, C., Cattoir, V., and Giard, J. C. (2015). Complex regulation pathways of AmpC-mediated β-lactam resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 59, 7753–7761. doi: 10.1128/AAC.01729-15

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 29, 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086

Guyomard-Rabenirina, S. (2016). *Résistance aux antibiotiques des Entérobactéries en Guadeloupe: Importance en milieu communautaire et diffusion environnementale. Thesis.* Saint-Claude: Université des Antilles.

Guyomard-Rabenirina, S., Reynaud, Y., Pot, M., Albina, E., Couvin, D., Ducat, C., et al. (2020). Antimicrobial resistance in wildlife in Guadeloupe (French West Indies): Distribution of a single $bla_{CTX-M-1}$ IncI1/ST3 among humans and wild animals. *Front Microbiol.* 11:1524. doi: 10.3389/fmicb.2020.01524

Haenni, M., Saras, E., Ponsin, C., Dahmen, S., Petitjean, M., Hocquet, D., et al. (2016). High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. *J Antimicrob Chemother.* 71, 1497–1500. doi: 10.1093/jac/dkw006

Harada, K., Shimizu, T., Mukai, Y., Kuwajima, K., Sato, T., Kajino, A., et al. (2017). Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Enterobacter* spp. Isolates from companion animals in Japan. *PLoS One.* 12:e0174178. doi: 10.1371/journal.pone.0174178

Hoffmann, H., and Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol.* 69, 5306–5318. doi: 10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003

Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., et al. (2005). *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. *J Clin Microbiol.* 43, 3297–3303. doi: 10.1128/JCM.43.7.3297-3303.2005

Hölzel, C. S., Tetens, J. L., and Schwaiger, K. (2018). Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: A need for quantitative risk assessment. *Foodborne Pathogens Dis.* 15, 671–688. doi: 10.1089/fpd.2018.2501

Humann, J. L., Wildung, M., Cheng, C. H., Lee, T., Stewart, J. E., Drew, J. C., et al. (2011). Complete genome of the onion pathogen *Enterobacter cloacae* EcWSU1. *Stand Genomic Sci.* 5, 279–286. doi: 10.4056/sigs.2174950

Izdebski, R., Baraniak, A., Herda, M., Fiett, J., Bonten, M. J. M., Carmeli, Y., et al. (2015). MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother.* 70, 48–56. doi: 10.1093/jac/dku359

Jolley, K. A., Bray, J. E., and Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Res.* 3, 124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1

Kämpfer, P., Nienhüser, A., Packroff, G., Wernicke, F., Mehling, A., Nixdorf, K., et al. (2008). Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. *Int J Hyg Environ Health.* 211, 374–384. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.07.021

Khanna, N., Kumar Ghosh, A., Huntemann, M., Deshpande, S., Han, J., Chen, A., et al. (2013). Complete genome sequence of *Enterobacter* sp. IIT-BT 08?: A potential microbial strain for high rate hydrogen production. *Stand Genomic Sci.* 9, 359–369. doi: 10.4056/sigs.4348035

Kohlmann, R., Bähr, T., and Gatermann, S. G. (2018). Species-specific mutation rates for *ampC* derepression in *Enterobacter*ales with chromosomally encoded inducible AmpC β-lactamase. *J Antimicrobial Chemother.* 73, 1530–1536. doi: 10.1093/jac/dky084

Kohlmann, R., Bähr, T., and Gatermann, S. G. (2019). Effect of *ampC* derepression on cefepime MIC in *Enterobacter*ales with chromosomally encoded inducible AmpC β-lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 25, 1158. doi: 10.1016/j.cmi.2019.05.007

Kremer, A., and Hoffmann, H. (2012). Prevalences of the *Enterobacter cloacae* complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31, 2951–2955. doi: 10.1007/s10096-012-1646-2

Letunic, I., and Bork, P. (2019). Interactive tree of life (ITOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47, 256–259. doi: 10.1093/nar/gkz239

Liu, W. Y., Chung, K. M. K., Wong, C. F., Jiang, J. W., Hui, R. K. H., and Leung, F. C. C. (2012). Complete genome sequence of the endophytic *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain ENHKU01. *J Bacteriol.* 194, 5965. doi: 10.1128/JB.01394-12

Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M. P., Martinez de la Peña, C., Silva, J. L., and Luna-Guevara, M. L. (2019). The role of pathogenic *E. coli* in fresh vegetables: Behavior, contamination factors, and preventive measures. *Int J Microbiol.* 2019, 2894328. doi: 10.1155/2019/2894328

Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., et al. (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Appl Environ Microbiol.* 79, 5701–5709. doi: 10.1128/AEM.01682-13

Matteoli, F. P., Passarelli-Araujo, H., Pedrosa-Silva, F., and Olivares, F. L. (2019). Genomics population structure and pangenome analysis of *Enterobacter bugandensis* uncover the presence of $bla_{CTX-M-55}$, bla_{NDM-5} and bla_{IMI-1}, along with sophisticated iron acquisition strategies. *Genomics.* 112, 1–10. doi: 10.1016/j.ygeno.2019.07.003

Mizrahi, A., Delerue, T., Morel, H., Le Monnier, A., Carbonnelle, E., Pilmis, B., et al. (2020). Infections caused by naturally AmpC-producing *Enterobacteriaceae*: Can we use third-generation cephalosporins? A narrative review. *Int J Antimicrob Agents* 55, 105834. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.10.015

Paauw, A., Caspers, M. P. M., Schuren, F. H. J., Leverstein-van Hall, M. A., Delétoile, A., Montijn, R. C., et al. (2008). Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS One.* 3:e3108. doi: 10.1371/journal.pone.0003018

Paauw, A., Leverstein-van Hall, M. A., Van Kessel, K. P. M., Verhoef, J., and Fluit, A. C. (2009). Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS One.* 4:0008240. doi: 10.1371/journal.pone.0008240

Pati, N. B., Doijad, S. P., Schultze, T., Mannala, G. K., Yao, Y., Jaiswal, S., et al. (2018). *Enterobacter bugandensis*: A novel *enterobacter*ial species associated with severe clinical infection. *Sci Rep.* 8, 5392. doi: 10.1038/s41598-018-23069-z

Peirano, G., Matsumura, Y., Adams, M. D., Bradford, P., Motyl, M., Chen, L., et al. (2018). Genomic epidemiology of global carbapenemase-producing *Enterobacter* spp., 2008–2014. *Emerg Infect Dis.* 24, 2008–2014. doi: 10.3201/eid2406.171648

Pot, M., Guyomard-Rabenirina, S., Couvin, D., Ducat, C., Enouf, V., Ferdinand, S., et al. (2021). Dissemination of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex from a hospital to the nearby environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 lineage coding for a successful IncHI2/ST1 plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 65, 1–12. doi: 10.1128/AAC.02146-20

Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. No ESKAPE. *J Infect Dis.* 197, 1079–1081. doi: 10.1086/533452

Siebor, E., De Curraize, C., and Neuwirth, C. (2019). Identification of AGI1-A, a variant of *Acinetobacter* genomic island 1 (AGI1), in a French clinical isolate belonging to the *Enterobacter cloacae* complex. *J Antimicrobial Chemother.* 74, 311–314. doi: 10.1093/jac/dky442

Simão, A. F., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., and Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31, 3210–3212. doi: 10.1093/bioinformatics/btv351

Singh, B. R., Singh, V., Ebibeni, N., and Singh, R. K. (2013). Antimicrobial and herbal drug resistance in enteric bacteria isolated from faecal droppings of common house lizard/gecko (*Hemidactylus frenatus*). *Int J Microbiol.* 2013, 340848. doi: 10.1155/2013/340848

Singh, N. K., Bezdan, D., Checinska Sielaff, A., Wheeler, K., Mason, C. E., and Venkateswaran, K. (2018). Multi-drug resistant *Enterobacter bugandensis* species isolated from the international space station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains. *BMC Microbiol.* 18:175. doi: 10.1186/s12866-018-1325-2

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 30, 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033

Stock, I., Grüger, T., and Wiedemann, B. (2001). Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. *Int J Antimicrob Agents.* 18, 537–545. doi: 10.1016/S0924-8579(01)00463-0

Sutton, G. G., Brinkac, L. M., Clarke, T. H., and Fouts, D. E. (2018). *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. [version 2; referees: 2 approved]. *F1000Research.* 7, 521. doi: 10.12688/f1000research.14566.1

Uchida, A., Kim, H. L., Purbojati, R. W., Vettath, V. K., Gupta, A. B., Houghton, J. N. I., et al. (2020). Complete genome of *Enterobacter sichuanensis* strain SGAir0282 isolated from air in Singapore. *Gut Pathog.* 12, 12. doi: 10.1186/s13099-020-00350-z

van Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., and Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *Int J Food Microbiol.* 204, 1–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014

Wang, C., Wu, W., Wei, L., Feng, Y., Kang, M., Xie, Y., et al. (2020). *Enterobacter wuhouensis* sp. nov. and *Enterobacter quasihormaechei* sp. nov. recovered from human sputum. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70, 874–881. doi: 10.1099/ijsem.0.003837

World Health Organization. (2017). *News release. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.* Geneva: World Health Organization.

Wu, W., Feng, F., and Zong, Z. (2020). Precise species identification for *Enterobacter*: A genome sequence-based study with reporting of two novel

species, *Enterobacter quasiroggenkampii* sp. nov. and *Enterobacter quasimori* sp. nov. *MSystems.* 5, 1–16. doi: 10.1128/mSystems.00527-20

Wu, W., Wei, L., Feng, Y., Kang, M., and Zong, Z. (2019). *Enterobacter huaxiensis* sp. nov. and *Enterobacter chuandaensis* sp. nov., recovered from human blood. *Int J Syst Evol Microbiol.* 69, 708–714. doi: 10.1099/ijsem.0.003207

Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 67, 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261

Zhou, K., Yu, W., Cao, X., Shen, P., Lu, H., Luo, Q., et al. (2018). Characterization of the population structure, drug resistance mechanisms and plasmids of the community-associated *Enterobacter cloacae* complex in China. *J Antimicrob Chemother.* 73, 66–76. doi: 10.1093/jac/dkx361

Zhu, Y., Liu, W., Schwarz, S., Wang, C., Yang, Q., Luan, T., et al. (2020). Characterization of a bla_{NDM-1}-carrying IncHI5 plasmid from *Enterobacter cloacae* complex of food-producing animal origin. *J Antimicrobiol Chemother.* 75, 1–6. doi: 10.1093/jac/dkaa010

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Pot, Reynaud, Couvin, Ducat, Ferdinand, Gravey, Gruel, Guérin, Malpote, Breurec, Talarmin and Guyomard-Rabenirina. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

PARTIE II



Photo : Pot M.

<u>Projet ECHANGENE :</u> Appréciation de la dissémination de gènes d'antibiorésistance et des supports génétiques associés dans un contexte de pollution anthropique importante.



Image : https://www.i-cad.fr/uploads/one_health.jpeg

CHAPITRE 1

Prévalence et distribution des entérobactéries productrices de BLSE au sein des différents compartiments de l'étude ECHANGENE.



Ce premier chapitre présente de façon globale les différentes collections de souches BLSE obtenues à l'hôpital, dans les eaux usées et au sein du compartiment animal.

Le projet ECHANGENE a débuté par la sélection de souches d'entérobactéries productrices de BLSE au CHUG. Ces souches isolées de patients en cours d'hospitalisation ou initialement admis aux urgences, ainsi que leurs gènes de résistance étaient destinés à être suivies dans l'environnement. Les eaux usées seraient en effet un miroir des principaux germes qui circulent chez l'homme **(15)**.

I. Souches productrices de BLSE chez l'homme

A) Vision globale de la situation pendant la période d'étude

Pendant la période d'avril 2018 à août 2019 (17 mois), 382 bactéries multirésistantes ont été recensées dans des prélèvements infectieux d'origine nosocomiale (contrôle de gestion, CLIN). Les entérobactéries productrices de BLSE étaient majoritaires (86,4%), suivies par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM ; 13,1%). La production d'une carbapénémase ne concernait que 0,5% des entérobactéries recensées. L'établissement totalisait pour la période 207 393 journées d'hospitalisation (hors hospitalisation à domicile). Si l'on se concentre uniquement sur les entérobactéries productrices de BLSE à l'origine d'une infection « nosocomiale », un total de 330 souches a été isolé au laboratoire du CHUG sur la période. Ceci nous a permis d'estimer l'incidence des entérobactéries BLSE à 1,59/1 000 journées d'hospitalisation contre 0,24 pour les SARM (×6).

Ces 330 souches BLSE provenaient de 326 prélèvements issus de 304 patients différents. En moyenne, 18 prélèvements à visé bactériologique ont été enregistrés par mois. En ce qui concerne les indications relatives aux patients, 197 étaient de sexe masculin et 107 de sexe féminin (*sex-ratio* : 1,84). L'âge médian était de 65 ans (0 à 99 ans), et parmi ces derniers 1 était un nouveau-né (< 1 an). Les espèces productrices de BLSE les plus représentées étaient KPNC (n=218), ECC (n=72) et *E. coli* (n=27 ; **Figure 43**). Soit une incidence de KPNC BLSE de 1,05, contre 0,35 pour ECC et 0,13 pour *E. coli*. L'origine de ces souches était fréquemment associée au tractus urinaire (n=136 ; 41,2%), aux dispositifs intravasculaires (cathéter / redon / sonde ; n=68 ; 20,6%), ou à une bactériémie (n=62 ; 18,8% ; **Figure 44**). La majorité des prélèvements était considérée comme « non-invasifs » (n=227 ; 68,8%). Les souches provenaient principalement de patients hospitalisés dans des services associés aux soins critiques (n=155 ; 47,0%), suivis par les services de médecine (n=100 ; 30,3% ; **Figure 45**). Ces données étaient en corrélation avec les informations internes obtenues pour 2016 (S. Breurec, communication personnelle, 2016).

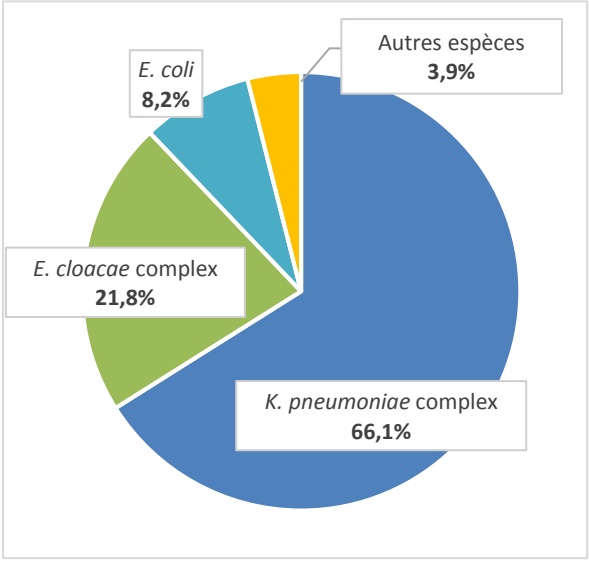


Figure 43. Prévalence globale des principales entérobactéries productrices de BLSE à l'origine d'infection nosocomiale à l'hôpital de Pointe-à-Pitre / les Abymes. Les données concernent la période d'avril 2018 à août 2019 (17 mois) après suppression des possibles doublons et des écologies ; le graphique regroupe 330 souches, soit 218 KPNC, 72 ECC et 27 *E. coli* ; la portion « autres espèces » correspond à : *Citrobacter freundii* (n=5), *C. koseri* (n=4), *K. aerogenes* (n=3) et *Proteus mirabilis* (n=1).

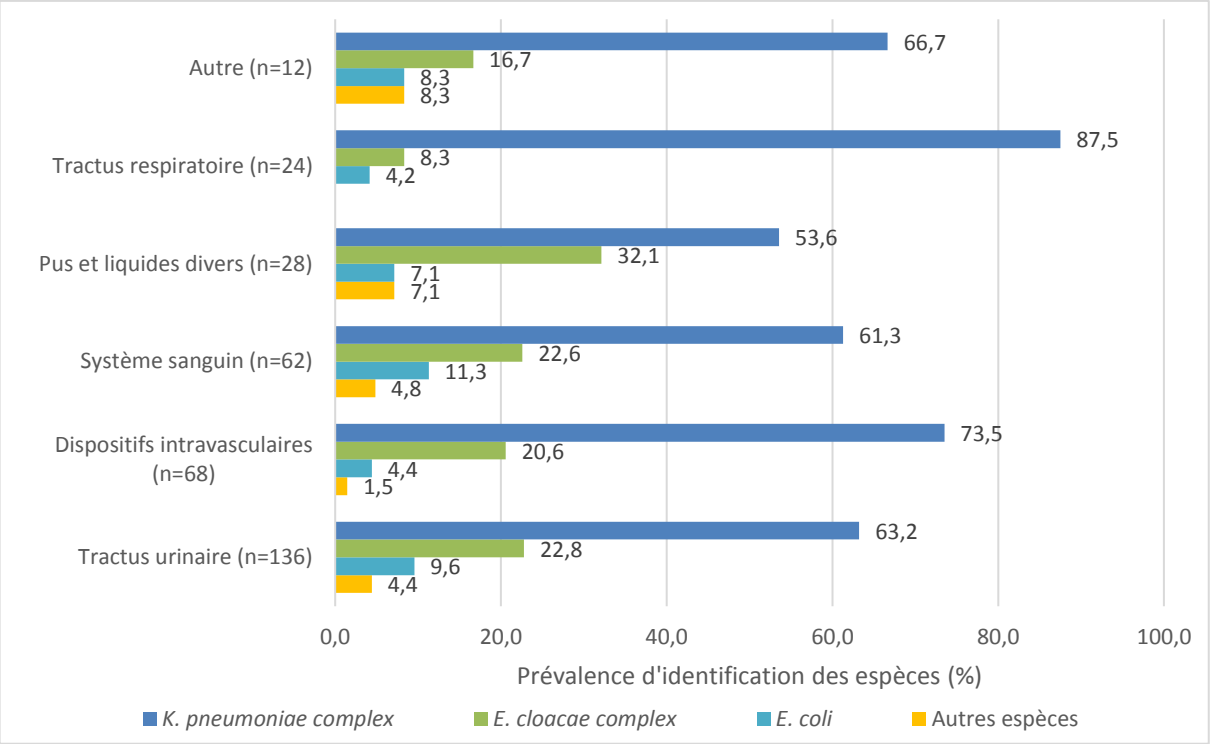


Figure 44. Prévalence globale des souches d'entérobactéries productrices de BLSE à l'origine d'une infection nosocomiale (n=330) selon le type de prélèvement associé entre avril 2018 et août 2019. Les prélèvements « autres » correspondent notamment à des pièces opératoires, des prélèvements d'os et des biopsies ; les aspirations bronchiques, expectorations, lavages broncho-alvéolaire et les prélèvements distaux protégés sont regroupés dans « tractus respiratoire » ; en plus des pus et abcès plus ou moins profonds, on retrouve dans le groupe « pus et liquides divers » les prélèvements de liquide céphalorachidien et péritonéal ; sont pris en compte dans le « système sanguin » seuls les hémocultures ; les cathéters, redons et sondes sont regroupés dans « dispositifs intravasculaires» ; pour le « tractus urinaire », en plus des urines on compte un prélèvement urétral.

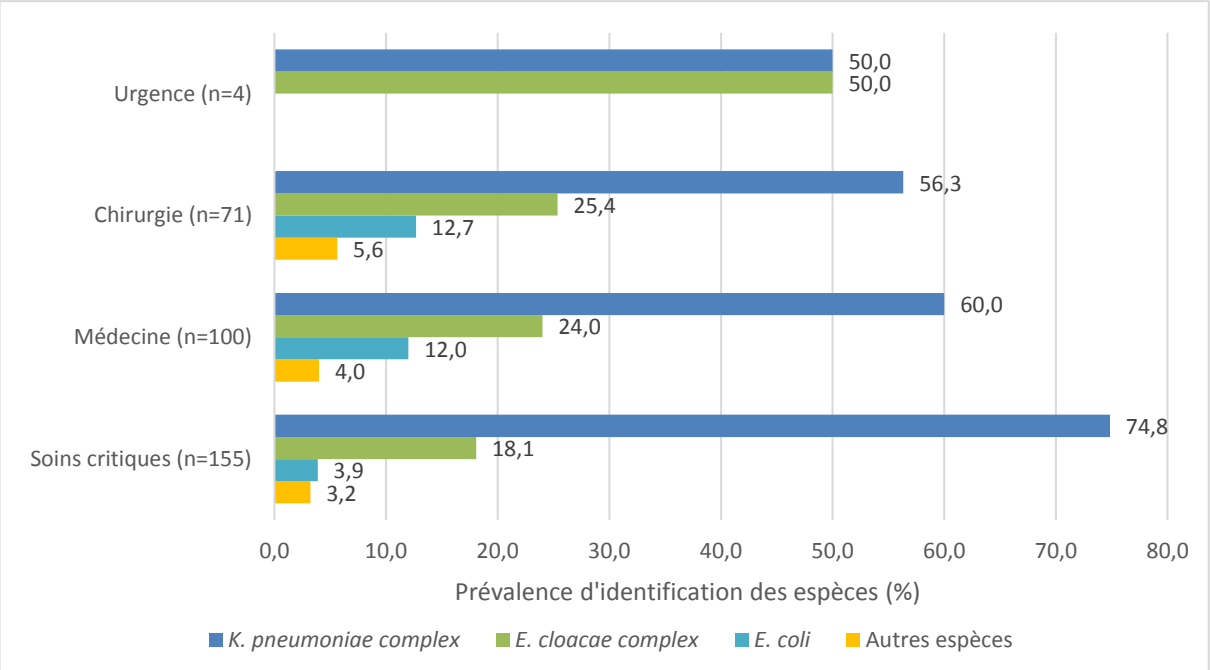


Figure 45. Prévalence globale des souches d'entérobactéries BLSE à l'origine d'une infection nosocomiale (n=330) selon le secteur d'activité entre avril 2018 et août 2019. Le service « urgence » correspond aux HTC post-urgences ; la chirurgie est représentée principalement par les services de chirurgie générale et d'urologie ; la médecine compte notamment les services associés à la néphrologie et à la gastro-entérologie ; les soins critiques sont représentés principalement par les

B) Collection ECHANGENE pour le compartiment humain

Pendant la période d'étude, il ne nous a pas été possible de collecter l'ensemble de ces bactéries d'origine humaine ; 243 souches d'entérobactéries BLSE ont cependant pu être incluses dans la collection ECHANGENE. Ces bactéries ont été isolées à partir de prélèvements infectieux et récupérées en collaboration avec le laboratoire de microbiologie. Au vu de la faible prévalence de souches d'*E. coli* à l'origine d'infection nosocomiale stricte (S. Breurec, communication personnelle, 2016 ; **Figure 43**), nous avons fait le choix d'inclure dans cette collection des souches caractérisées comme nosocomiales mais aussi des germes d'origine communautaire ou de patients initialement hospitalisés dans d'autre établissements de soins. Par ailleurs, aucune souche ne provenait de prélèvements à visée écologique. Cette collection restait cependant bien représentative des données globales présentées ci-dessus. En effet, les souches affiliées à KPNC résistantes étaient largement prédominantes (n=142 ; 58,2%), suivies par ECC (n=58 ; 23,8%), puis *E. coli* avec 43 isolats (17,6% ; **Figure 46**). Au total : 126 isolats ont été retrouvés dans les 2 collections. Les autres espèces BLSE n'ont pas été retenues en raison leur faible représentation dans les infections lors de la période d'étude (**Figure 43**). La collection ECHANGENE représentait environ 39,7% de la collection globale développée précédemment pour les germes analysés (126/317).

Ces souches BLSE ont notamment été collectées à partir d'échantillons d'urine ou du tractus urinaire (58,0%). C'était notamment le cas d'*E. coli* avec 72,1% (31/43) des isolats retrouvés dans ce type de prélèvement. Le second type d'échantillon correspondait aux bactériémies (14,4% ; **Figure 46**). Dans cette collection de souches, 8 patients ont fait l'objet de plusieurs prélèvements différents ou présentaient un échantillon poly-microbien. Pour le reste une seule souche par espèce et par patient a été conservée pour limiter le risque de doublon, soit un total de 234 patients (*sex-ratio* : 1,91 ; âge médian : 64 ans). Les prélèvements infectieux provenaient principalement de services associés aux soins critiques (32,5%), suivis par les services de médecine (28,0%) et de chirurgie (21,4%). Enfin, les prélèvements associés à des services d'urgence représentaient 18,1% de la collection ECHANGENE (**Figure 46**).

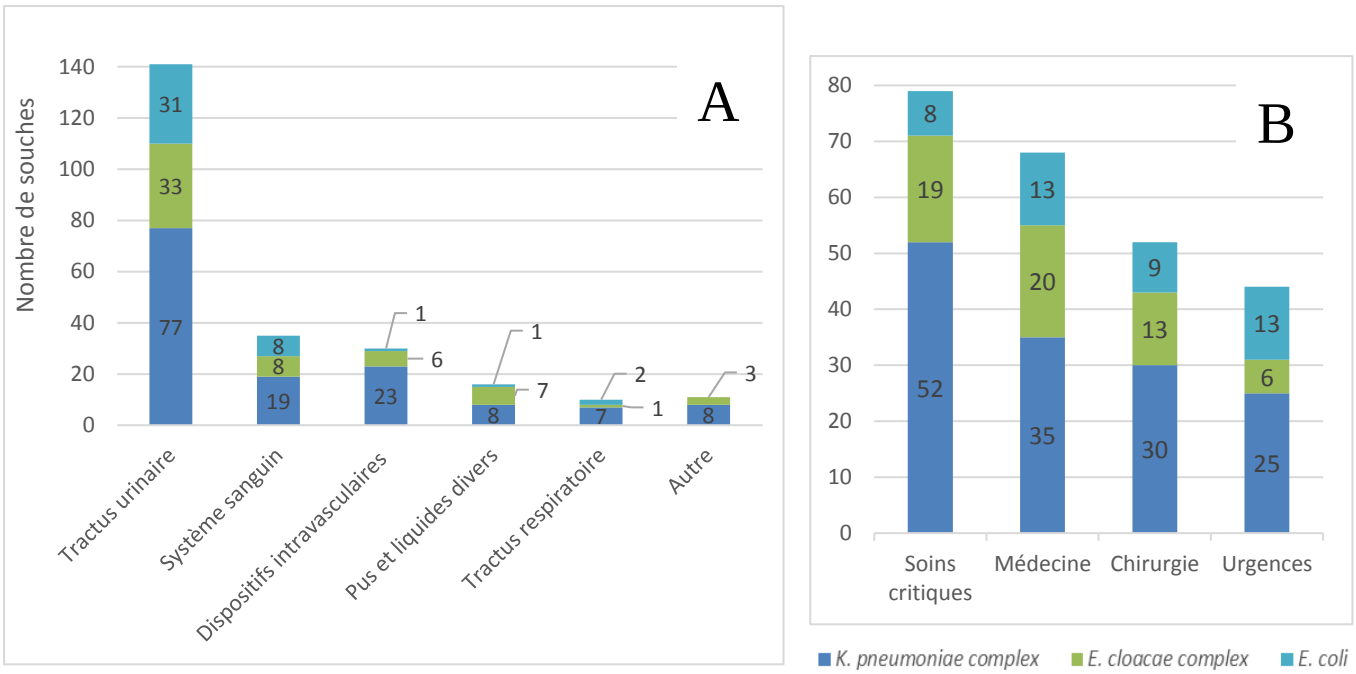


Figure 46. Distribution et origine des souches productrices de BLSE à l'origine d'infections chez l'homme de la collection ECHANGENE (n=243). La distribution et les regroupements reprennent la même logique que dans les **Figures 44 et 45**, avec en **A)** le nombre de souches par type de prélèvement et en **B)** les types de services associés à la demande d'analyse ; ces graphiques regroupent 142 KPNC, 58 ECC et 43 *E. coli* ; on trouve notamment en plus dans les services associés à la « médecine » le centre gérontologique, mais surtout dans les urgences les prélèvements de « tris accueil urgences » (38/42).

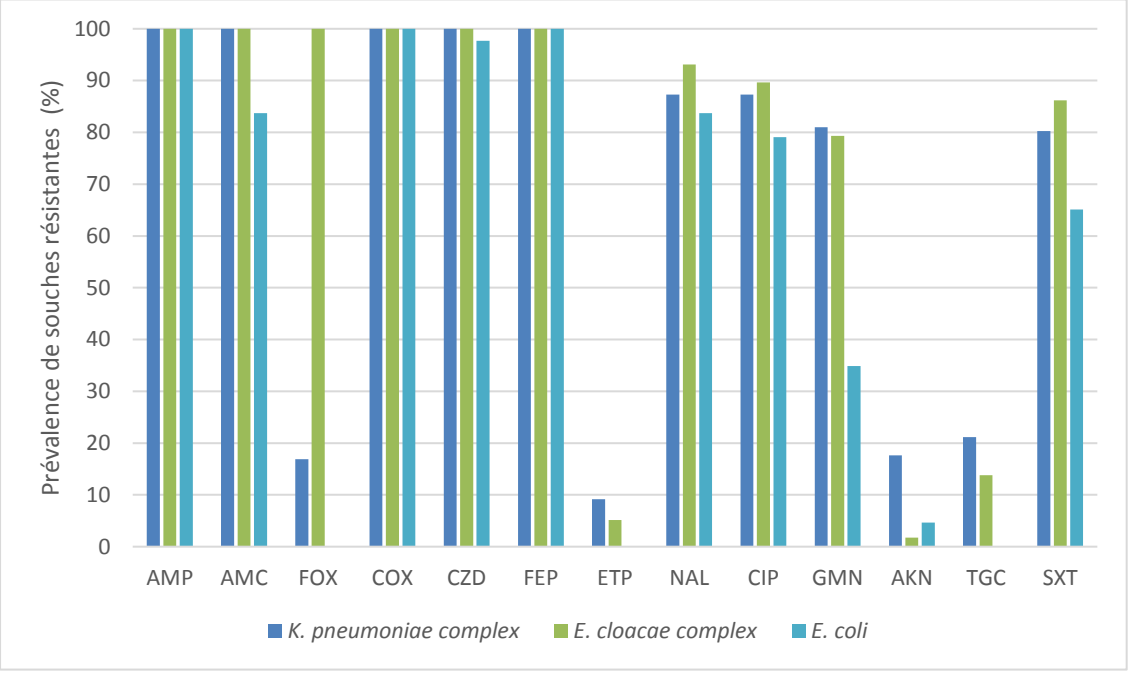


Figure 47. Prévalence de souches résistantes chez l'homme selon l'antibiotique considéré. Ce graphique regroupe 142 KPNC, 58 ECC et 43 *E. coli* ; AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, FOX : céfoxitine, COX : céfotaxime, CZD : ceftazidime, FEP : céfépime, ETP : ertapénème, NAL : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, GMN : gentamicine, AKN : amikacine, TGC : tigécycline (TGC selon les diamètres validés pour *E. coli*) et SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole.

Comme pour la méthode adoptée pour la mission de surveillance nationale Spare, le pourcentage de résistance à un antibiotique donné a été calculé en prenant en compte les souches « résistantes » et « intermédiaires » **(341)**. Les souches BLSE provenant de l'hôpital présentaient dans la majorité des cas une résistance associée aux quinolones et fluoroquinolones (NAL – CIP ; 210/243 ; 46,4%) ainsi qu'aux aminoglycosides dont la gentamicine (GMN ; n=176 ; 72,4%) et au triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT ; n=192 ; 79,0% ; **Figure 47**).

La résistance à la gentamicine était moins fréquente parmi les souches d'*E. coli* (34,9%) que parmi les souches de KPNC (81,0%) et d'ECC (79,3%). Aucun isolat de KPNC résistante (ou intermédiaire) à la céfoxitine ne présentait une enzyme de type céphalosporinase. Des analyses supplémentaires menées au laboratoire de l'hôpital n'ont pas mis en évidence de production de carbapénémase dans les 16 souches rendues « ETP-R ».

II. Présence des souches productrices de BLSE le long du continuum des eaux usées

Tous prélèvements confondus, les 10 campagnes de prospection des eaux usées nous ont permis de collecter 218 souches uniques productrices de BLSE. Ces entérobactéries ont été isolées sur l'ensemble du continuum que ce soit à la sortie du CHUG (Site A) mais aussi après traitement au sein de la station d'épuration, avant rejet au niveau de la baie du Petit-cul-de-sac marin (Site D). Cette collection de bactéries des eaux usées comprenait 82 souches d'*E. coli*, 63 souches d'ECC et 73 de KPNC reparties de façon homogène entre les sites (**Figure 48**). Au total la prévalence d'échantillons positifs pour ce compartiment était de 97,4% (38/39). En considérant les points de prélèvement, seul le point B (poste de refoulement) présentait un échantillon sans ces entérobactéries BLSE, en plus d'un prélèvement qui n'a pas pu être réalisé. Les autres échantillons sur les 3 sites étaient tous positifs à au moins une des espèces résistantes recherchées (**Tableau 5**). Cette observation a permis de souligner que la station n'élimine pas totalement les germes BLSE lors du processus de traitement. Cette prospection n'étant pas associée à une méthode de dénombrement, il nous était impossible d'apprécier la diminution des germes totaux entre l'entrée et la sortie du process de traitement.

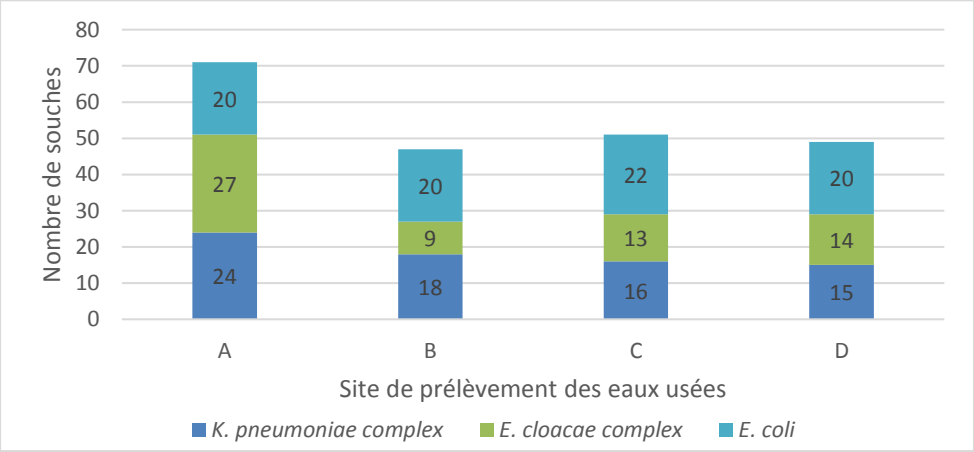


Figure 48. Distribution des souches productrices de BLSE isolées des eaux usées (n=218) selon l'espèce et le point de prélèvement considéré. A : effluents de l'hôpital, B : poste de refoulement de Bergevin, C : entrée de la station d'épuration de Pointe-à-donne, D : sortie de la station avant le point de rejet en mer.

En plus d'une résistance aux C3G induite par la production d'une BLSE, la plupart des souches isolées dans cet environnement aquatique présentaient des résistances associées à d'autres familles d'antibiotiques. De nouveau, pour faciliter le reste de l'étude, les souches qui présentaient un phénotype « intermédiaire » à une molécule ont été considérées comme « résistantes ». La **Figure 49** illustre ces différentes résistances selon le point de prélèvement considéré pour les eaux usées. La résistance aux fluoroquinolones a été soulignée pour plus de 73,4% des souches, toutes espèces et sites de prélèvement confondus (n=160). Par ailleurs, un plus fort taux de souches résistantes à la gentamicine a été retrouvé en sortie de l'hôpital (A : 73,2%) en comparaison des autres sites (B : 36,1% ; C : 51,0% ; D : 49,0%).

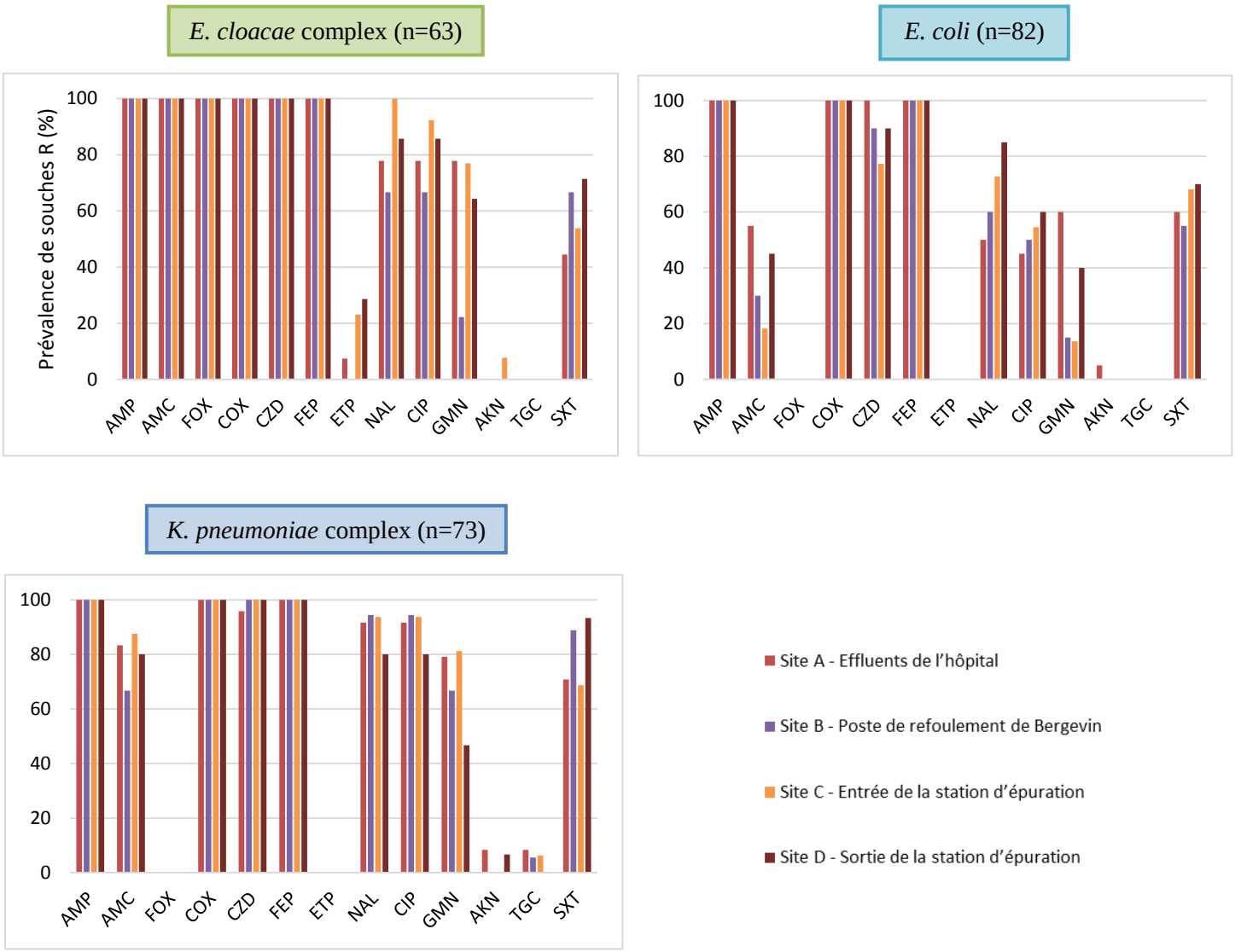


Figure 49. Prévalence de la résistance à différents antibiotiques parmi les souches BLSE isolées du compartiment des eaux usées selon le point de prélèvement. AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, FOX : céfoxitine, COX : céfotaxime, CZD : ceftazidime, FEP : céfépime, ETP : ertapénème, NAL : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, GMN : gentamicine, AKN : amikacine, SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole, TGC : tigécycline (TGC selon les diamètres validés pour *E. coli*).

III. Prévalence des entérobactéries productrices de BLSE au sein du compartiment animal.

Cette partie de l'étude regroupe l'ensemble des données obtenues pour les animaux vivant dans l'environnement de la STEP, aux alentours, et en amont dans les égouts, pour les 3 espèces bactériennes étudiées. Parmi les 119 animaux prélevés, au moins une souche productrice de BLSE a été isolée chez 78 individus, soit une prévalence de 65,5% (**Tableau 5**). Cette prévalence d'animaux porteurs de souches multirésistantes pourrait être sous-estimée car nous avons recherché seulement 3 espèces de bactérie.

Une prévalence plus importante a été retrouvée chez les animaux domestiques (71,9% ; 23/32) que les animaux sauvages pouvant avoir un contact avec les eaux usées au sein de la STEP ou en amont du continuum (63,2% ; 55/87). Cette différence n'était cependant pas statistiquement significative. Cette forte prévalence au sein des animaux domestiques était aussi variable selon l'espèce animale et le germe considéré. En effet parmi les 32 animaux domestiques prélevés seul 1 présentait une souche de KPNC BLSE (oie, souche isolée en 2018). La prévalence d'*Enterobacter* était plus importante chez les poules, tandis que l'espèce *E. coli* a été préférentiellement retrouvée chez les cochons (**Tableau 5**). Cette variation entre les animaux pourrait s'expliquer par leur proximité et une possible circulation de clones au sein de chaque enclos. En ce qui concerne les animaux sauvages, le taux de portage de souches BLSE était plus important pour les crapauds (84,2%) et les cafards (79,3%). Ces animaux étaient en contact direct avec les eaux usées contrairement aux *Anolis* par exemple. Enfin, parmi les animaux positifs, la prévalence d'individus présentant plusieurs espèces d'entérobactéries avec BLSE (2 ou 3) était significativement supérieure au sein de la faune sauvage (72,7% ; 40/55) en comparaison des animaux domestiques (13,0% ; 3/23 ; p=2,3×10^{-6} ; **Figure 50**). Une médiane de 2 espèces d'*Enterobacteriaceae* a été soulignée chez les cafards, les crapauds et les merles.

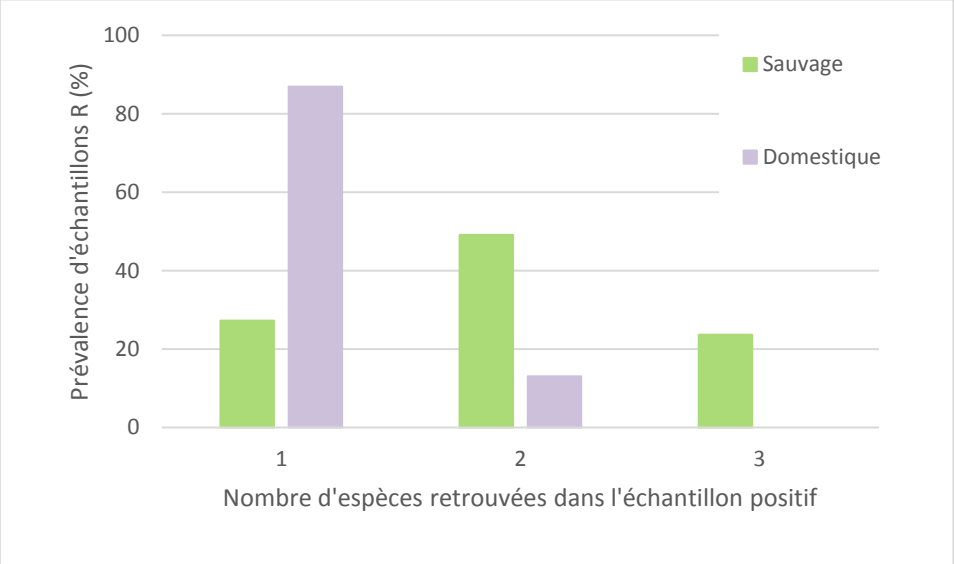


Figure 50. Prévalence d'animaux présentant 1, 2 ou 3 espèce(s) d'entérobactérie productrice de BLSE. Ce graphique inclus 23 animaux sauvages et 55 animaux domestiques ; les espèces prises en compte sont : KPNC, ECC et *E. coli*.

Au total, en supprimant les possibles doublons (même prélèvement, même espèce, même antibiotype), 194 souches BLSE ont été isolées lors des prospections au sein du compartiment animal, avec 78 KPNC, 76 *E. coli* et 40 ECC. La majeure partie de ces isolats provenait de la faune sauvage avec 165 souches contre 29 pour les animaux domestiques. Une résistance associée aux quinolones / fluoroquinolones a été soulignée pour l'ensemble des isolats d'animaux domestiques contre 77,0% de la faune sauvage (n=127). Parmi les souches d'*E. coli*, celles isolées chez les animaux sauvages présentaient moins de résistances associées. C'était le cas pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole (100% d'animaux domestiques contre 36,2% de la faune sauvage) et la gentamicine (83,3% contre 12,1% ; **Figure 51**).

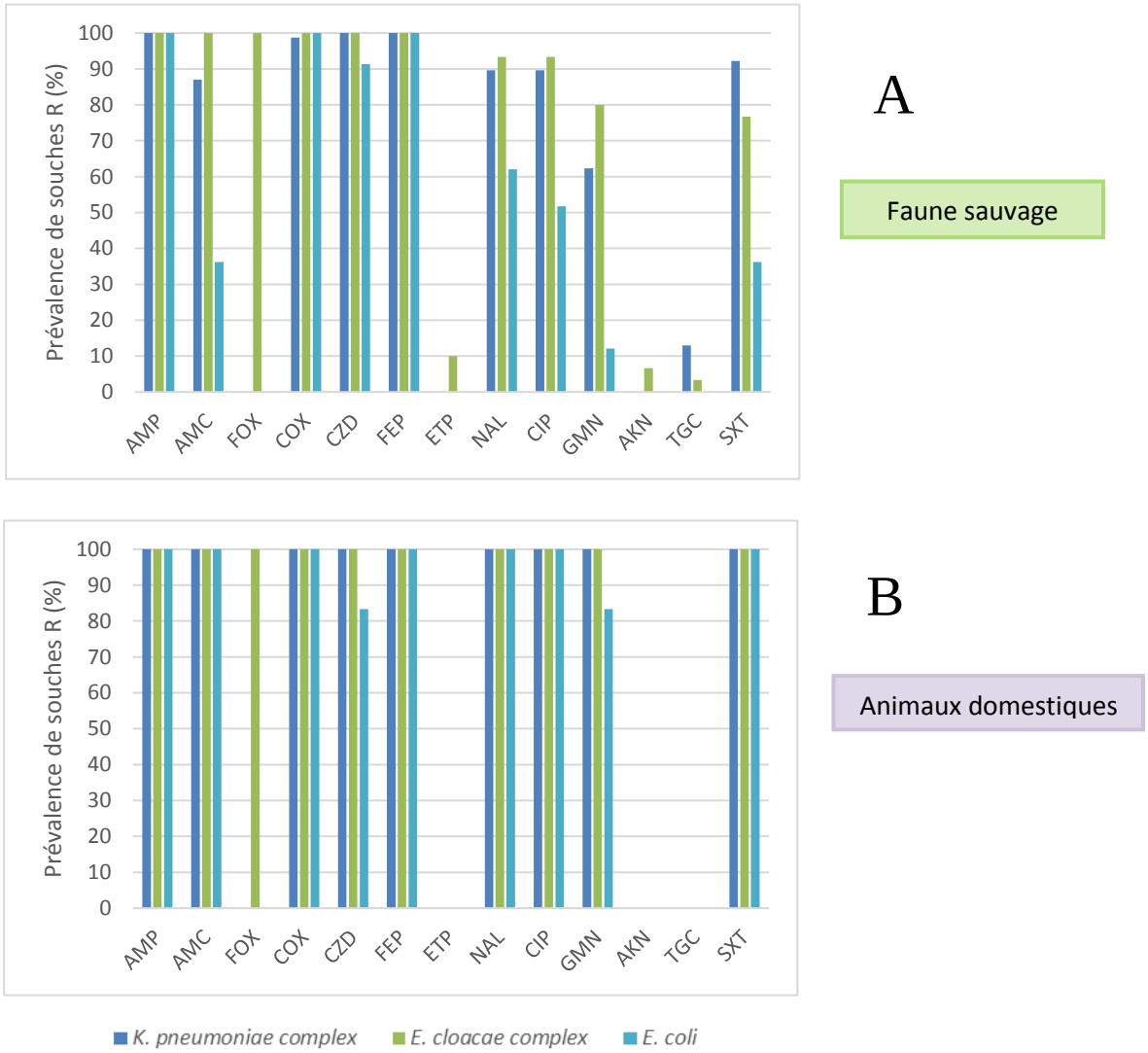


Figure 51. Prévalence de la résistance à différents antibiotiques parmi les souches BLSE isolées du compartiment animal. La collection a été scindée en 2 avec en **A)** la faune sauvage (n=165), et en **B)** les animaux domestiques (n=29) ; AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, FOX : céfoxitine, COX : céfotaxime, CZD : ceftazidime, FEP : céfépime, ETP : ertapénème, NAL : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, GMN : gentamicine, AKN : amikacine, TGC : tigécycline (TGC selon les diamètres validés pour *E. coli*) et SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole.

IV. Circulation de résistances en lien avec les BLSE le long du continuum des eaux usées

En dehors de la résistance naturelle à la céfoxitine chez ECC, les profils de résistance associés à une production de BLSE ont indiqué la présence d'autres gènes de résistance associés aux fluoroquinolones (CIP), à la gentamicine (GMN) et au triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT). Ce profil a été identifié chez les 3 germes analysés pour 41,2% des souches animales (80/194), 28,4% des souches isolées des eaux usées (62/218), et 33,7% des souches humaines (82/243 ; **Tableau 6**). Même si nous étions limités à 13 molécules antibiotiques, cette première observation phénotypique suggérait que de possibles gènes de résistance et plasmides semblables circulaient entre ces compartiments et bactéries. Par ailleurs, contrairement au compartiment « faune sauvage », la faible diversité des antibiotypes soulignée au sein des animaux domestiques suggérait, une circulation de mêmes clones probablement associés à la station. En effet 26/29 (89,7%) était « NAL-R ; CIP-R ; GMN-R et SXT-R » (**Tableau 6**). D'autres combinaisons de résistances ont été soulignées entre ces compartiments et ont été la base de la sélection des souches pour le séquençage complet.

Tableau 5. Détails des échantillonnages non-humains et prévalence des souches productrices de *β*-lactamase à spectre étendu (BLSE). Les animaux domestiques sont indiqués en mauve tandis que les animaux sauvages sont spécifiés par un carré vert ; la localisation des sites de prélèvement des eaux usées est spécifiée sur la **Figure 41** ; KPNC : *K. pneumoniae* complex, ECC : *E. cloacae* complex ; la colonne « Total des échantillons BLSE+ » indique le nombre d'échantillons avec au moins une des 3 espèces recherchées.

Point d'échantillonnage - Classe	**Détails**	**Nombre d'échantillons**	**Total des échantillons BLSE +**	**Détails selon le germe considéré**		
				***E. coli* BLSE +**	**KPNC BLSE +**	**ECC BLSE +**
		(N=158)	***N (%)***	***N (%)***	***N (%)***	***N (%)***
Site A	Effluents de l'hôpital	10	10 (100,0)	10 (100,0)	10 (100,0)	10 (100,0)
Site B	Poste de refoulement	9	8 (88,9)	8 (88,9)	7 (77,8)	6 (66,7)
Site C	Entrée de station d'épuration	10	10 (100,0)	10 (100,0)	8 (80,0)	7 (70,0)
Site D	Sortie de station d'épuration	10	10 (100,0)	10 (100,0)	8 (80,0)	6 (60,0)
	Total	**39**	**38 (97,4)**	**38 (97,4)**	**33 (84,6)**	**29 (74,4)**
Insecte	Cafard (*Periplaneta americana*)	29	23 (79,3)	20 (69,0)	23 (79,3)	11 (37,9)
Reptile	Anoles (*Anolis marmoratus speciosus*)	20	4 (20,0)	1 (5,0)	2 (10,0)	1 (5,0)
Amphibien	Crapaud buffle (*Rhinella marina*)	19	16 (84,2)	12 (63,2)	14 (73,7)	5 (26,3)
	Poule	11	10 (90,9)	3 (27,3)		8 (72,7)
Oiseau	Quiscale merle (*Quiscalus lugubris*)	11	7 (63,6)	4 (36,4)	6 (54,5)	1 (9,1)
	Oie	2	2 (100,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)
	Cochon	10	8 (80,0)	8 (80,0)		1 (10,0)
Mammifère	Rat (*Rattus rattus*)	8	5 (62,5)	4 (50,0)	2 (25,0)	1 (12,5)
	Chien	6	3 (50,0)	3 (50,0)		
	Vache	3				
	Total	**119**	**78 (65,5)**	**56 (47,1)**	**48 (40,3)**	**29 (24,4)**

Tableau 6. Détails des principaux antibiotypes partagés entre les compartiments. Seuls les phénotypes de résistance retrouvés chez l'homme dans les eaux usées et le compartiment animal sont représentés pour chacune des espèces ; les animaux domestiques et la faune sauvage ont été séparés car évoluant dans un biotope différent ; les tableaux **A)**, **B)** et **C)** cumulent au total 455 souches sur les 655 isolées dans ces compartiments (69,5%) ; [a] afin d'avoir une vision globale le pourcentage pour le nombre de souches associées se réfère au nombre total d'isolats selon l'espèce ; [b] le numérateur correspond au nombre de souches avec un des antibiotypes sélectionnés, et le dénominateur indique le nombre total de souches pour le compartiment considéré pour chacune des espèces ; la résistance à un antibiotique est représentée en rouge et la sensibilité en vert ; AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, FOX : céfoxitine COX : céfotaxime, CZD : ceftazidime, FEP : céfépime, ETP : ertapénème, NAL : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, GMN : gentamicine, AKN : amikacine, TGC : tigéclycine, SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole.

A) *E. cloacae* complex (121/161 ; 75,2%)

Nombre de souches associées *N (%)*[a]	**Distribution par compartiment**				**Détails des antibiogrammes partagés**											
	Homme 43/58[b]	**Eaux usées 42/63**	**Faune sauvage 26/30**	**Animaux domestiques 10/10**	**AMP**	**AMC**	**FOX**	**COX**	**CZD**	**FEP**	**ETP**	**NAL**	**CIP**	**GMN**	**AKN**	**TGC**	**SXT**
76 (47,2%)	33	19	14	10													
20 (12,4%)	2	13	5														
17 (10,6%)	6	7	4														
4 (2,5%)	1	2	1														
4 (2,5%)	1	1	2														

Suite à la page 169

Suite du **Tableau 6**

B) *E. coli* (125/201 ; 62,2%)

Nombre de souches associées N (%)[a]	Distribution par compartiment				Détails des antibiogrammes partagés											
	Homme 32/43[b]	Eaux usées 35/82	Faune sauvage 43/58	Animaux domestiques 15/18	AMP	AMC	FOX	COX	CZD	FEP	ETP	NAL	CIP	GMN	AKN	TGC	SXT
39 (19,4%)	9	8	7	15													
30 (14,9%)	2	10	18														
21 (10,4%)	3	11	7														
14 (7%)	9	2	3														
13 (6,5%)	7	1	5														
5 (2,5%)	1	2	2														
3 (1,5%)	1	1	1														

C) *K. pneumoniae* complex (209/293 ; 71,3%)

Nombre de souches associées N (%)[a]	Distribution par compartiment				Détails des antibiogrammes partagés											
	Homme 87/142[b]	Eaux usées 55/73	Faune sauvage 66/77	Animal domestique 1/1	AMP	AMC	FOX	COX	CZD	FEP	ETP	NAL	CIP	GMN	AKN	TGC	SXT
109 (37,2%)	40	35	33	1													
34 (11,6%)	12	6	16														
19 (6,5%)	8	2	9														
18 (6,1%)	11	5	2														
10 (3,4%)	5	2	3														
10 (3,4%)	7	2	1														
5 (1,7%)	3	1	1														
4 (1,3%)	1	2	1														

Points clés sur les résultats de prévalence d'entérobactéries productrices de BLSE chez l'homme en Guadeloupe et le long du continuum des eaux usées.

- ✓ Le secteur hospitalier constitue un réservoir important de souches d'*Enterobacteriaceae* productrices de BLSE en Guadeloupe, et notamment de KPNC.

- ✓ Le rôle des eaux usées dans la circulation de germes multirésistants avec des phénotypes semblables à ceux analysés en clinique a bien été défini et pose une future problématique environnementale.

- ✓ Les animaux sauvages vivant près de ce continuum présentaient une forte prévalence de souches multirésistantes (63,2%). Cette observation témoigne d'une possible contamination directement associée à l'environnement (uniquement vérifiable par une approche de séquençage).

- ✓ Cette possible diffusion était aussi appréciable avec les antibiotypes similaires obtenus entre les compartiments analysés. Nous avons aussi constaté que cette résistance (clones et/ou plasmides) pouvait s'étendre aux animaux domestiques vivant à proximité de la STEP mais n'ayant aucun contact direct avec le process de traitement et les déchets associés.

CHAPITRE 2

Signatures chromosomiques / plasmidiques et patterns de gènes de résistance chez les entérobactéries productrices de BLSE.

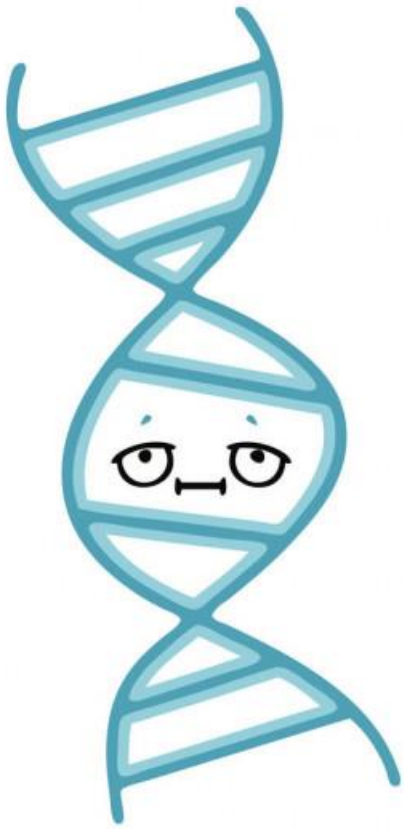


Image : https://fr.depositphotos.com/

Ce deuxième chapitre porte sur les différents gènes de résistance et les éléments génétiques mobiles retrouvés dans la collection de souches BLSE séquencées du projet ECHANGENE

Afin d'affiner l'analyse des bactéries résistantes qui circulaient dans les différents compartiments, nous avons procédé au séquençage complet d'une partie de la collection. Les 270 souches séquencées provenaient principalement du compartiment humain (n=115 ; 42,6%) suivi des eaux usées aux différents points de prélèvements (n=78 ; 28,9%), des animaux sauvages (n=59 ; 21,9%), et domestiques (n=18 ; 6,7%). Tous ces assemblages présentaient une moyenne du score BUSCO de 99,47% pour *E. coli*, 98,7% *pour ECC* et 98,18% pour KPNC (*single copy completness*) **(388)**. La sortie QUAST a indiqué une moyenne de N50 de 130 006 pour un minimum de 30 096 et un maximum de 397 874 **(387)**. La sélection de ces souches découlait principalement des antibiotypes communs retrouvés entre les compartiments (**Tableau 7**).

Tableau 7. Détails des souches productrices de BLSE séquencées dans la collection ECHANGENE. [a] la prévalence indiquée réfère au nombre de souches isolées pour l'espèce considérée ; [b] la prévalence réfère au nombre de souches isolées par compartiment.

Compartiment	**Nombre de souches séquencées**			
	E. cloacae* complex *(N=161)	***E. coli* *(N=201)***	***K. pneumoniae* complex *(N=293)***	**Total *N (%)*[b]**
Homme *(N=243)*	58	41	16	115 (47,3)
Eaux usées *(N=218)*	7	51	20	78 (35,8)
Faune sauvage *(N=165)*	6	32	21	59 (35,8)
Animaux domestiques *(N=29)*	4	13	1	18 (62,1)
Total *N (%)*[a]	75 (46,6)	137 (68,2)	58 (19,8)	270 (41,2)

I. Diversité des populations bactériennes et distribution entre les compartiments.

Cette partie a permis d'avoir un premier aperçu de la diversité retrouvée au sein des souches séquencées en se fondant uniquement sur les ST. Au total et toutes espèces confondues, 92 ST ont été recensés dont 53,3% étaient associés à l'espèce *E. coli* (**Tableau 8**). Le *ratio* nombre de ST sur nombre de souches séquencées pour cette espèce était de 0,36 contre 0,34 et 0,31 pour KPNC et ECC. Le diagramme de Venn ci-dessous a confirmé la circulation d'un faible de nombre de lignées chez les animaux domestiques comme observé pour les antibiotypes (**Tableau 8**, **Figure 52**). En effet parmi les 18 souches provenant de ces animaux, seuls 4 ST ont été recensés dont 2 étaient spécifiques à ce compartiment. La faune sauvage présentait une plus grande diversité avec 35 ST différents, dont 8 ST communs avec les souches humaines. Ces lignées étaient majoritairement associées à KPNC (n=5). Enfin, un seul ST était présent au sein des 4 groupes de l'étude (ECC ST114 ; **Figure 52**).

Tableau 8. Nombre de séquences types par espèce et par compartiments. Les séquences types (ST) ont été identifiées selon les différents schémas spécifiques pour chaque genre avec les logiciels suivants : mlst + PubMLST database (*Enterobacter* ; *E. coli* – schéma MLST Warwick), Kleborate + BIGSdb (*Klebsiella*).

Compartiment	Nombre de ST spécifiques par espèce			
	***E. cloacae* complex**	***E. coli***	***K. pneumoniae* complex**	**Total**
	(N=23)	***(N=49)***	***(N=20)***	***(N=92)***
Homme	21	21	7	49
Eaux usées	3	23	10	36
Faune sauvage	3	19	13	35
Animaux domestiques	1	2	1	4

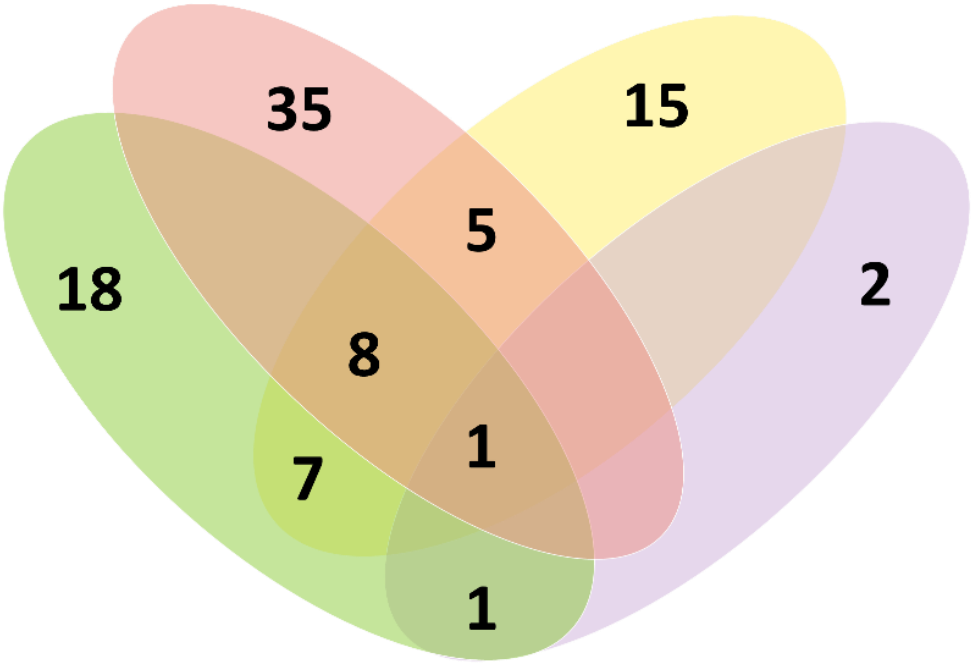


Figure 52. Distribution des séquences types de l'ensemble des souches séquencées selon les compartiments. Au total 92 ST différents ont été recensés indépendamment de l'espèce. Les cercles de couleur correspondent aux différentes origines : homme en rouge, eaux usées en jaune, animaux sauvages en vert et animaux domestiques en mauve.

II. Distribution des gènes de résistance aux antibiotiques

A) Variations entre les compartiments

De façon générale, toutes les souches productrices de BLSE séquencées lors de ce projet présentaient au minimum 2 gènes de résistance aux antibiotiques (**Figure 53 ; Tableau 6**). Ce nombre minimum de gènes a été retrouvé pour des souches d'*E. coli* (n=10) isolées chez l'homme, dans les eaux usées et au sein de la faune sauvage. Au vu du faible nombre de souches séquencées chez les animaux domestiques (n=18), ces derniers ont été regroupés avec la faune sauvage pour la suite de cette analyse. Une grande variation du nombre de gènes de résistance par souche a été observée, avec un maximum de 21 gènes pour des isolats d'*Enterobacter* (n=4). Une médiane de 14 gènes a été soulignée pour les souches humaines, contre 10 pour celles des effluents et 13 pour celles des animaux. En raison d'un possible portage de ces gènes en lien avec des intégrons, nous avons effectué une analyse BLASTn d'un gène *intI*1 typique (issue du plasmide R388 ; BR000038 ; 1 014 pb) **(251)**. Cette analyse a permis de mettre en évidence que 65,6% (n=177) des souches présentaient clairement ce gène (≥ 99% d'identité nucléotidique, ≥ 99% de couverture). Cette structure a été identifiée dans tous les compartiments analysés que ce soit chez l'homme (70,4%), dans les eaux usées (51,8%) ou chez les animaux (72,7%). Une plus petite médiane dans le nombre de gènes de résistance par souche au sein des eaux usées pourrait être associée à la plus faible prévalence d'isolats avec un intégron de classe 1. Moins de la moitié des souches d'*E. coli* avaient un gène *intI*1 semblable (61/137), contre 94,4% des souches de KPNC et 84,0% des ECC.

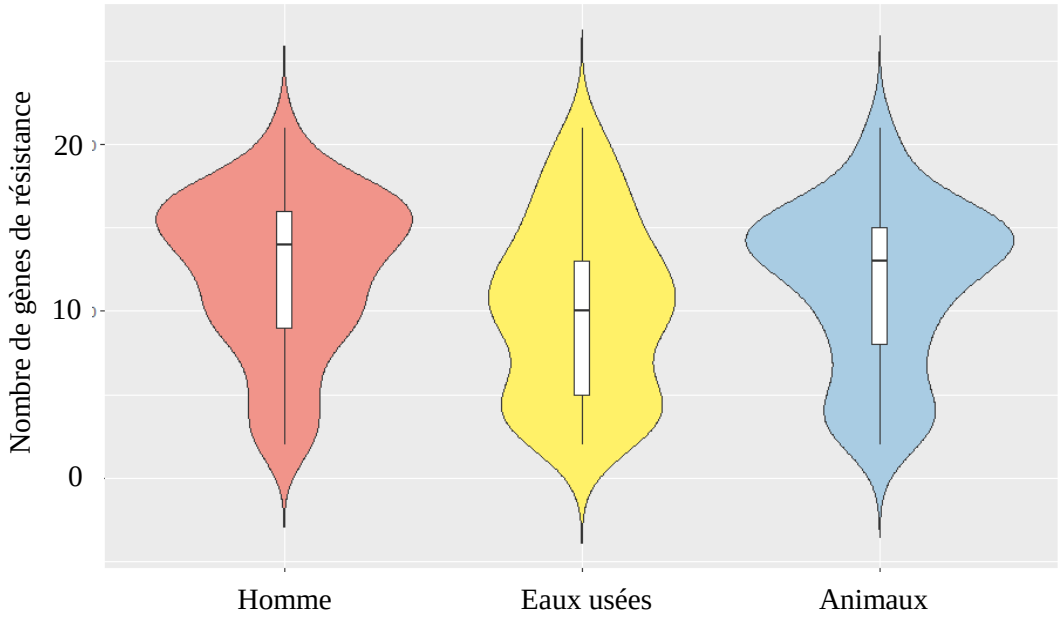


Figure 53. Nombre de gènes de résistance aux antibiotiques par souche et par compartiment. Les violin-plots ont été construits *via* la sortie brute de ResFinder (identité nucléotidique ajustée ≥ 75% couverture ≥ 95%) pour l'ensemble des espèces séquencées soit 115 souches chez l'homme, 78 des eaux usées, 77 chez les animaux sauvages et domestiques (**Tableau 7**) ; les box-plots associés combinent la valeur médiane de gènes de résistance pour les souches d'un compartiment et les quartiles (RStudio, ggplot package).

B) Focus sur les gènes associés aux profils BLSE.

La grande majorité des gènes codant pour une BLSE appartenaient à la famille des CTX-M quel que soit le compartiment analysé (267/270). Par ailleurs, des gènes de type SHV-106 (n=15), TEM-52 (n=1) et GES-7 (n=2) ont aussi été retrouvés. En ce qui concerne les gènes CTX-M, les plus répandus appartenaient au groupe 1 (240/267), avec une large prédominance de CTX-M-15 (n=232). Parmi les espèces étudiées, la diversité des gènes codant pour une BLSE était plus importante pour l'espèce *E. coli*. Ainsi le second groupe de CTX-M (n°9) a uniquement été identifié chez cette espèce (27/267). Seuls les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ et *bla*$_{\text{GES-7}}$ ont été identifiés chez ECC, tandis que KPNC présentait *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ et *bla*$_{\text{SHV-106}}$ (**Figure 54**). Cette diversité de gènes codant pour une BLSE chez *E. coli* était plus importante pour les souches non-cliniques. En effet 7 sous-types ont été identifiés pour les souches isolées dans les échantillons d'eaux usées et d'animaux contre 5 chez l'homme. La faible diversité en matière de gènes codant pour cette enzyme pour les autres genres pourrait aussi être due au nombre d'isolats séquencés.

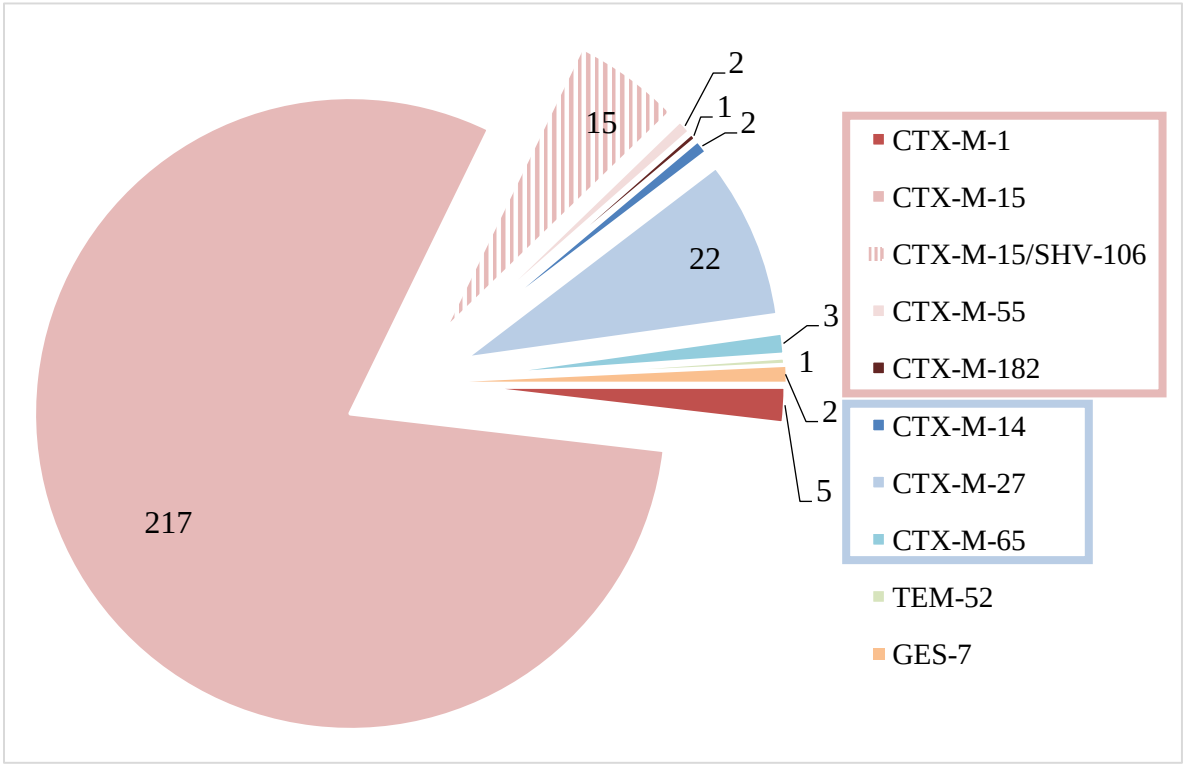


Figure 54. Distribution des types de BLSE parmi la collection ENCHANGENE (n=270). Cette figure inclue l'ensemble des souches BLSE séquencées, cliniques ou non-cliniques, soit 75 *Enterobacter*, 58 *Klebsiella* et 137 *Escherichia* ; l'encadrement en rouge correspond aux CTX-M du groupe 1 tandis que le groupe 9 est associé à la couleur bleue ; 15 souches de *Klebsiella* présentaient à la fois un gène de type *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ et un gène *bla*$_{\text{SHV-106}}$ (hachuré).

C) Localisation prédictive des contigs portant les gènes codant pour une BLSE chez E. coli et K. pneumoniae complex.

La prédiction de la localisation du gène codant pour la BLSE a été effectuée avec les 4 logiciels comme décrit dans la partie **Matériel et méthode** sur l'ensemble des séquences d'*E. coli* et de KPNC. L' article du **Chapitre 4** concentre les données pour ECC avec une approche limitée à 3 logiciels puisqu'il n'existe pas actuellement de base de données spécifiques pour ce genre sur mlplasmids **(297,298)**. Pour *E. coli*, 28 isolats n'ont pas été clairement définis (20,4%), 43 isolats présentaient la même prédiction au-dessus des seuils fixés pour 3 des 4 logiciels et 66 pour l'ensemble des logiciels (**Figures 55 et 65**). Les contigs analysés avaient une taille comprise entre 1 282 et 377 968 pb. Cette taille était supérieure au seuil minimum de 1 000 pb conseillé pour les logiciels mlplasmids et PlasFlow (**Tableau 3**). En effet, plus le contig est petit plus il est difficile de prédire correctement sa nature (absence de marqueur et séquences répétées) **(297,298)**. Seuls 6 isolats (10,3%) chez KPNC n'ont pas pu être définis en ce qui concerne la CTX-M, 1 souche présentait la même localisation pour ce gène pour 3 des 4 logiciels, et 51 pour l'ensemble (**Figures 71**). Concernant le gène *bla*$_{\text{SHV-106}}$, la localisation a été clairement définie dans les 15 cas. Les contigs analysés pour cette seconde espèce avaient une taille comprise entre 1 469 et 496 843bp.

La localisation du gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ des KPNC était uniquement plasmidique (52/52 définis), tandis que les gènes *bla*$_{\text{SHV-106}}$ étaient tous chromosomiques (15/15 définis). Chez *E. coli* 36,7% des gènes ont été prédits sur le chromosome (40/109 définis) et notamment le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (**Figure 55**). Cette localisation chromosomique était associée à des ST et lignées spécifiques comme ST3580 (9/40), ST38 (n=8) et ST131 (n=6 ; **Figure 65**). Les isolats portant la BLSE sur le chromosome provenaient des eaux usées (17/40), suivies des animaux (n=15) et de l'homme (n=8). La localisation des gènes de type *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ n'a pas été concluante avec cette approche. En effet seuls 2 sur les 20 contigs portant ce gène présentaient une localisation considérée comme « fiable » (tailles comprises entre 1 282 et 14 656 pb).

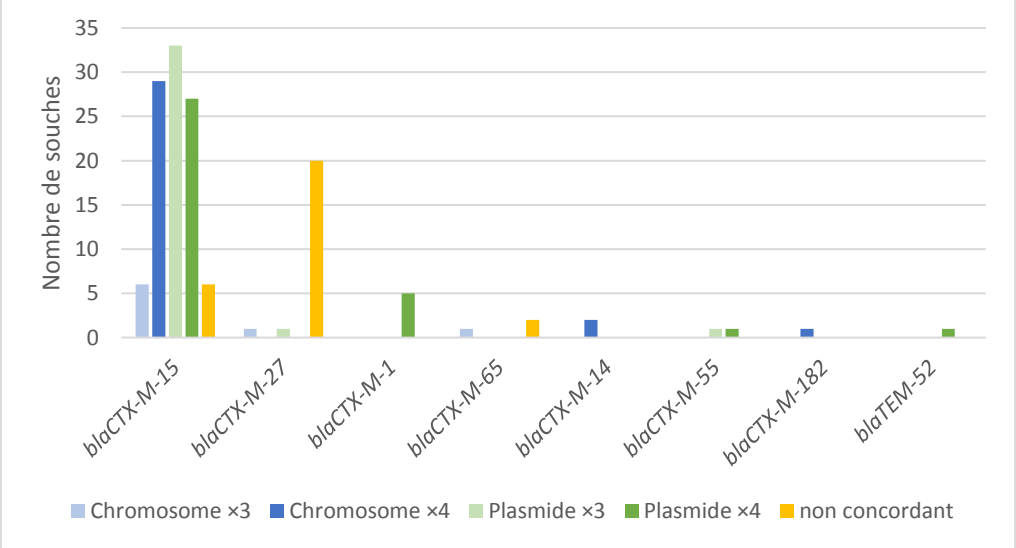


Figure 55. Localisation la plus probable des gènes codants pour une BLSE dans la population d'*E. coli* (n=137). Les indications « ×3 » et « ×4 » correspondent au nombre de logiciels qui ont indiqué la même localisation avec une probabilité au-dessus du seuil fixé (70,0%) le cas-échéant.

III. Distribution des structures plasmidiques

Cette partie rapporte les grands groupes d'incompatibilité plasmidique retrouvés dans les différents compartiments. En effet, comme mentionné en introduction il reste actuellement difficile de correctement lier une résistance à un plasmide donné sans des approches de conjugaison / transformation ou du séquençage hybride. De façon générale, toutes les souches BLSE séquencées présentaient une moyenne de 4 réplicons. Par ailleurs, 9 souches d'*E. coli* n'avaient aucun réplicon identifiable (**Figure 56, Tableau 9**). Elles faisaient toutes parties du ST3580 à l'exception d'une souche (ST38), et ont été retrouvées dans les eaux usées et chez les animaux sauvages. Dans le cas du ST3580, cette observation conforte la localisation chromosomique du gène codant pour la BLSE comme identifié précédemment. Au sein des 270 souches de la collection, en dehors des plasmides de type -Col, 19 types de réplicons généralement associés à des gènes de résistance ont été observés. Les plasmides du groupe IncF étaient majoritaires et ont été identifiés dans 187 souches (69,3% ; présence d'au moins 1 réplicon de ce groupe), notamment chez KPNC (57/58 ; 98,3%) (**Figure 57**). La majorité des bactéries avec un plasmide IncF avaient plusieurs réplicons associés et notamment InFIB / IncFII. Le groupe IncHI était présent dans 73 souches soit 27,0% de la collection, avec une forte prévalence parmi les souches d'ECC. Les autres réplicons étaient moins représentés comme IncI (21 ; 7,8%), IncR (18 ; 6,7%) ou IncX (15 ; 5,6% ; **Figure 57**).

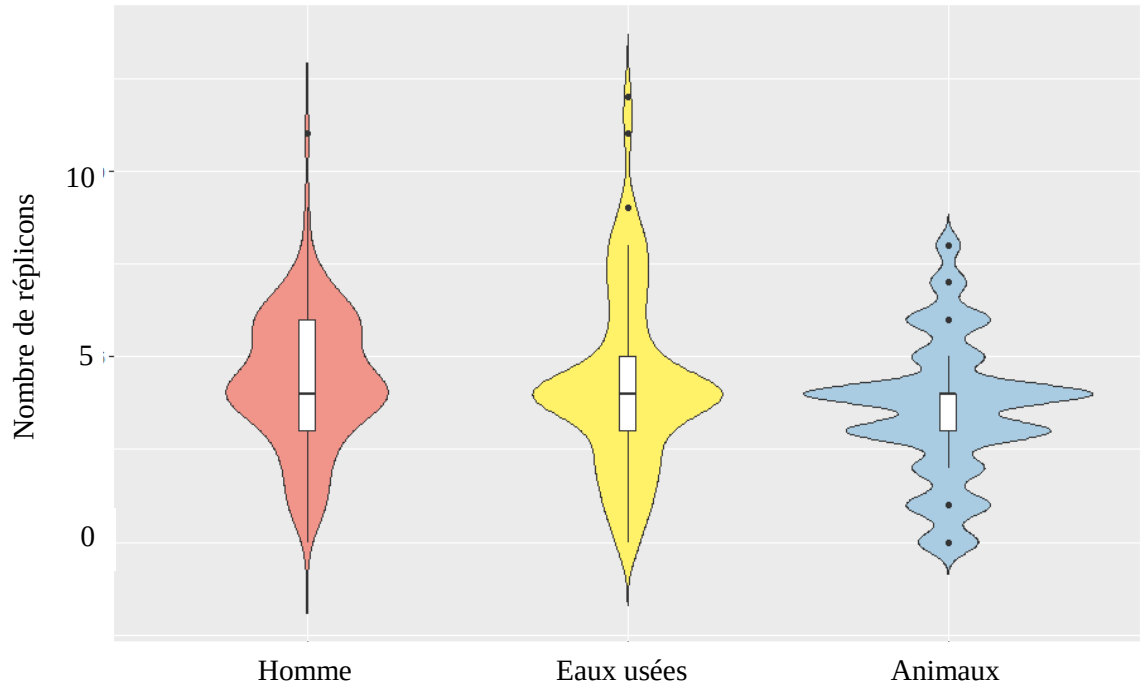


Figure 56. Nombre de réplicons par souche et par compartiment. Les violin-plots ont été construits *via* la sortie brute de PlasmidFinder (identité nucléotidique ajustée ≥ 75% couverture ≥ 95%), pour l'ensemble des espèces séquencées soit 115 souches chez l'homme, 78 des eaux usées, 77 chez les animaux sauvages et domestiques (**Tableau 7**) ; les box-plots associés combinent la valeur médiane de gènes de résistance pour les souches d'un compartiment et les quartiles (RStudio, ggplot package).

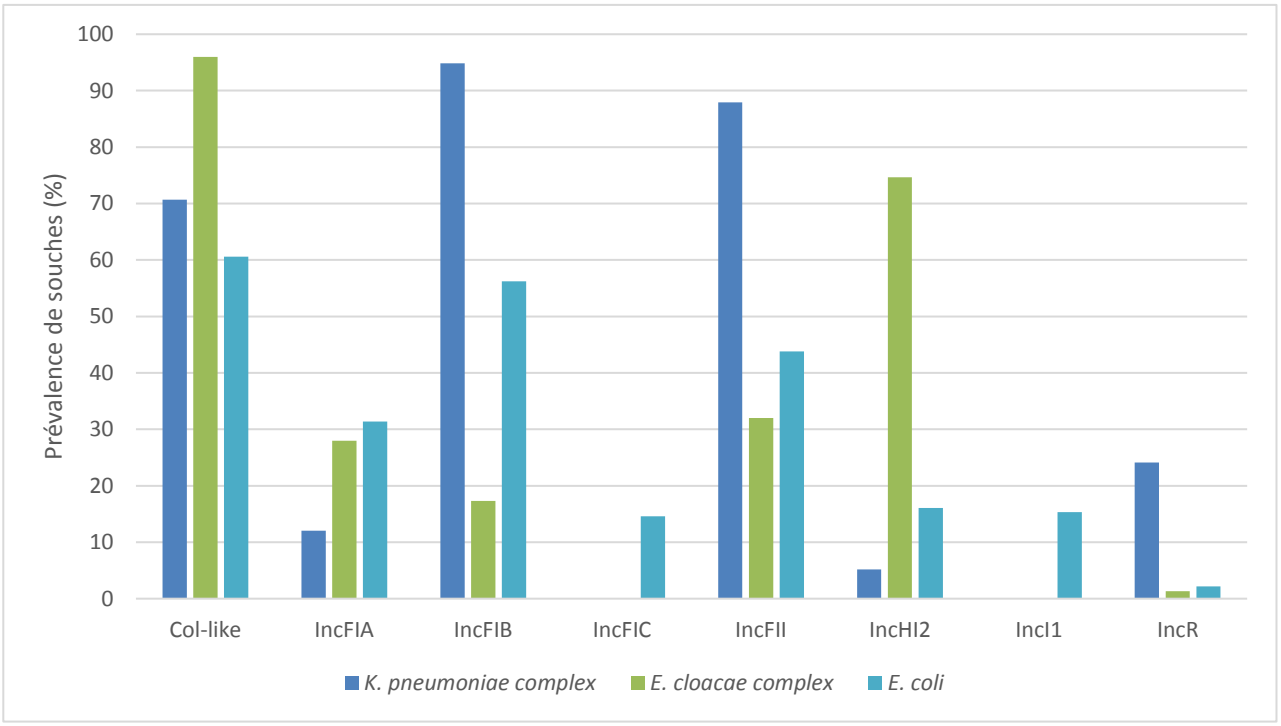


Figure 57. Prévalence d'isolats présentant les types de réplicons majoritaires. Les réplicons ont été prédits avec PlasmidFinder et répartis par espèce analysée, soit 75 *Enterobacter*, 58 *Klebsiella* et 137 *Escherichia* ; les types identifiés dans plus de 5% de la collection sont représentés sur ce graphique ; les autres types retrouvés et minoritaires sont : IncA/C, IncB/O/Z, IncHI1, IncI2, IncN, IncP, IncQ1, IncX1, IncX2, IncX3, IncX4 et IncY.

Tableau 9. Caractéristiques des souches BLSE de la collection ECHANGENE. Tous les gènes de résistance identifiés par ResFinder ont été pris en compte dans le calcul (naturels/acquis ; identité nucléotidique ajustée ≥ 75% couverture ≥ 95%).

Espèce	Gènes de résistance identifiés			Réplicons identifiés		
	Moyenne	Min	Max	Moyenne	Min	Max
***K. pneumoniae* complex (n=58)**	14,1	8	20	4,5	1	8
***E. cloacae* complex (n=75)**	15,7	6	21	4,2	1	9
***E. coli* (n=137)**	8	2	15	3,9	0	12

IV. Focus sur la virulence au sein de la population d'*E. coli*

Comme indiqué en introduction, *E. coli* en plus d'être une bactérie commensale du tube digestif chez les mammifères peut aussi être associée à diverses infections. La présence de gènes de virulence spécifiques et leur nombre sont donc des indicateurs de « l'agressivité » d'un isolat. Selon l'approche One-Health, nous avons souhaité comparer les souches isolées des différents compartiments selon les facteurs de virulence en présence. Contrairement à la résistance qui reste relativement stable entre compartiments, les souches cliniques possèdent un nombre plus élevé de gènes de virulence avec une médiane de 85 contre 82 au niveau des eaux usées et 69 pour les animaux (**Figure 58**).

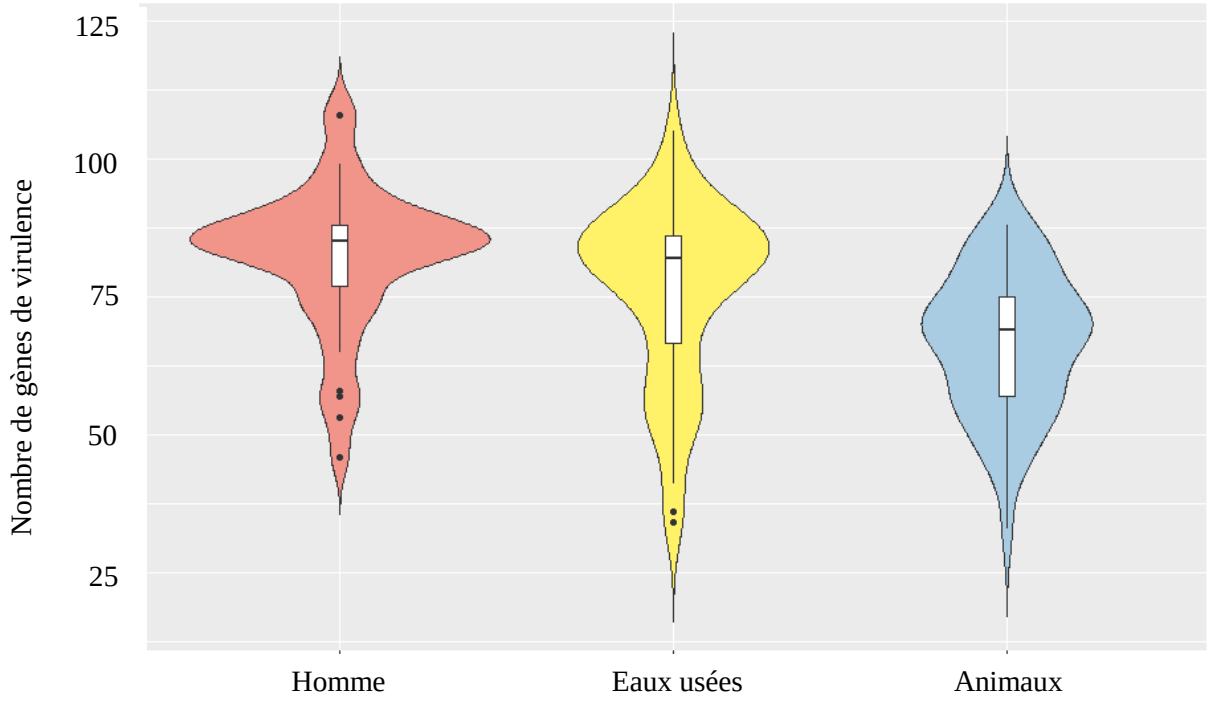


Figure 58. Nombre de gènes de virulence par compartiment au sein de la collection d'*E. coli.* Les violin-plots ont été construits *via* la sortie brute de VFDB (identité nucléotidique ajustée ≥ 75% couverture ≥ 95%), soit 41 souches chez l'homme, 51 des eaux usées, 45 chez les animaux sauvages et domestiques (**Tableau 7**) ; les box-plots associés combinent la valeur médiane de gènes de virulence pour les souches d'un compartiment et les quartiles (RStudio, ggplot package).

Points clés sur les gènes de résistance et les groupes d'incompatibilité plasmidique retrouvés au sein de la collection d'entérobactéries productrices de BLSE.

- ✓ De nombreuses lignées productrices de BLSE ont été identifiées (92 ST), avec moins de 10 ST partagés entre homme, eaux usées et animaux. La circulation entre compartiments était cependant plus importante que dans la **Partie I**.

- ✓ Les BLSE étaient principalement codées par des gènes de type *bla*$_{\text{CTX-M}}$ indépendamment de l'espèce analysée et du compartiment (267/270). Ces gènes étaient les mêmes en clinique et en dehors.

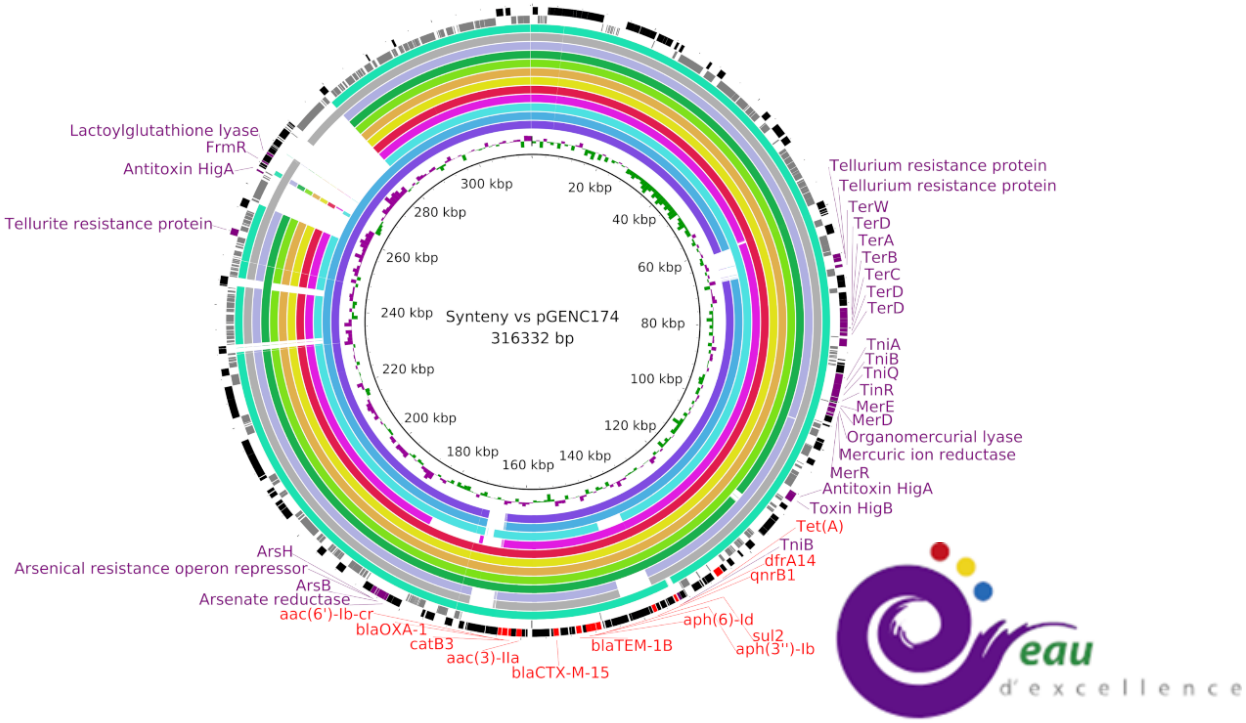
- ✓ Chez KPNC les gènes associés au phénotype BLSE ont majoritairement été prédits sur une structure plasmidique, tout comme chez *E. coli*. Cependant chez *E. coli* différentes lignées présentaient une possible intégration chromosomique.

- ✓ Le nombre de gènes de résistance par souche était similaire entre les compartiments homme et animaux, tout comme la présence de réplicon. Des gènes *intI*1 ont été identifiés dans 65,9% des isolats BLSE, quel que soit le compartiment.

- ✓ Ces premières observations générales nous ont aussi permis de mettre en exergue des variations au niveau des contenus plasmidiques entre les espèces étudiées. La suite des analyses sera donc focalisée sur chacune des espèces pour apprécier la diversité au sein des populations séquencées.

CHAPITRE 3

Diffusion de germes producteurs de BLSE à travers le continuum des eaux usées, focus sur la collection d'*E. cloacae* complex.



Article n°2, accepté dans le journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* le 23 décembre 2020.

DOI : https://doi.org/10.1128/AAC.02146-20

Contexte

Nous avons pu observer dans la **Partie I** l'existence d'un cloisonnement relatif des souches du complexe *E. cloacae* et notamment des clusters *hsp60* VI et VIII résistants aux antibiotiques entre l'homme, l'environnement et les animaux (2017 – 2018) **(408)**. Le second résultat majeur de cette première partie était qu'en dépit d'un nombre important d'*Enterobacter* C3G-R, aucune souche productrice de BLSE n'avait été retrouvée chez les animaux sauvages ou domestiques, au sein des fruits, des légumes et des eaux de captage destinées à la consommation humaine. En revanche, des seules des souches d'*E. coli* BLSE avaient été précédement rapportées au sein de la faune sauvage (2013 – 2014) **(343)**.

Lors du projet ECHANGENE, une forte prévalence d'entérobactéries BLSE a été soulignée le long du continuum des eaux usées mais aussi chez les animaux en aval. Ceci contrastant avec les résultats obtenus dans **Partie I** pour la population d'*Enterobacter* (**Tableau 5**). En ce qui concerne la forte prévalence d'animaux porteurs de ce type de germe, un début d'explication serait associé au degré d'anthropisation de leur environnement **(309)**. Cette différence entre l'environnement « commun / urbanisé » **(43,343)**, et celui de la STEP pour le genre *Enterobacter* souligne bien une possible diffusion 1) de germes résistants entre les différents compartiments (**Figure 52**), 2) un possible échange de gène de résistance notamment *via* les plasmides.

Ces hypothèses ne peuvent être vérifiées que par une approche de séquençage complet (Illumina – phylogénie) et « long-reads » (MinION – plasmide) qui sont présentées dans le présent article pour la collection ECC ECHANGENE.

Démarche expérimentale

Pour rappel, dans cette seconde partie expérimentale, nous nous sommes concentrés sur le continuum des eaux usées. Afin d'évaluer une possible circulation des bactéries et gènes de résistance 36 souches d'ECC BLSE ont été et incluses dans ce premier projet en 2018 chez des patients présentant une infection bactérienne au CHUG. La totalité des souches ECC BLSE humaines de la collection ECHANGENE (n=58 ; **Chapitre 1**) n'a pas été prise en compte en raison d'un manque de séquençage complet lors de la rédaction de cet article. Une recherche de ces germes sur une période plus longue (avril 2018 à avril 2019) a ensuite été effectuée dans 39 prélèvements d'eaux usées de l'hôpital et jusqu'à la sortie de la STEP qui traite ces effluents et ceux de la communauté de commune associée. ECC BLSE a aussi été recherche dans 119 fèces d'animaux sauvages et domestiques vivant à proximité directe du site de traitement, sur un périmètre d'environ 300 m ou dans les égouts de l'hôpital. La sélection de souches résistantes a été faite en laboratoire *via* une approche classique par culture sur gélose sélective et chromogène, et la mise en évidence des résistances par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Cette étape de culture, de sélection et d'identification des germes d'intérêt a permis d'obtenir une collection de 139 souches d'ECC avec 18 profils de résistance différents contre les 13 antibiotiques retenus. Au vu de l'importante diversité au sein des souches d'ECC isolées du continuum et afin de multiplier les « chances » de sélectionner des souches proches entre compartiments, nous nous sommes concentrés sur le séquençage de 17 souches BLSE isolées des eaux usées et des animaux présentant une résistance associée aux antibiotiques

suivants : gentamicine, acide nalidixique, ciprofloxacine, triméthoprime-sulfaméthoxazole (**Tableau 6**). À cette sélection, 24 souches humaines présentant un phénotype similaire ont été ajoutées afin de comparer les données phylogénétiques et de résistance.

Résultats majeurs

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **Dissemination of extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex from a hospital to the nearby environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 lineage coding for a successful IncHI2/ST1 plasmid**, présentée ci-après.

- ✓ Cet article a confirmé les observations faites aux chapitres précédents. Il a permis d'illustrer pour la première fois la diffusion d'une lignée d'*Enterobacter* BLSE d'importance clinique (ST114), et du plasmide de résistance associé dans différents compartiments par le biais des eaux usées.

- ✓ Le seul *Anolis* porteur d'une souche d'ECC BLSE (ST114) après 2 précédents projets de recherche dans toute la Guadeloupe (2013 – 2019 ; n=457 individus) a aussi été prélevé au sein de la STEP (**Partie I**) **(343,408)**.

- ✓ D'autres animaux sauvages ont été identifiés comme porteurs de cette lignée au sein de la station, et notamment les oiseaux. Ces derniers auraient joué le rôle de « vecteur intermédiaire » pour une diffusion clonale vers les animaux domestiques qui étaient présents dans le voisinage.

- ✓ Par une approche de séquençage hybride, nous avons pu souligner la présence d'un plasmide de résistance semblable au niveau mondial et au sein de différents genres bactériens (IncHI2/ST1/$bla_{\text{CTX-M-15}}$). Ce groupe d'incompatibilité n'était que peu identifié ou étudié de façon générale sur le continent américain et encore moins au sein de la faune sauvage **(187)**.

- ✓ Le succès de la diffusion de la lignée ST114 pourrait s'expliquer notamment par la présence de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques mais aussi aux métaux lourds sur cette structure plasmique. Cet élément génétique mobile apporte à son hôte un avantage dans un environnement contraignant tel que les eaux usées.

- ✓ Cet article a aussi souligné l'intérêt de ne pas considérer qu'un seul germe « indicateur » lorsque l'on s'intéresse à la diffusion de l'antibiorésistance (généralement *E. coli*). En effet la prévalence de souches BLSE au sein des animaux était bien moindre pour ce genre en comparaison des deux autres bactéries analysées, mais la diffusion d'une lignée pathogène multirésistante était bien réelle (**Figure 33, Tableau 5**).

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Antimicrobial Agents and Chemotherapy®

EPIDEMIOLOGY AND SURVEILLANCE

Dissemination of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* Complex from a Hospital to the Nearby Environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 Lineage Coding for a Successful IncHI2/ST1 Plasmid

Matthieu Pot,[a] Stéphanie Guyomard-Rabenirina,[a] David Couvin,[a] Célia Ducat,[a] Vincent Enouf,[b] Séverine Ferdinand,[a] Gaëlle Gruel,[a] Edith Malpote,[c] Antoine Talarmin,[a] Sébastien Breurec,[a,d,e] Yann Reynaud[a]

[a]Transmission, Reservoir and Diversity of Pathogens Unit, Pasteur Institute of Guadeloupe, Les Abymes, France
[b]Pasteur International Bioresources network (PIBnet), Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), Pasteur Institute of Paris, Paris, France
[c]Laboratory of Clinical Microbiology, University Hospital of Guadeloupe, Pointe-à-Pitre/Les Abymes, France
[d]Faculty of Medicine Hyacinthe Bastaraud, University of the Antilles, Pointe-à-Pitre, France
[e]INSERM, Center for Clinical Investigation 1424, Pointe-à-Pitre/Les Abymes, France

ABSTRACT Wastewater treatment plants are considered hot spots for antibiotic resistance. Most studies have addressed the impact on the aquatic environment, as water is an important source of anthropogenic pollutants. Few investigations have been conducted on terrestrial animals living near treatment ponds. We isolated extended-spectrum-β-lactamase *Enterobacter cloacae* complex-producing strains from 35 clinical isolates, 29 samples of wastewater, 19 wild animals, and 10 domestic animals living in the hospital sewers and at or near a wastewater treatment plant to study the dissemination of clinically relevant resistance through hospital and urban effluents. After comparison of the antibiotic-resistant profiles of *E. cloacae* complex strains, a more detailed analysis of 41 whole-genome-sequenced strains demonstrated that the most common sequence type, ST114 ($n = 20$), was present in human ($n = 9$) and nonhuman ($n = 11$) samples, with a close genetic relatedness. Whole-genome sequencing confirmed local circulation of this pathogenic lineage in diverse animal species. In addition, nanopore sequencing and specific synteny of an IncHI2/ST1/$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ plasmid recovered on the majority of these ST114 clones ($n = 18$) indicated successful worldwide diffusion of this mobile genetic element.

KEYWORDS *Enterobacter cloacae* complex, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, IncHI2, one health, ST114, wastewater treatment plant, wildlife

Enterobacter cloacae complex (ECC) is widely distributed and has been isolated from many sources (1). Its members are leading causes of nosocomial and opportunistic human infections in clinical settings (2, 3). Unfortunately, in the past decade, treatment and environmental self-care strategies against this bacterial complex have been limited by the emergence of multidrug-resistant isolates and acquired resistance, such as to extended-spectrum-β-lactamase (ESBL); carbapenemase production is of particular concern (4–6). Accurate identification of ECC members is therefore important to better understand ECC's global epidemiology (3). Various approaches have been used to classify ECC members, most often by sequence analysis of certain housekeeping genes, especially the partial *hsp60* sequence, which permits classification of this complex into 14 genetic clusters (7, 8). Detailed differentiation into 22 genomospecies (A to V) is provided by whole-genome sequencing (WGS) (9, 10). Other recent taxonomic updates illustrate the complexity of this genus and the difficulty of correct assignment (11). Strains belonging to *hsp60* genetic clusters III, VI, and VIII have been found to

Citation Pot M, Guyomard-Rabenirina S, Couvin D, Ducat C, Enouf V, Ferdinand S, Gruel G, Malpote E, Talarmin A, Breurec S, Reynaud Y. 2021. Dissemination of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex from a hospital to the nearby environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 lineage coding for a successful IncHI2/ST1 plasmid. Antimicrob Agents Chemother 65:e02146-20. https://doi.org/10.1128/AAC.02146-20.

Copyright © 2021 Pot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Matthieu Pot, mpot@pasteur-guadeloupe.fr.

Received 24 October 2020
Returned for modification 27 November 2020
Accepted 18 December 2020
Accepted manuscript posted online 23 December 2020
Published 17 February 2021

predominate in human infections (7, 12, 13). Moreover, several studies have reported the worldwide emergence and spread of multidrug-resistant clones in hospital and community settings (5, 14) and also in veterinary medicine (15, 16).

Antibiotic resistance is not restricted to human and veterinary medicine but also affects the environment and wild fauna, with some critical interfaces with human activities, including human sewage and its treatment (17). Wastewater concentrates highly diverse resistant and pathogenic bacterial lineages, in addition to components that maintain selective pressure and a high rate of resistance (18). Treatment processes do not remove these pollutants entirely, and they thus affect the aquatic environment and the microbiome composition of nearby wild fauna (19–21).

In Guadeloupe, a French overseas territory in the Caribbean with extensive resources (22), few recent data are available on resistance to antibiotics. In 2018, *Enterobacteriaceae* were the leading cause of hospital-acquired infection at the University Hospital of Guadeloupe (UHG), with *Escherichia coli* (15.9% of all infections) and *Klebsiella pneumoniae* complex species (13.3%) predominating. ESBL-producing isolates were found in 33.8% of the *K. pneumoniae* complex and only 5.0% of *E. coli* isolates. ECC infections were less frequent (4.3%), but 19.7% of the isolates were ESBL producers (S. Breurec, personal communication).

Local wastewater in Guadeloupe contained ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, including ECC strains (21), but no data were available on possible dissemination of specific ECC clones involved in human health and carrying ESBL determinants. A preliminary study showed no ESBL-producing ECC strains in wild fauna in contrast to other bacterial species (23).

The main objective of this "one health" study was to assess the diverse ESBL-producing ECC strains and the role of wastewater treatment plants (WWTPs) in disseminating specific multidrug-resistant isolates from human sources to animals living near the plants. Indeed, because of the absence of ESBL-producing ECC in a nonpolluted environment, the dissemination of multidrug-resistant isolates or of resistance genes from human ECC isolates to this environment was probable.

RESULTS

ESBL-producing ECC lineage in an area with high human activity. ESBL-producing ECC strains were found in 29 of the 119 samples (24.4%) from animals in all classes screened. The prevalence of positive samples was higher in chickens (8/11, 72.7%) than in other domestic animals (2/21, 9.5%) or in wild fauna (19/87, 21.8%). ESBL-producing ECC strains were also isolated from 29 wastewater samples (74.4%) at the 4 sampling sites (see Table S1). Of the 139 unique ESBL-producing ECC strains, 63 were collected from raw water carried from the hospital sewers to the WWTP effluents, 10 were collected from domestic animals, and 30 were collected from wild fauna (Table 1). Analysis of the antibiotic resistance profiles (ARPs) of these 139 strains supplemented with ARPs from 36 clinical strains indicated that one corresponding to ESBL-producing ECC strains harboring coresistance to fluoroquinolones, gentamicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole predominated and was the only one common to the different sample types (ARP–1, 63/139) (Table 1 and Data Set S1). Thirty-one strains with this ARP were selected for WGS. No other ARPs were available from domestic animals; however, to reflect the initial diversity of clinical samples and to explore a putative association between the UHG, the WWTP, and the nearby environment, 10 other clinical ECC strains with 6 ARPs (2, 3, 4, 6, 12, and 14) were also sequenced (see Data Set S1).

Five different genomospecies were identified among the sequenced ECC strains. Only 3 of these clades defined by Sutton and colleagues were found in human and nonhuman samples (9, 10). ECC clade A, currently named *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis*, was the most prevalent, with 15 strains in clinical samples and 11 in other sample types. The second most prevalent clade was ECC clade B (*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*), which was found mainly in human samples (7/9). The last

TABLE 1 Antibiotic-resistant profiles (ARPs) of *E. cloacae* complex strains ($n = 139$) isolated from humans, wastewater (WW), and wild or domestic animals[a]

Antibiotic resistant profile	No. of associated strains [*N* (%)]	Strain distribution							Resistance details						
		Human (*N* = 36)	WW site 1 (*N* = 27)	WW site 2 (*N* = 9)	WW site 3 (*N* = 13)	WW site 4 (*N* = 14)	Wild fauna (*N* = 30)	Domestic animal (*N* = 10)	Ertapenem	Nalidixic acid	Ciprofloxacin	Gentamicin	Amikacin	Tigecycline	Trimethoprime/ sulfamethoxazole
ARP–1	63 (45.3)	20	8	1	4	6	14	10	s	R	R	R	s	s	R
ARP–2	20 (14.4)	2	9	1	3		5		s	R	R	R	s	s	s
ARP–3	15 (10.8)	4	1	3	2	1	4		s	R	R	s	s	s	R
ARP–4	6 (4.3)	3			1		2		R	R	R	R	s	s	R
ARP–5	5 (3.6)		1	2		1	1		s	s	s	s	s	s	R
ARP–6	5 (3.6)	2	1			1	1		R	R	R	s	s	s	R
ARP–7	4 (2.9)		1		1	2			R	R	R	R	s	s	s
ARP–8	3 (2.2)		2	1					s	s	s	s	s	s	s
ARP–9	3 (2.2)		1			1	1		s	s	s	R	s	s	R
ARP–10	3 (2.2)		1	1		1			s	R	R	s	s	s	s
ARP–11	2 (1.4)		2						s	s	s	R	s	s	s
ARP–12	2 (1.4)	2							s	R	R	R	s	R	R
ARP–13	2 (1.4)				1		1		s	R	R	R	R	s	s
ARP–14	2 (1.4)	2							R	R	R	R	s	R	R
ARP–15	1 (0.7)	1							s	R	s	R	s	s	R
ARP–16	1 (0.7)				1				R	R	s	s	s	s	s
ARP–17	1 (0.7)						1		s	R	R	R	R	R	s
ARP–18	1 (0.7)					1			R	R	R	s	s	s	s

[a]All of the 18 ARPs obtained against the 13 antibiotics were unique and associated with strains from different sample types. Intermediate or resistant results are classified as "R," while "s" corresponds to susceptible phenotypes. All analyzed strains were classified as "R" to ampicillin, amoxicillin–clavulanic acid, cefepime, cefoxitin, cefotaxime, and ceftazidime.

TABLE 2 Identification of sequence type (ST) and *E. cloacae* complex (ECC) by sample origin

Current species or subspecies names (8–10)	ECC clade and associated *hsp60* cluster	No. of strains collected (*N* = 41)	Origin				Identified ST	
			Human (*N* = 24)	Domestic animal (*N* = 4)	Wild fauna (*N* = 6)	Wastewater (*N* = 7)	Human isolates	Nonhuman isolates
E. hormaechei subsp. *xiangfangensis*	A (VI)	26	15	4	4	3	114, 171, 544, 1468[a], na[b]	114
E. hormaechei subsp. *steigerwaltii*	B (VIII)	9	7		1	1	113, 133, 190	1474[a]
E. cloacae complex clade L	L (−)	4	1			3	1503[a]	598
E. cloacae complex clade N	N (−)	1			1			1505[a]
E. cloacae complex clade S	S (XIV)	1	1				873	

[a]New STs; details of target sequences are given in Data Set S1.
[b]na, ST not attributed.

shared clade was ECC clade L (*n* = 4) but was found only in human and wastewater isolates (Table 2 and Data Set S1). Overall, the sequence types (STs) showed little heterogeneity, with only two STs (ST113 and ST114) representing 58.5% of the sequenced strains. In nonhuman isolates, ST114 (*dnaA*: 53; *fusA*: 35; *gyrB*: 20; *leuS*: 44; *pyrG*: 45; *rplB*: 4; *rpoB*: 6) was the most common (11/17) and belonged to ECC clade A. Among the six other nonhuman strains in our collection, we reported strains that belonged to clade L (ST598; *n* = 3) and two new STs. The complete profiles of the 7 housekeeping genes used in the ECC multilocus sequence typing scheme (MLST) are presented in Data Set S1. Greater diversity was found among the clinical isolates, with four different STs clearly identified in the ECC clade A, including 9 strains belonging to the predominant ST114 (Table 2 and Data Set S1) and three different STs identified in clinical ECC clade B, 4 of 7 belonging to ST113 (*dnaA*: 4; *fusA*: 22; *gyrB*: 68; *leuS*: 69; *pyrG*: 37; *rplB*: 4; *rpoB*: 24).

Phylogenetic and temporal analyses of ECC ST114 genomes. As noted above, ST114 was the only ST detected in all the samples collected, i.e., in 9 from humans, 3 from wastewater, 4 from wild animals, and 4 from domestic animals (see Data Set S1). Maximum likelihood phylogenetic analysis after recombinant removal and based on 814 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) revealed clear division of the ST114 isolates into 2 main clusters, A and B (Fig. 1). The bacterial isolates were shown to be ESBL producers ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ and $bla_{GES\text{-}7}$), except for one that harbored a carbapenemase determinant ($bla_{OXA\text{-}48}$). The ST114-A lineage consisted mainly of ECC sampled at the hospital (*n* = 8), with 3 strains isolated from wild fauna and 2 from wastewater. Two positive cockroaches (GENC369 and 379) were caught in the UHG sewers (site 1), and

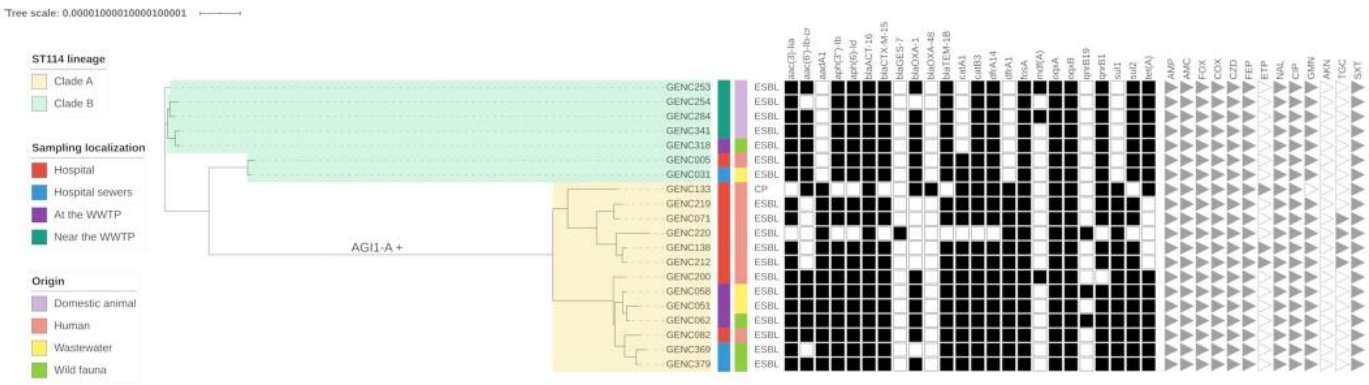


FIG 1 Maximum likelihood phylogenetic tree of *E. cloacae* complex ST114 isolates from Guadeloupe. Hosts and sampling locations, from the hospital to the wastewater treatment plant (WWTP), are indicated by vertical colored strips. The tree is subdivided into two lineages, ST114-A (in yellow) and ST114-B (in green). All isolates except one carbapenemase-producing strain (CP) are extended-spectrum-β-lactamase (ESBL) producers. Antibiotic resistance genes characterized by ResFinder are indicated by black squares (Data Set S1). Antimicrobial resistance profiles are indicated by gray triangles. AMP, ampicillin; MC, amoxicillin–clavulanic acid: FOX, cefoxitin; COX, cefotaxime; CZD, ceftazidime; FEP, cefepime; ETP, ertapenem; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; GMN, gentamicin; AKN, amikacin; TGC, tigecycline; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole. The branch of the genomic island AGI1-A is indicated.

anoles were sampled at the WWTP. Cluster ST114-B corresponded mainly to isolates collected near the WWTP from 4 domestic animals, while 1 strain was sampled from a patient, another strain was sampled in the UHG sewer, and 1 strain was sampled from a wild bird at the WWTP. Nucleotidic diversity was higher for the ST114-A lineage (153 mean single-nucleotide polymorphisms (SNPs), minimum 28, maximum 280) than for ST114-B (60 mean SNPs, minimum 14, maximum 100). In the ST114-B lineage, strains GENC318 and GENC341 differed by only 14 SNPs, and strains GENC005 and GENC031 differed by 17 SNPs.

Using a relaxed clock model in BactDating software and incorporating branch-specific recombination events, we accurately reconstructed and dated the maximum likelihood phylogeny of ECC ST114 isolates (see Fig. S1 and S2). This approach revealed a strong temporal signal in this local data set, with a root-to-tip R^2 of 0.5, indicating that the model explained half of the variation of the data around its mean; furthermore, a Murray permutation test gave a significant *P* value of 0.015, indicating a strong temporal signal in the data set. After 10^7 Markov chain Monte Carlo iterations of the model, the effective sample size was greater than 300 for the mean mutation rate μ, with a standard deviation of the per-branch substitution rates σ and coalescent time unit α, and μ is equal to 1.32e+01 (95% credible interval [4.77e+00; 2.45e+01]; σ = 4.39e+00 [0.00e+00; 1.21e+01]; α = 1.32e+01 [4.61e+00; 3.69e+01]) (see Fig. S1 and S2). Posterior means were estimated for the dates of all ancestral nodes, and the most recent common ancestor of these sublineages was dated to 1990 (confidence interval: 1947; 2007). We also estimated the dates of the ancestral nodes for sublineages ST114-A and ST114-B and found an older subdivision for ST114-A (2010 [1994; 2014]) than for ST114-B (2015 [2008; 2017]).

Genetic background of ESBL-producing ECC ST114 isolates: antibiotic resistance genes, IncHI2/ST1 plasmids, and genomic island AGI1-A. Three β-lactamase-encoding genes, $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (18/20), $bla_{\text{OXA-1}}$ (13/20), and $bla_{\text{TEM-1B}}$ (18/20), were identified in most ST114 isolates, in addition to the chromosomal cephalosporinase ($bla_{\text{ACT-16}}$) (Fig. 1). Other resistance genes also well represented in most samples were *aac(3)-IIa* (18/20), *aac(6′)-Ib-cr* (13/20), *aph(3″)-Ib* [*strA*] (18/20), *aph(6)-Id* [*strB*] (18/20), *catA1* (14/20), *catB3* (19/20), *dfrA1* (13/20), *dfrA14* (19/20), *qnrB1* (18/20), *sul1* (13/20), *sul2* (18/20), *tet* (A) (15/20), and *aadA1* [*ant(3″)-Ia*] (13/20). In addition, all strains related to the ST114-A lineage had an S83L like mutation on *gyrA* associated with fluoroquinolones resistance in *E. coli* (see Data Set S1).

As most of the ESBL-producing ECC ST114 isolates presented an IncHI2/ST1 plasmidic signature in PlasmidFinder and pMLST (see Fig. S3), we performed ONT sequencing for reconstruction by hybrid assemblage with Illumina full plasmidic sequences of 3 ST114 isolates, the clinical strain GENC200, GENC253 isolated from a goose, and GENC284 isolated from a pig close to the WWTP that collects wastewater from the UHG. For comparison, we added the C-VIII ECC strain GENC174 (ST1474), which has a similar ARP and the same plasmidic signature (see Data Set S1), isolated from a rat at the WWTP. The corresponding plasmids were pGENC200 (291,493 bp), pGENC253 (306,188 bp), pGENC284 (304,958 bp), and pGENC174 (316,332 bp), which presented more than 99.9% nucleotidic identity (Fig. 2). A search for IncHI2/ST1 plasmids in the PLSDB database to match our 4 plasmids resulted in nine additional plasmids that shared more than 88% of the pGENC174 sequence, with more than 99.7% nucleotidic identity. The oldest one was obtained in 2003 from a human sample in Kenya. The corresponding bacterial species were ECC ($n = 3$), *Salmonella enterica* ($n = 3$), *E. coli* ($n = 2$), and *Raoultella ornithinolytica* ($n = 1$) (see Data Set S2). All the plasmids except 2 were from human samples. Determination of synteny in the 13 plasmids by BRIG (Fig. 2) and with Mauve software (see Fig. S4) revealed strong similarity in backbone organization dedicated to replication, stability, leading, and conjugative transfer. All the plasmids had the $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{OXA-1}}$, and $bla_{\text{TEM-1B}}$ encoding genes and also other antibiotic resistance genes, with the presence of *aac(3)-IIa*, *aac(6′)-Ib-cr*, *aadA1*, *aph(3″)-Ib*, *aph(6)-Id*, *catA1*, *catB3*, *dfrA14*, *qnrB1*, *sul2*, and *tet*(A) in most of sequenced plasmids. Resistance to the heavy metals tellurite (*ter* genes),

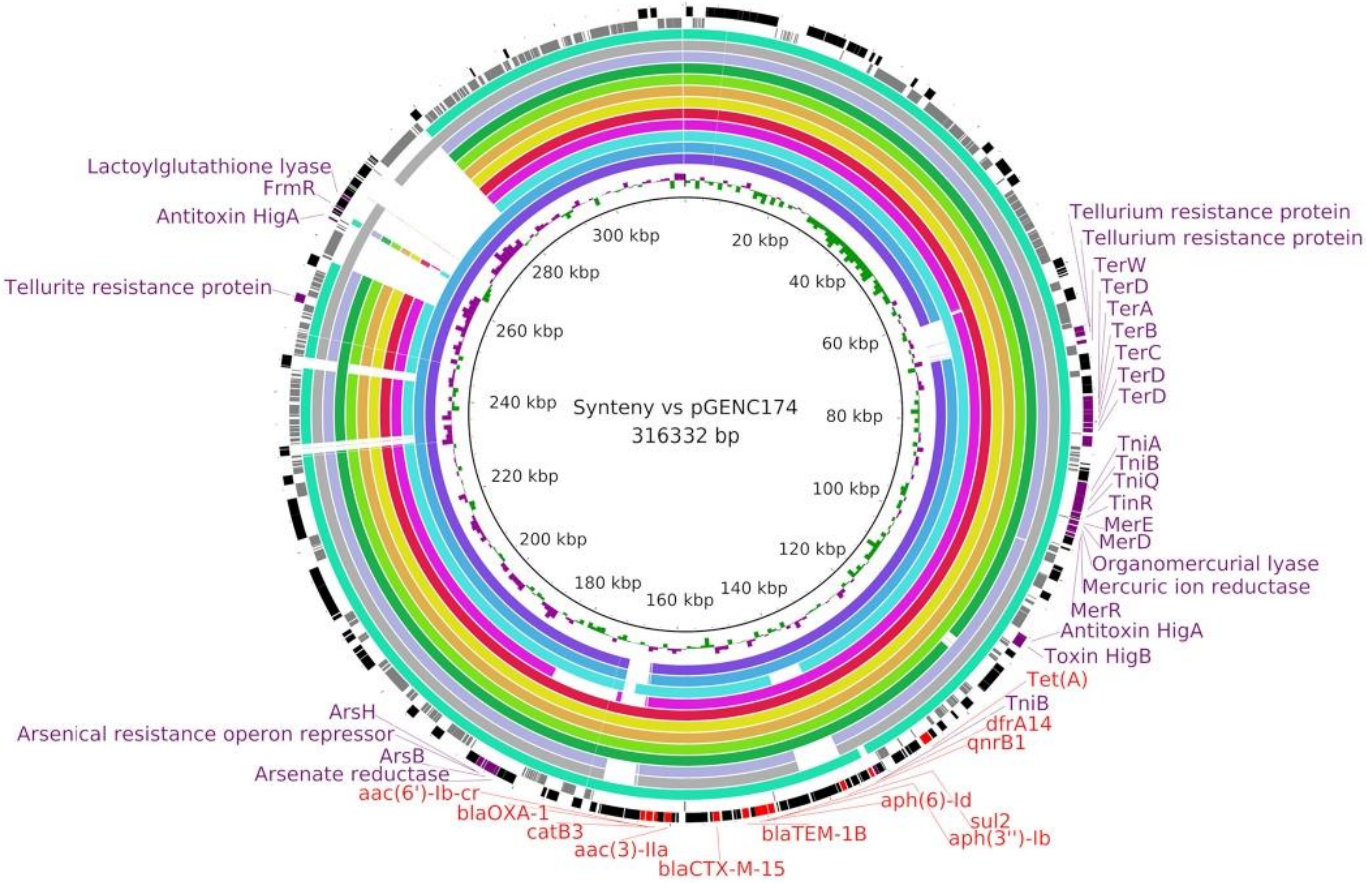


FIG 2 Synteny of the 4 IncHI2/ST1 plasmids obtained from *E. cloacae* complex (ECC) isolates in Guadeloupe versus 9 reference plasmids from the PLSDB database. Syntenic analysis was performed with BRIG software. The innermost black ring 1 represents the local pGENC174 plasmid (GenBank accession number CP061496, recovered from a rat) associated with its GC skew. The other rings from the inner to the outer represent pairwise comparisons with the following local plasmids: pGENC253 (CP061494, goose), pGENC284 (CP061493, pig), pGENC200 (CP061495, human). Then, the subsequent rings corresponded to close plasmids from the PLSDB database: p23_A-OXA140 (GenBank accession number CP048350, bacterial species *Raoultella ornithinolytica*, Country Switzerland), pCRENT-193_1 (CP024813, ECC, Republic of Korea), pEB247 (LN830952, ECC, United Republic of Tanzania), pEclC2185CTXM15 (MK736669, ECC, France), pIV_IncHI2_CTX_M_15 (MN540571, *Escherichia coli*, Italy), pSTm-A54650 (NC_024983, *Salmonella enterica*, Malawi), pKST313 (LN794248, *S. enterica*, Kenya), pUGA14_1 (CP021463, *S. enterica*, Kenya), and pEc21617-310 (MG878867, *E. coli*, Taiwan). These nine international plasmids were isolated from human samples between 2003 and 2019, except for pIV_IncHI2_CTX_M_15 and p23_A-OXA140 (dog and river, respectively). The last 2 outer rings represent a map of hypothetical proteins (gray boxes) and coding sequences (black boxes); antibiotic resistance genes are indicated by red boxes, and other relevant genes are in purple boxes. Details of the plasmids and complete annotation are provided in Data Set S2.

mercury (*mer* and *tni* genes), and arsenic (*ars* genes) was noted in all plasmids; furthermore, resistance to formaldehyde (*frmR* gene) was identified in plasmids from Guadeloupe and from only 1 sample from Kenya (plasmid pUGA14_1). A toxin/antitoxin system was also characterized (*higB/higA* genes).

Screening for the genomic resistance island AGI1-A (44,369 bp), previously described in an ECC clinical strain EclC2185 from France (2), identified the complete sequence of AGI1-A (44,358 bp; more than 99.97% coverage versus the reference; 100% nucleotidic identity) in the GENC200 strain. Moreover, a mapping approach to reconstructed AGI1-A in GENC200 made it possible to assemble an identical genomic island in all the ESBL-producing ST114 isolates belonging to lineage ST114-A ($n = 13$), described above (see Table S2), while AGI1-A was absent from the second lineage ST114-B ($n = 7$) (Fig. 1) and other sequenced strains ($n = 22$). Three antibiotic resistance genes were identified on this genomic island with ResFinder: *aadA1*, *dfrA1*, and *sul1*.

DISCUSSION

Dissemination of ESBL-producing ECC from hospital to WWTP. This "one health" study of the spread of ESBL-ECC producers in Guadeloupe from a hospital to the environment near the WWTP demonstrated the carriage of one antibiotic-resistant

Enterobacteriaceae genus through 19/87 (21.8%) wild fauna living at the WWTP and near the UHG sewer. Previous work on ESBL-producing strains in wildlife in Guadeloupe was less worrisome. Results were focused on *E. coli* carriage and showed that only 7/884 animals (0.79%) were positive, comprising 5 rats (*Rattus norvegicus*), 1 Carib grackle (*Quiscalus lugubris*), and 1 iguana (*Iguana iguana*) (22). The difference from our results may be due to lower exposure to anthropogenic pollution in the previous work. We sampled numerous wild animals in direct contact with human sewage and waste, including cockroaches caught in sewers, toads in clarifier settling tanks, and rats, anoles, and wild birds near solid waste from the screening and grit removal steps. Our observations corroborate previous observations that wastewater effluents contribute to the spread of human-associated bacteria and antibiotic resistance determinants through wild fauna (19, 20).

Direct access to the WWTP park did not, however, explain the carriage of determinants in domestic animals (10/32, 31.5%), especially chickens. We propose 2 hypotheses to explain the high carriage of resistance in domestic animals within a radius of more than 500 m of the WWTP. The pigs, chicken, geese, and dogs carrying ESBL strains in our study lived close together in different pens, and the ST114 genetic background assigned was only to the B lineage, including a strain from a Carib grackle (GENC318), a species frequently observed in the area, especially during feeding time. This isolate, recovered in February 2019, differed by only 14 SNPs from GENC341 isolated in March 2019 from a chicken, indicating a close genetic relationship (Fig. 1 and Data Set S1). These observations point to a potential role of wild fauna, especially birds, in the spread of antibiotic-resistant bacteria, as previously described (24). Domestic animal contamination could, however, be older and maintained for several months or years (GENC253, 254, and 284) (Fig. 1 and Data Set S1). In view of the layout of the WWTP and the distance from domestic animal pens (300 m), however, a second hypothesis is dissemination of the lineage by air, resulting in contamination of the environment, such as soil in pens. As some processes in screening and the aeration tank at the WWTP are more likely to create bio-aerosols, bacteria could be emitted outside the treatment plant (25).

Most of the ESBL-producing ECC strains in nonhuman isolates belonged to the ST114 lineage (11/17) (see Data Set S1), mirroring the prevalence in human clinical isolates (9/24). Few studies have been published on ST diversity in clinical ECC; however, ST114, ST78, ST108, and ST66 are the most common in human infections (5, 14). ST114 was described by Girlich et al. as the most prevalent in a worldwide collection of $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$-producing ECC of clinical origin (26) and has been reported in a hospital outbreak (2). This high-risk ECC ST has been isolated only rarely from domestic animals (15, 16) and only twice previously in wildlife exposed to human activities (27, 28). Like other ESBL-ECC producers, the ST114 clone was also found after wastewater treatment (site 4, GENC051) (see Data Set S1), indicating that pathogenic, highly resistant clones are not totally eliminated during wastewater treatment. Therefore, even after dilution in the sea, they could affect the coastal environment and local marine life (21, 27).

WGS also confirmed the presence of carbapenemase-producing ECC (GENC133) in Guadeloupe (Fig. 1), where carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* emerged in 2014 (29, 30). The isolate collected from a human sample in September 2018 belonged to ST114, and its genetic background was shown to be the major ECC clade A clone in a previous study of carbapenemase producers (5). This finding is of great concern because of the many ST114 clones isolated in clinical samples and because of the capacity of ST114 to spread. No carbapenemase producer has yet been isolated from a nonhuman sample in Guadeloupe (21–23), but this should be monitored in the future.

Local ESBL-producing ECC ST114 is clearly structured into two distinct lineages. A maximum likelihood phylogenetic tree of 19 ESBL-producing isolates and 1 carbapenemase producer ECC ST114 isolate revealed a clear division into 2 lineages, ST114-A and ST114-B (Fig. 1). The first comprised 8 clinical strains and 5 isolates from the WWTP (2 samples from wastewater and 3 from animals), and the second comprised 5 strains from animals, 2 strains from wastewater, and 1 human isolate, indicating that

clinical and nonclinical ESBL strains are mixed in the same lineage and human strains are transmitted to animals through wastewater. Bayesian analysis in BactDating software (integrating recombinations) separated these 2 lineages and dated the most recent common ancestor to around 1990 (95% credible interval [1947; 2007]) (see Fig. S1 and S2). The nucleotidic diversity of ST114-A (153 mean SNPs, minimum 28, maximum 280) is higher than that of ST114-B (60 mean SNPs, minimum 14, maximum 100). Moreover, ST114-A is probably more ancient than ST114-B (2010 versus 2015). A previous study highlighted a subdivision of ST114 isolates into 4 sublineages (5), but only 1 (strains from Serbia, Romania, and Tunisia), characterized by bla_{TEM-1}, bla_{OXA-1}, and $bla_{CTX-M-15}$ resistance genes and IncHI2/ST1 plasmids, could be compared to ST114 isolates from Guadeloupe.

Interestingly, the genomic resistance island AGI1-A (44,369 bp) was recovered only from lineage ST114-A (see Table S2). This genomic island was previously described in an ESBL-producing ECC ST114 strain (EclC2185) involved in a nosocomial outbreak in a French hospital and harbors the IncHI2/ST1 plasmid and the same antibiotic resistance genes (Fig. 2). The genomic island, first characterized in *Acinetobacter baumannii* (2), is a variant of an AGI1 resistance island described in *Salmonella* and *Proteus* and codes for multiple types of antibiotic resistance through the *aadA1*, *dfrA1*, and *sul1* genes. A recent study confirmed that this genomic island was mobilizable (31). Our finding of this integrative mobilizable element in Guadeloupe confirms the high risk of interspecies dissemination of AGI1 worldwide.

The presence of two contrasted sublineages of local ECC ST114 is confirmed by (i) the separation of ST114 isolates into 2 branches, (ii) the finding that more ST114-A isolates are clinical isolates and more ST114-B isolates are nonclinical isolates, (iii) the findings that the subdivision of ST114-A is older than that of ST114-B and ST114-A has greater nucleotidic diversity, and (iv) the finding that only ST114-A has the genomic island AGI1-A and specific mutation in *gyrA*.

A highly successful IncHI2/ST1 plasmid is circulating in Guadeloupe. $bla_{CTX-M-15}$ was the most common gene coding for ESBL, as described in clinical and veterinary studies on ECC (3, 14–16). This and most of the antimicrobial resistance genes identified were present in local ESBL-ST114 isolates on large conjugative IncHI2/ST1 plasmids (Fig. 2, Fig. S4, and Data Set S1), representing circulation of the same panel of antibiotic resistance genes among isolates of different origins. Synteny analysis showed that these plasmids are closely related to 9 plasmids that were isolated from various bacterial species worldwide and recovered between 2003 and 2019. In addition, the presence of closely related plasmids was suspected by mapping in a study in *S. enterica* isolates from the Central African Republic, Mali, and Senegal (32). Although this plasmid family has been described mainly in Africa (33), Asia, and Europe, to our knowledge, this is the first description in clinical isolates in the Americas. A similar plasmid has been identified in ESBL-producing *E. coli* strains recovered from the same wastewater and animal collection and is still under investigation [unpublished data].

This plasmid also has numerous genes encoding resistance to heavy-metal ions: tellurite (*ter*), mercury (*mer* and *tni*), and arsenic (*ars*). A gene related to resistance to formaldehyde (*frmR*) has been identified only in plasmids in Guadeloupe and in *S. enterica* in Kenya (plasmid pUGA14_1). These genes are probably a key factor in the persistence, selection, and spread of antibiotic-resistant bacteria in hostile environments where they encounter toxic organic substances such as detergents, heavy metals, and other antimicrobials (32). A toxin/antitoxin system has been characterized (*higB*/*higA* genes) that allows persistence of plasmid in bacteria. A lactoylglutathione lyase (also called glyoxalase) has been identified in plasmids of ECC in Guadeloupe which has been described as a virulence factor in view of its critical role in methylglyoxal detoxification (34). Methylglyoxal is produced and secreted by intestinal flora (35) and is responsible for strong oxidative stress; therefore, resistance to such compounds increases the survival of enteric pathogens.

Conclusion. Our results, focusing on *Enterobacter cloacae* complex, confirm that the environment near WWTPs is a hot spot for the emergence of antibiotic-resistant

bacteria and their spread to wild fauna that live and feed there. A well-conserved IncHI2/ST1/$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ plasmid has spread among ECC strains of different origin (humans, wild fauna, domestic animals, and urban sewage) in Guadeloupe. It is also present in other *Enterobacteriaceae* from different animal and human sources over a wide geographic area, indicating the importance of surveillance programs with plasmid sequencing in limiting its spread.

MATERIALS AND METHODS

ESBL-producing ECC isolates from wastewater. The WWTP studied, the largest in Guadeloupe, located in Jarry, treats wastewater from the UHG and also urban wastewater from three major cities (Pointe-à-Pitre, Les Abymes, and Baie-Mahault). It treats an average influent of 13,904 m^3/day, for a maximum of 33,051 inhabitant equivalents in 2018. It is an activated sludge process, and the effluent treatment pond is located in an open environment in an industrial area. Effluent is discharged into the sea near Petit Cul-de-Sac Marin.

During 10 sampling campaigns between April 2018 and March 2019, 4 sampling sites were set up along the wastewater continuum between the UHG and the WWTP: samples of untreated clinical sewage outflow at the UHG (Pointe-à-Pitre) (site 1), samples of mixed clinical and urban untreated sewage between the UHG and the WWTP (site 2), and samples from influents and effluents at the WWTP (sites 3 and 4, respectively). Site 2 is located about 2 km from the hospital (site 1), while the WWTP (sites 3 and 4) is about 8 km from the first sampling point. A total of 39 sewage samples were collected during the study period (1 sample from site 2 was missing).

Raw water samples (500 ml) were collected within a time interval of up to 24 h at the different sites, stored at 4°C, and taken to the laboratory, where they were filtered within 4 h, as described previously (21). Membranes were placed on CCA agar plates (CHROMagar, Paris, France) supplemented with ceftriaxone at 4 mg/liter and on a CCA plate without antibiotic as control. Plates were incubated at 37°C for a maximum of 24 h. According to their morphology and the manufacturer's instructions, 5 colonies presumed to be resistant to third-generation cephalosporins ECC were isolated per sample, if available.

ESBL-producing ECC isolates from animals living near the wastewater pathway. Between June 2018 and April 2019, in parallel to the raw water sampling campaigns, wild animals were trapped and sampled at various locations in the WWTP park. Anoles (*Anolis marmoratus speciosus*) and cane toads (*Rhinella marina*) were released, while rats (*Rattus rattus*) were euthanized. A single cloacal swab was taken from 20 anoles, 19 cane toads, and 8 rats, and fresh feces were recovered from 11 Carib grackles (*Quiscalus lugubris*). We also investigated 32 domestic animals living in a fenced-in park 300 m from the WWTP. A single cloacal or rectal swab was taken from 11 chickens, 10 pigs, and 2 geese, and fresh stools were collected nearby from 6 dogs (*Fila brasileiro*) and 3 cows. None of these domestic animals received antibiotic treatment during the study period and 6 months before the start of sampling. Finally, 29 cockroaches (*Periplaneta americana*) were trapped in the UHG sewers (site 1, $n = 20$) and the WWTP ($n = 9$), and their alimentary tracts were sampled as described previously (36). The protocol was approved by the Committee for Ethics in animal experiments of the French West Indies and Guyana (reference 971-2016-12-20-001).

All fecal samples were placed at 4°C and processed for enrichment in 9 ml buffered peptone water on the same day. Samples were incubated for 16 to 20 h at 37°C, and then 0.1-ml aliquots were inoculated onto CCA agar supplemented with ceftriaxone at 4 mg/liter and onto a CCA agar plate as control.

ECC identification and susceptibility analysis. The species of all isolates were identified by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan). Susceptibility to ampicillin (10 μg), nalidixic acid (30 μg), amikacin (30 μg), amoxicillin-clavulanic acid (10 μg), cefepime (30 μg), cefotaxime (5 μg), cefoxitin (30 μg), ceftazidime (10 μg), ciprofloxacin (5 μg), ertapenem (10 μg), gentamicin (10 μg), tigecycline (15 μg), and trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 to 23.75 μg) was determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad). Isolates were classified as resistant, intermediate, or susceptible according to the 2018 guidelines of CA-SFM/EUCAST (http://www.sfm-microbiologie.org), and production of ESBL was detected by the double-disk synergy test on Mueller-Hinton agar with cloxacillin (in case of cephalosporinase overproduction) or without, according to CA-SFM/EUCAST recommendations. Isolates of intermediate susceptibility were combined with resistant isolates for data analysis. If more than 1 isolate with the same ARP was recovered from the same sample, only the first was retained for analysis. All isolates, independently of their origin, were classified according to their ARP against the 13 antibiotics. Each profile represented resistance to a unique composition of antibiotics selected for this study.

In a one health perspective, we also added 36 ARPs from ESBL-producing ECC isolates associated with human infections at the UHG, recovered in 2018, and analyzed as described in the previous paragraph. The ARPs of all the bacteria of human origin were similar to those in previous environmental samples and were characterized as ESBL or carbapenemase producers. If multiple strains were obtained from a patient, only 1 was kept. The protocol for collecting bacteria was in accordance with the requirements of the local ethics committee (reference A5_19_12_05_TRAMID).

WGS and phylogenetic analyses. A selection of ESBL-producing ECC strains was done by focusing on predominant ARPs found in animals, wastewater, and humans. The prevalence of different ARPs is shown in Table 1. The 10 strains from animals and the 7 strains from wastewater sampling points selected for WGS were found to have similar profiles against the 13 antibiotics with ARP–1 (Table 1 and Table S1). In addition, 14 human isolates that also clustered in ARP–1 and 10 clinical strains with other

ARPs were randomly selected for WGS. Total bacterial DNA was extracted from pure cultures with a Qiagen QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany). WGS was performed at the Plateforme de microbiologie mutualisée of the Pasteur International Bioresources network (Institut Pasteur, Paris, France). Libraries were prepared with an Illumina Nextera XT kit and further sequenced with the NextSeq 500 system (paired-end 150 bp). Reads were trimmed and filtered with an AlienTrimmer (37), yielding a mean 96-fold estimated coverage.

Genomes were assembled with SPAdes software v3.9.0 (38). The quality of the assemblies was checked with QUAST software (39), which gave a mean N_{50} of 251,153 (minimum 181,264, maximum 388,439). ECC clades were initially identified with the ECC references of Chavda, Sutton, and Beyrouthy (8–10). After identification, MLST was performed *in silico* with MLST software (https://github.com/tseemann/mlst) associated with PubMLST (40). Definitions of new alleles and STs were provided by the same database. The antibiotic resistance gene content was assessed with ResFinder (41), plasmids were identified and typed with PlasmidFinder and pMLST (42), and virulence genes were detected with Abricate software (https://github.com/tseemann/abricate) and VFDB (43). In addition, *gyrA* mutation associated with fluoroquinolones resistance was screened with CARD (44).

The most common ST in this collection, ST114, was analyzed in depth. Total core SNPs were detected with SNIPPY software and GENC200 strain as reference (https://github.com/tseemann/snippy). Recombination sequences were further identified and removed from the global core genome alignment with ClonalFrameML (45), giving a total of 814 SNPs (minimum of 14 SNPs; maximum of 459). Maximum likelihood phylogenetic reconstruction was performed with RAxML v8 (46) in the GTR-CAT model and 1,000 bootstrap replicates, and the tree was drawn with iTOL (47).

Temporal analyses of ECC ST114 genomes. The presence of a time signal was first evaluated by calculating the linear regression between the root-to-tip distance and the isolation year (see Fig. S2). Null distributions of R^2 values were generated by 1,000 permutations on the actual isolation year by random permutations, as described by Murray et al. (48). The ClonalFrameML output was further used as input for BactDating analyses (49) to perform Bayesian dating of the nodes of the ECC ST114 phylogenetic tree in a relaxed clock model, after incorporating information on branch-specific recombination rates. The model was run for 10^7 iterations to ensure perfect convergence of the Markov chain Monte Carlo and the significance of effective sample size for inferred key parameters, i.e., mean mutation rate μ, standard deviation of the per-branch substitution rates σ, and coalescence time unit α.

Sequencing and synteny of IncHI2 plasmids. Previous analyses revealed the presence of IncHI2/ST1 plasmids in most of the ECC ST114 strains. We used nanopore sequencing (Oxford Nanopore Technology [ONT]) to fully sequence corresponding plasmids in ECC strains GENC200, GENC253, and GENC284 sampled from a human, a goose, and a pig, respectively. For comparison, we added the GENC174 strain from our bacterial collection, as this cluster VIII isolate sampled in 2018 from a rat also presented an IncHI2/ST1 plasmidic signature and a close antibiotic resistance profile. ONT libraries were prepared (without shearing steps to select for long reads) with an SQK-LSK109 ligation sequencing kit and an EXP-NBD104 native barcoding expansion 1-12 kit. Genomes were sequenced for 48 h on a FLO-MIN106 flow cell connected to the MinION device. Reads were then base-called externally with Guppy software v3.6.0 and further debarcoded and screened for quality with EPI2ME v2020.2.10 FASTQ barcoding workflow. A mean read size of 6,731 bp (minimum 4,903; maximum 8,437) and mean estimated coverage of 44-fold were obtained. Hybrid assembly was then performed with both high-quality Illumina and nanopore reads in a Unicycler pipeline (50), resulting in a final mean coverage of 135-fold. Assembled, circularized contigs corresponding to IncHI2/ST1 plasmids were identified with PlasmidFinder and pMLST, and antibiotic resistance was confirmed with ResFinder. We recovered full sequences of the targeted plasmids pGENC200, pGENC253, pGENC284, and pGENC174, which were annotated on a RAST server (51). Similar plasmids were then sought with Mash Screen in the plasmids database PLSDB (52), a resource containing 20,668 plasmid sequences in June 2020, collected from the NCBI nucleotide database. Syntenic analysis of all plasmids versus pGENC174 was performed with BRIG and Mauve software (53, 54). Antibiotic resistances genes of selected PLSDB plasmids were explored with ResFinder.

Screening of genomic island AGI1-A in ECC ST114 strains. The genomic resistance island AGI1-A was previously described in ECC strain EclC2185 (GenBank accession number MH545561) (2). Hybrid genome assembly on GENC200 was aligned against AGI1-A, and the corresponding sequence was extracted. In order to reconstruct the putative AGI1-A type in our ECC collection, FASTQ reads of ST114 isolates were mapped against an AGI1-A sequence extracted from GENC200 with Bowtie 2 software (55). Selected mapped reads were assembled with SPAdes, and the quality of the assembly was checked with QUAST software against the reference GENC200 strain. Antibiotic resistance genes were identified on assembled genomic island with ResFinder.

Data availability. All read sequences for the 41 WGS strains and the 4 plasmids have been deposited in the GenBank database under BioProject numbers PRJNA649757 and PRJNA659514. Corresponding accession numbers are listed in Data Set S1 (strains) and Data Set S2 (plasmids).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1.2 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, XLSX file, 0.03 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 3, XLSX file, 0.03 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a FEDER grant (2018-FED-1084) financed by the European Union and the Guadeloupe Region. The funders had no role at any stage of this study, and we declare that we have no conflicts of interest. We thank the urban community of Cap Excellence for their collaboration and especially employees of Eau d'Excellence at the WWTP for their logistic help. We also thank B. Vitalis, without whom much of the sampling would not have been possible. We thank E. Heseltine for editorial assistance. The authors express their gratitude to all the technicians and students at the Pasteur Institute of Guadeloupe, the University Hospital of Pointe-à-Pitre, and the "Plateforme de microbiologie mutualisée" involved in this work.

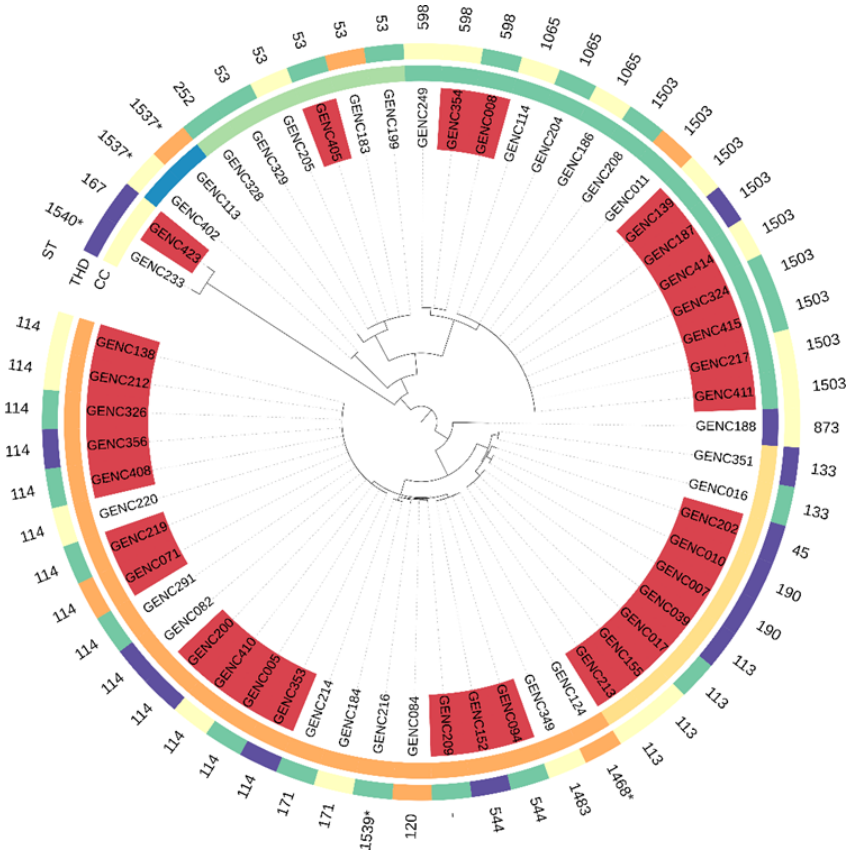
REFERENCES

1. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. 2019. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 32:1–32. https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19.
2. Siebor E, De Curraize C, Neuwirth C. 2019. Identification of AGI1-A, a variant of *Acinetobacter* genomic island 1 (AGI1), in a French clinical isolate belonging to the *Enterobacter cloacae* complex. J Antimicrob Chemother 74:311–314. https://doi.org/10.1093/jac/dky442.
3. Garinet S, Fihman V, Jacquier H, Corvec S, Le Monnier A, Guillard T, Cattoir V, Zahar JH, Woerther PL, Carbonnelle E, Wargnier A, Kernéis S, Morand PC, GMC. 2018. Elective distribution of resistance to beta-lactams among *Enterobacter cloacae* genetic clusters. J Infect 77:178–182. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.05.005.
4. Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis 197:1079–1081. https://doi.org/10.1086/533452.
5. Peirano G, Matsumura Y, Adams MD, Bradford P, Motyl M, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. 2018. Genomic epidemiology of global carbapenemase-producing *Enterobacter* spp., 2008–2014. Emerg Infect Dis 24:1010–1019. https://doi.org/10.3201/eid2406.171648.
6. World Health Organization. 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed.
7. Hoffmann H, Roggenkamp A. 2003. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. Appl Environ Microbiol 69:5306–5318. https://doi.org/10.1128/aem.69.9.5306-5318.2003.
8. Beyrouthy R, Barets M, Marion E, Dananché C, Dauwalder O, Robin F, Gauthier L, Jousset A, Dortet L, Guérin F, Bénet T, Cassier P, Vanhems P, Bonnet R. 2018. Novel *Enterobacter* lineage as leading cause of nosocomial outbreak involving carbapenemase-producing strains. Emerg Infect Dis 24:1505–1515. https://doi.org/10.3201/eid2408.180151.
9. Chavda KD, Chen L, Fouts DE, Sutton G, Brinkac L, Jenkins SG, Bonomo RA, Adams MD, Kreiswirth BN. 2016. Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: new insights into phylogeny, population structure, and resistance mechanisms. mBio 7:1–16. https://doi.org/10.1128/mBio.02093-16.
10. Sutton GG, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE. 2018. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. F1000Res 7:521. https://doi.org/10.12688/f1000research.14566.2.
11. Wu W, Feng Y, Zong Z. 2020. Precise species identification for *Enterobacter*: a genome sequence-based study with reporting of two novel species, *Enterobacter quasiroggenkampii* sp. nov. and *Enterobacter quasimori* sp. nov. mSystems 5:e00527-20. https://doi.org/10.1128/mSystems.00527-20.
12. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Pierard D, Ziesing S, Heesemann J, Roggenkamp A, Schleifer KH. 2005. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. J Clin Microbiol 43:3297–3303. https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3297-3303.2005.
13. Kremer A, Hoffmann H. 2012. Prevalences of the *Enterobacter cloacae* complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:2951–2955. https://doi.org/10.1007/s10096-012-1646-2.
14. Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJM, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M, MOSAR WP2, WP3 and WP5 Study Groups. 2015. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob Chemother 70:48–56. https://doi.org/10.1093/jac/dku359.
15. Haenni M, Saras E, Ponsin C, Dahmen S, Petitjean M, Hocquet D, Madec J-Y. 2016. High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. J Antimicrob Chemother 71:1497–1500. https://doi.org/10.1093/jac/dkw006.
16. Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Kajino A, Usui M, Tamura Y, Kimura Y, Miyamoto T, Tsuyuki Y, Ohki A, Kataoka Y. 2017. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Enterobacter* spp. isolates from companion animals in Japan. PLoS One 12:e0174178-12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174178.
17. Kraemer SA, Ramachandran A, Perron GG. 2019. Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. Microorganisms 7:180. https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180.
18. Gao P, He S, Huang S, Li K, Liu Z, Xue G, Sun W. 2015. Impacts of coexisting antibiotics, antibacterial residues, and heavy metals on the occurrence of erythromycin resistance genes in urban wastewater. Appl Microbiol Biotechnol 99:3971–3980. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6404-9.
19. Marcelino VR, Wille M, Hurt AC, González-Acuña D, Klaassen M, Schlub TE, Eden JS, Shi M, Iredell JR, Sorrel TC, Holmes EC. 2019. Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. BMC Biol 17:311–311. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0649-1.
20. Swift BMC, Bennett M, Waller K, Dodd C, Murray A, Gomes RL, Humphreys B, Hobman JL, Jones MA, Whitlock SE, Mitchell LJ, Lennon RJ, Arnold KE. 2019. Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. Sci Total Environ 649:12–20. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.180.
21. Guyomard-Rabenirina S, Dartron C, Falord M, Sadikalay S, Ducat C, Richard V, Breurec S, Gros O, Talarmin A. 2017. Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. PLoS One 12:e0173155-17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173155.
22. Guyomard-Rabenirina S, Reynaud Y, Pot M, Albina E, Couvin D, Ducat C, Gruel G, Ferdinand S, Legreneur P, Le Hello S, Malpote E, Sadikalay S, Talarmin A, Breurec S. 2020. Antimicrobial resistance in wildlife in Guadeloupe (French West Indies): distribution of a single $bla_{CTX-M-1}$/IncI1/ST3 plasmid among humans and wild animals. Front Microbiol 11:1524. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01524.
23. Guyomard-Rabenirina S. 2016. Résistance aux antibiotiques des entérobactéries en Guadeloupe: importance en milieu communautaire et diffusion environnementale. PhD thesis. Université des Antilles, Pointe-à-Pitres, Guadeloupe.
24. Ahlstrom CA, Bonnedahl J, Woksepp H, Hernandez J, Reed JA, Tibbitts L, Olsen B, Douglas DC, Ramey AM. 2019. Satellite tracking of gulls and genomic characterization of faecal bacteria reveals environmentally mediated acquisition and dispersal of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on the Kenai Peninsula. Mol Ecol 28:2531–2545. https://doi.org/10.1111/mec.15101.
25. Li J, Zhou L, Zhang X, Xu C, Dong L, Yao M. 2016. Bioaerosol emissions and detection of airborne antibiotic resistance genes from a wastewater treatment plant. Atmos Environ 124:404–412. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.06.030.
26. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2015. Clonal distribution of multidrug-

resistant *Enterobacter cloacae*. Diagn Microbiol Infect Dis 81:264–268. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.003.
27. Goldberg DW, Fernandes MR, Sellera FP, Costa DGC, Loureiro Bracarense AP, Lincopan N. 2019. Genetic background of CTX-M-15-producing *Enterobacter hormaechei* ST114 and *Citrobacter freundii* ST265 co-infecting a free-living green turtle (*Chelonia mydas*). Zoonoses Public Health 66:540–545. https://doi.org/10.1111/zph.12572.
28. Desvars-Larrive A, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Szostak MP, Spergser J, Feßler AT, Schwarz S, Monecke S, Ehricht R, Walzer C, Loncaric I. 2016. Urban brown rats (*Rattus norvegicus*) as possible source of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and meticillin-resistant *Staphylococcus* spp., Vienna, Austria, 2016 and 2017. Euro Surveill 24:1900149. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.32.1900149.
29. Bastian S, Nordmann P, Creton E, Malpote E, Thiery G, Martino F, Breurec S, Dortet L. 2015. First case of NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Caribbean islands. Int J Infect Dis 34:53–54. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.03.002.
30. Breurec S, Bastian S, Cuzon G, Bernabeu S, Foucan T, Galanth S, Naas T, Dortet L. 2015. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* in the Caribbean islands. J Glob Antimicrob Resist 3:217–218. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.04.004.
31. Siebor E, Neuwirth C. 2020. New insights regarding *Acinetobacter* genomic island-related elements. Int J Antimicrob Agents 56:106117. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106117.
32. Breurec S, Reynaud Y, Frank T, Farra A, Costilhes G, Weill F-X, Le Hello S. 2019. Serotype distribution and antimicrobial resistance of human *Salmonella enterica* in Bangui, Central African Republic, from 2004 to 2013. PLoS Negl Trop Dis 13:e0007917-13. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007917.
33. Pati NB, Doijad SP, Schultze T, Mannala GK, Yao Y, Jaiswal S, Ryan D, Suar M, Gwozdzinski K, Bunk B, Mraheil MA, Marahiel MA, Hegemann JD, Spröer C, Goesmann A, Falgenhauer L, Hain T, Imirzalioglu C, Mshana SE, Overmann J, Chakraborty T. 2018 *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection Sci Rep 8:5392. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23069-z.
34. Chakraborty S, Gogoi M, Chakravortty D. 2015. Lactoylglutathione lyase, a critical enzyme in methylglyoxal detoxification, contributes to survival of *Salmonella* in the nutrient rich environment. Virulence 6:50–65. https://doi.org/10.4161/21505594.2014.983791.
35. Baskaran S, Rajan DP, Balasubramanian KA. 1989. Formation of methylglyoxal by bacteria isolated from human faeces. J Med Microbiol 28:211–215. https://doi.org/10.1099/00222615-28-3-211.
36. Pai H. 2013. Multidrug resistant bacteria isolated from cockroaches in long-term care facilities and nursing homes. Acta Trop 125:18–22. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.016.
37. Criscuolo A, Brisse S. 2014. AlienTrimmer removes adapter oligonucleotides with high sensitivity in short-insert paired-end reads. Commentary on Turner (2014) Assessment of insert sizes and adapter content in FASTQ data from NexteraXT libraries. Front Genet 5:130. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00130.
38. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AY, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 19:455–477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021.
39. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29:1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086.
40. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res 3:124. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
41. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother 67:2640–2644. https://doi.org/10.1093/jac/dks261.
42. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother 58:3895–3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14.
43. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis–10 years on. Nucleic Acids Res 44:D694–D697. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239.
44. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen ANV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran H, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG. 2020. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res 48:D517–D525. https://doi.org/10.1093/nar/gkz935.
45. Didelot X, Wilson DJ. 2015. ClonalFrameML: efficient inference of recombination in whole bacterial genomes. PLoS Comput Biol 11:e1004041-18. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004041.
46. Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30:1312–1313. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033.
47. Letunic I, Bork P. 2019. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res 47:W256–W259. https://doi.org/10.1093/nar/gkz239.
48. Murray GGR, Wang F, Harrison EM, Paterson GK, Alison E, Harris SR, Holmes MA, Rambaut A, Welch JJ. 2016. The effect of genetic structure on molecular dating and tests for temporal signal. Methods Ecol Evol 7:80–89. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12466.
49. Didelot X, Croucher NJ, Bentley SD, Harris SR, Wilson J. 2018. Bayesian inference of ancestral dates on bacterial phylogenetic trees. Nucleic Acids Res 46:e134. https://doi.org/10.1093/nar/gky783.
50. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol 13:e1005595-22. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595.
51. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics 9:75. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75.
52. Galata V, Fehlmann T, Backes C, Keller A. 2019. PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. Nucleic Acids Res 47:D195–D202. https://doi.org/10.1093/nar/gky1050.
53. Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. 2011. BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. BMC Genomics 12:402. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402.
54. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res 14:1394–1403. https://doi.org/10.1101/gr.2289704.
55. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 9:357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923.

CHAPITRE 4

E. cloacae complex, diversité et résistance aux antibiotiques dans un contexte clinique.



Article n°3, en cours de finalisation, non validé par les pairs.

Contexte

En guise de fil conducteur, ce projet de thèse a notamment analysé la population d'*Enterobacter*. Les 2 précédents articles consacrés à ce complexe d'espèces ont pu mettre en évidence différents points :

- Tout d'abord avec la **Partie I**, dans un contexte « normal » : les souches humaines et celles des compartiments animaux et environnementaux étaient généralement séparées. La plupart des germes retrouvés appartenaient cependant aux metacluster *E. hormaechei*. Les résistances aux C3G associées à ce germe, hors contexte clinique, étaient essentiellement dues à une hyperproduction de leur céphalosporinase chromosomique et non à la présence de gènes transmissibles de type BLSE **(408)**.

- Dans le **Chapitre 3**, lorsque l'environnement est fortement soumis à la pollution anthropique (*i.e.* STEP), la diffusion de résistances vers les animaux est clairement accentuée (**Tableau 5**). Nous avons pu sur ce point souligner la présence d'une lignée d'intérêt clinique dans les 3 compartiments de la démarche One-Health **(385)**.

- Au niveau de l'hôpital, parmi les souches initialement séquencées des clusters *hsp60* C-VI et C-VIII, la présence de ST majeurs responsables d'infection et retrouvés à l'international a été soulignée (ST114, ST113 et ST90). Les secteurs de soins seraient probablement à l'origine des souches d'*Enterobacter* BLSE retrouvées ensuite dans les effluents. Parmi ces germes BLSE, il existait une prédominance de certains clusters (C-VI et C-UD4). En plus de la diffusion d'une lignée inféodée à l'homme dans les eaux usées et au sein des animaux vivant à proximité de la station, un plasmide de type IncHI2/ST1/$bla_{\text{CTXM-15}}$ a aussi circulé chez *Enterobacter* **(385,408)**.

L'un des objets de cette 3ème publication était de revenir à la source probable de diffusion de ces souches BLSE dans l'environnement : l'homme. Le but était de mieux comprendre la diversité des espèces composant ce complexe à l'hôpital. Nous avons également souhaité apprécier la présence d'un possible plasmide épidémique dans un plus grand nombre d'espèces du complexe, afin d'élucider la prédominance de certains clusters *hsp60* parmi les souches BLSE nosocomiales.

Démarche expérimentale

Dans ce projet rétrospectif, 136 souches d'ECC à l'origine d'une infection nosocomiale ont été collectées au laboratoire de microbiologie médicale du CHUG entre avril 2018 et août 2019. Ces isolats ont tout d'abord été regroupés selon leur phénotype de résistance pour les *β*-lactamines (C3G-S et C3G-R), et typés par la méthode *hsp60* décrite dans la **Partie I**. Ensuite afin d'affiner l'analyse et de comparer les données avec les conclusions du **Chapitre 3**, toutes les souches BLSE ont été séquencées indépendamment des résistances associées (n=58 ; **Figure 46**). Une démarche bio-informatique similaire au précédent chapitre a ensuite été mise

en place. Enfin, 4 souches de différentes espèces d'*Enterobacter* présentant un profils de gènes de résistance similaires ont été séquencées par l'approche nanopore suivie d'une reconstruction hybride pour apprécier les principales structures plasmidiques.

Résultats majeurs

Les résultats obtenus font l'objet d'un article qui sera soumis dans les mois à venir, **Nosocomial extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex members in Guadeloupe (French West Indies): emerging of a novel lineage and large spread of a *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$/IncHI2/ST1 plasmid**, et présenté ci-après.

- ✓ Les membres du complexe *E. cloacae* constituaient bien une population particulière en en termes de résistance et de distribution au sein de l'hôpital.
- ✓ Les clusters *hps60* les plus représentés parmi les souches BLSE étaient liés à la présence de quelques ST ou clones. La mise à jour de la distribution des clusters évoquée en **Partie I** a pris tout son sens dans ce contexte nosocomial puisqu'il a été possible d'identifier de nouvelles lignées BLSE largement représentées dans les infections en Guadeloupe (UD-4 / Clade L).
- ✓ Un plasmide « épidémique » IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTXM-15}}$ semblable à celui retrouvé chez ST114 pourrait être à l'origine du succès de ces lignées émergentes (**Chapitre 3**) **(385)**.
- ✓ L'origine humaine de ce plasmide est ici incontestable au vu des précédentes données au sein de la faune sauvage et des animaux domestiques en Guadeloupe **(43,185,187,343)**.
- ✓ Une étude plus approfondie de l'environnement des secteurs de soins semble primordiale pour identifier les points chauds de contamination et limiter la circulation des ST114 et ST1503 notamment, ainsi que du plasmide de résistance associé.
- ✓ Ce projet était centré sur des prélèvements infectieux mais il est aussi possible que ces germes circulent au sein de la communauté.

Original Research

Nosocomial Extended-Spectrum-*β*-Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* Complex Members in Guadeloupe (French West Indies): Emerging of a Novel Lineage and Large Spread of a *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$/IncHI2/ST1 Plasmid.

Authors and Affiliations*
*Only researchers who have read and validated the current version have been indicated.

Matthieu Pot[1], Yann Reynaud[1], Stéphanie Guyomard-Rabenirina[1], Antoine Talarmin[1], Sébastien Breurec[1,2,3]

[1]Transmission, Reservoir and Diversity of Pathogens Unit, Pasteur Institute of Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, France
[2]Faculty of Medicine Hyacinthe Bastaraud, University of the Antilles, Pointe-à-Pitre, France
[3]INSERM, Center for Clinical Investigation 1424, Pointe-à-Pitre/Les Abymes, France

ABSTRACT

From April 2018 to August 2019, a total of 136 strains of *Enterobacter cloacae* complex were randomly collected at the University Hospital Center of Guadeloupe to investigate the local bacterial population structure and diversity. Initial genetic identification of these nosocomial isolates was performed by the *hsp60* typing method which underlined the clinical relevance of *E. hormaechei* (n=70). Overall, among the third cephalosporins resistant strains, 58/95 were characterized as ESBL-producers and were further whole-genome sequenced using Illumina technology to appreciate clonal relatedness and resistance gene diffusion. We reported a limited genetic diversity within sequence types. ST114 (n=14), ST1503 (n=9), ST53 (n=5) and ST113 (n=4), which belonged to four different *E. cloacae* complex clades, were the most represented among collected ESBL-producers. The *bla*$_{\text{CTXM-15}}$ was the most prevalent ESBL determinant (56/58) and in most cases associated with an IncHI2/ST1 plasmid replicon carriage (36/58). To fully characterize the context of this predominant *bla*$_{\text{CTXM-15}}$/IncHI2/ST1 plasmid, 4 isolates from different ECC clades were additionally sequenced using Oxford Nanopore sequencing Technology to generate long-reads. Hybrid sequences analyses confirmed the circulation of a well-conserved plasmid between *E. cloacae* complex members. In addition, an in-depth analysis of the novel ST1503 and its associated clade (*i.e.* clade L) was performed due to its large and uncommon prevalence in nosocomial infections. These genetic observations were supported by the global incidence of nosocomial ESBL-*Enterobacteriaceae* acquired at this hospital during the study period which was clearly higher in Guadeloupe than in France mainland (1.59/1,000 hospitalization days in comparison to 0.52). This project revealed issues and future challenge for the management and surveillance of nosocomial and multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in the Caribbean.

INTRODUCTION

Enterobacter cloacae complex (ECC) members are ubiquitous and are comprised as intestinal commensal bacteria **(2)**. Thank to genetic approaches as the 60-kDa heat shock protein coding gene (*hsp60*) identification, and more recently whole-genome sequencing (WGS), the *Enterobacter* genus, especially species and subspecies belonging to the "*cloacae* complex", was revisited and taxonomy reclassifications were performed. The current ECC classification includes a total of 13 *hsp60* clusters related to 22 phylogenetic clades (A–V) **(2,59,64,69)**. Phylogenetic analyses are still ongoing, and another recent study, based on large computational approach has illustrated the difficulty of an accurate assignment, and possible future taxonomy updates **(70)**.

These bacteria are included in the ESKAPE group as important opportunistic clinical pathogens which could harbor a wide range of resistance genes **(74)**. Recently, the WHO releases a global priority list of antibiotic resistant germs, where third-generation cephalosporin resistant (3GC-R) ECC isolates were included in the critical priority group **(139)**. Resistances are mainly mediated by the overexpression of the chromosomic *ampC* gene coding for a cephalosporinase (CoP), or associated with the production of extended-spectrum-*β*-lactamase (ESBL) **(2)**. Plasmids are the main carriers of multiple resistance genes including ESBL in clinical strains, and represent an important vehicle for horizontal transfer of resistance genes within *Enterobacteriaceae* **(238)**. Until now, these mobile genetic elements have been difficult to study by high-throughput sequencing, as they assemble poorly based on short-read sequencing (*i.e.* Illumina), and their genomic fragments (contigs) can hardly be sorted from the chromosomal ones. Softwares based on different analytical approaches have been developed to predict plasmid related sequences in draft assemblies and plasmidome in metagenomic data (coverage analysis, chromosomal and plasmid marker genes, or *k-mer* frequencies signatures) **(261,268,298,299)**. Recent technological progresses and bioinformatics developments are also lifting these barriers to plasmid genomics studies, by combining for example high throughput sequencing and Oxford Nanopore sequencing Technology (ONT) to fully reconstruct plasmids **(296)**.

In comparison to other ESKAPE pathogen as *Klebsiella pneumoniae* complex, only few data are available on the importance of ECC in human infections in French West Indies and other Caribbean islands **(13,110,119)**. In Guadeloupe, we previously focused on ECC members' distribution in local fruits and vegetables, wild fauna, livestock, and in human infections. ESBL-producing ECC were globally restricted to human isolates, despite a high level of non-clinical 3GC-R isolates **(408)**. In addition, we also identified clinical relevant genetic lineages as ECC sequence type (ST) 114 in a continuum from clinical settings (hospital effluents) to the natural receiving environment, treated wastewater and wild animals living near the treatment plant **(385)**. All these elements suggest that the reservoir of ESBL-producing ECC is mainly human and that transfers from humans to animals and environment can occur under conditions of significant anthropic pressure. In this context, a well-conserved plasmid (IncHI2/ST1) carrying $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene was widespread among different ESBL isolates mostly assigned to ST114 lineage **(385)**.

On the basis of these initial observations, the overall objective of the present study was to use WGS to identify the genetic background of ESBL-producing ECC collected from patients admitted at the University Hospital Center of Guadeloupe (UHCG) during a 17 months study period. The secondary objectives were i) to study the genetic basis of 3GC-R ECC in order to investigate the spread of the well-conserved IncHI2/ST1 plasmid-carrying $bla_{CTXM-15}$, and ii) to determine the incidence of hospital-acquired ESBL-producing ECC associated with human infections in order to compare with what was observed for ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* complex, *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

MATERIALS AND METHODS

Data collection on ESBL-*Enterobacteriaceae* and MRSA

For comparison purpose between ECC and other relevant bacteria, an initial investigation concerning incidence of nosocomial MRSA or ESBL-*Enterobacteriaceae* acquired at the UHCG was performed between April 2018 and August 2019. During this 17 months period, all clinical metadata from MRSA and major ESBL-*Enterobacteriaceae* isolates collected from patients hospitalized for more than 48 hours were included. Community-acquired MRSA or ESBL-*Enterobacteriaceae* infections were excluded through this definition. Isolates from systematic colonization screening were not analyzed, and if more than one isolate belonging to the same species with the same antibiotic susceptibility pattern was recovered from the same patient, only the first was included. For each strain, metadata concerning the date of admission to the hospital, the hospital ward, the date of a positive specimen and the site of sampling were recorded. Incidence of MRSA and ESBL-*Enterobacteriaceae* infection was calculated per 1,000 in-hospital patient days.

Bacterial collection of clinical ECC strains and associated data

A specific focus was done on *Enterobacter* related strains from the previous set of data. A total of 136 clinical and non-duplicate ECC isolates were consecutively collected between April 2018 and August 2019 from patients admitted to the UHCG. Isolates were considered to be hospital-acquired using the same definition as described above. The study protocol was approved by the local ethics committee (reference A5_19_12_05_TRAMID). Briefly, after isolation, bacteria were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; AXIMA performance, Shimadzu, France). Then antimicrobial susceptibility analyses were carried out as recommended by the 2018 guideline of CA-SFM/EUCAST by using the disc diffusion method on Mueller-Hinton media. As most of the C3G-R *Enterobacter* overproduced their cephalosporinase, an additional investigation was done on Mueller-Hinton supplemented with cloxacillin to detect an ESBL-production (http://www.sfm-microbiologie.org). ECC isolates have been characterized for their resistance profile against β-lactam antibiotics as follow: wild-type (WT), CoP (without ESBL-production), ESBL- or carbapenemase-producer (CP). Metadata concerning sampling date, nature of the biological sample, and the hospital ward were anonymously recorded. Antimicrobial susceptibility results were given for the following antibiotic components: ampicillin (10 µg), amoxicillin – clavulanic acid (20 – 10 µg), ticarcillin (75 µg), temocillin (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefotaxime (5 µg), ceftazidime (10 µg), aztreonam (30 µg), cefepim

(30 µg), ertapenem (10 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), tigecycline (15 µg) and trimethoprim–sulfamethoxazole (1,25 – 23,75 µg).

DNA extraction and *hsp60* cluster identification

In addition to the routine species identification of ECC members using MALDI-TOF MS, partial hsp60 coding gene amplification and sequencing were carried out as previously described **(59,408)**. These amplicons were first submitted onto the hsp60ECCtool available on our Galaxy server at http://www.pasteur-guadeloupe.fr/karubionet.html. This web service is freely available after creating an account. It allows an easy ECC cluster level identification and species level prediction utilizing Abricate software and specific database. The tool includes a large panel of complete and no redundant sequences coding for the hsp60 coding sequence extracted from *E. cloacae* complex assemblies recovered in GenBank (July 2021, 194 sequences available). These references were sorted and identified at species, clade and cluster levels according to our previous work and different outstanding studies **(59,64,69,70)**. In addition, as previously done, a Maximum likelihood phylogenetic reconstruction was performed with RAxML with a 1,000 bootstrap replicates also with the same reference panel (See **Figure S1** legend for reference details) **(391,408)**. Then the phylogenetic tree was drawn using the online tool iTOL **(392)**. This extended reference panel was used to avoid any "atypical clustering" as previously mentioned **(60)**. The initial DNA extraction was done with the QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany).

Core-genome phylogenetic analyses of the ESBL-producers

To investigate the genomic dynamic of ECC members and their mobile genetic elements, WGS was carried out only on all recovered strains characterized as being ESBL-producer during the study period, except for the 24 previously sequenced isolates from Pot *et al.* studies **(385,408)** (supplementary **Data set S1**). These strains were sequenced at the "Plateforme de microbiologie mutualisée" from the Pasteur International Bioresources network (Institut Pasteur, Paris, France). Method and softwares used for short-read sequencing step were the same as a previously described pipeline **(43)**. Globally, we obtained a mean of XXXX bp paired-end reads with an estimate coverage of XXXX-fold (AlienTrimmer) **(386)**. SPAdes software was used for *de novo* assembling and quality checking was done with QUAST **(295,387)**. This step giving a N_{50} mean of 173,395 (minimum 79,193, maximum 323,676). In addition, mean BUSCO score was estimated as 98.7% of completeness (single-copy) **(388)**.

Phylogenetic identification was confirmed by using average nucleotide identity (ANI) with OrthoANI software against ECC clade references proposed by Sutton *et al.* We used cut-off values of ≥96% and ≥98% for species and subspecies delineation **(69,72)**. The assembled genomes were first annotated with Prokka software **(409)**. Then a global core-genome alignment was carried out with Roary **(389)**. Recombination elements were removed by using ClonalFrameML **(390)**. These steps giving a global alignment of 20,133 bp, with 1,932 genes shared by 100% of bacterial isolates. Finally the Maximum likelihood (ML) phylogenetic reconstructions performed with RAxML based on single nucleotide polymorphisms (SNP) in the core genomes (1,000 bootstrap replicates) was drawn with iTOL **(391,392)**.

Global phylogenetic analysis of ECC clade L

Due to the high and uncommon prevalence of ESBL-producing strains belonging to the "UD4" *hsp60* cluster recovered in our study, associated to ECC clade L strains (**Figure S1** and supplementary **Data set S2**), and to place these isolates into a global context, all WGS of ECC strains identified as belonging to this genogroup, with complete metadata (collection date, country, and origin), were downloaded from GenBank databases as on April 01, 2021. Most of the accession numbers of these strains were part from two complementary and recent studies **(69,70)**. In addition to the 20 international genomes, we added local previously sequenced ESBL-producing strains from Guadeloupe belonging to this clade and collected from hospital and urban wastewater samples (GENC165, GENC279 and GENC308) **(385)**. Moreover, wild-type resistance pattern *hsp60* "UD4" GENC015 and GENC224 strains recovered from other clinical isolates collected previously in Guadeloupe (**Figure S1**) were also sequenced (supplementary **Data set S2**) **(408)**. The N_{50} mean was equal to 372,251 for this collection (minimum 31,887, maximum 5,111,427). In addition, mean BUSCO score was estimated as 98.8% of completeness (single-copy) **(387,388)**. This second ML phylogenetic tree was created as described above. The core genome is composed of 1,895 genes shared by 100% of bacterial isolates, with a global alignment of 11,176bp. Finally we also conducted this analysis after excluding all *E. chengduensis* members, which was the least represented species, and we further conserved only "Taxon 4" according to Wu *et al.* references and the *in-silico* DNA:DNA hybridization (isDDH) value estimated by using Genome-to-Genome Distance Calculator online tool (http://ggdc.dsmz.de, ≥70.0% cut-off, *formula 2*) as proposed by authors **(70,71,410)** (**Figure S2**).

Sequence Type and serotype analyses, plasmid profile and genetic contents

For these two WGS analyses, the *in-silico* multilocus sequence typing (MLST) was done with MLST software (https://github.com/tseemann/mlst) against PubMLST **(67,393)**. In addition, all new ST profiles or alleles were submitted to this database (n=4). Antibiotic resistance genes content, and plasmid replicons were detected by using Abricate software (https://github.com/tseemann/abricate) associated with ResFinder and PlasmidFinder databases respectively (cut-off: ≥ 90.0% coverage and ≥ 70.0% nucleotide identity) **(268,293)**. ESBL-coding gene were predicted as to be plasmid or chromosomally-associated by combining different softwares (MOB-recon, PlasFlow, RFPlasmids) with default thresholds **(261,298,299)**. Location was considered to be acceptable when at least two software programs predicted the same result. In other cases, the ESBL-carrying contig was classified as "divergent".

Sequencing and synteny of a major represented plasmid

PlasmidFinder was used to identify an IncHI2 signature in 41 bacterial strains and among them, 36 were clearly typed as ST1 (pMLST, see supplementary **Table S1**) **(268)**. Such profile has been described in the previously assembled and annotated pGENC200 plasmid (GenBank accession number CP061495), isolated from a local clinical ST114 strains **(385)**. First we estimated the number of shared bases between new *Enterobacter* isolates' plasmid and the reference strain. To do so, putative plasmids were reconstructed by mapping trimmed-reads with Bowtie 2 against pGENC200 **(398)**. Selected mapped reads were assembled with SPAdes

and the quality of the assembly was checked with QUAST software against the local reference **(295,387)**.

To go further and appreciate structure differences, 4 strains from different ECC clade (GENC213, 405, 414, 423), were selected and fully sequenced by an ONT long-read sequencing approach (**Table S1**). Unicycler software was used to generate hybrid assemblies between Illumina and ONT data. Next, a syntenic analysis was done against the larger sequenced plasmid used as reference (pGENC414: 349,057pb). This step was performed with BLAST Ring Image Generator (BRIG) software **(411)**. Plasmid annotation was performed on RAST server and edited manually **(395)**. Finally, comparison of plasmids structure was performed and visualized with Mauve software **(400)**.

Data analyses

Data collection and associated analyses were performed with Microsoft Access 2003. The incidence of ESBL-producer cases per 1,000 patient days (PDs) at the UHCG has been calculated after sorting from GAM software (Management tool of medical, administrative and financial patient data). Pearson's $\chi 2$ or Fisher's exact tests were used to determine the significance of the different data (*p-values* < 0.05).

GenBank accession numbers and data availability

Clinical metadata, antibiotic resistance profile results, and partial hsp60 coding sequences of the 136 clinical ECC strains are available in supplementary **Data set S1.** The 37 new whole-genome sequences of ECC isolates (ESBL-producers + GENC015 and GENC224), and the 4 IncHI2/ST1 plasmids are deposited in GenBank database under BioProject no. PRJNAXXX, while the 23 previous analyzed clinical isolates and plasmid (n=1) were included on the PRJNA649757 and PRJNA659514 BioProjects. Corresponding accession numbers are listed in supplementary **Data set S1** for bacteria with ResFinder and PlasmidFinder outputs, and **Data set S3** for plasmids. Additional informations associated with ECC clade L analyses are presented in supplementary **Data set S2.**

RESULTS

Clinical incidence of hospital acquired ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and MRSA at the UHCG between 2018 and 2019

During the study period (17 months), a total of 330 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolates associated with nosocomial infections was recorded at the UHCG. The most represented species were *K. pneumoniae* complex (n=218, 66.1%) followed by ECC (n=72, 21.8%) and *Escherichia coli* (n=27, 8.2%). Other related species were *Citrobacter freundii* (n=5), *C. koseri* (n=4), *K. aerogenes* (n=3) and *Proteus mirabilis* (n=1). Most of these *Enterobacteriaceae* being isolated from urine (n=136, 41.2%), followed by catheters and other medical devices (n=68, 20.6%), and bacteremia (n=62, 18.8%). Overall, the ESBL-*Enterobacteriaceae* incidence was estimated at 1.59/1,000 hospitalization days. In detail, it corresponded to an incidence of ESBL-producing *K. pneumoniae* complex of 1.05, 0.35 for *E. cloacae* complex and 0.13 for *E. coli*. In contrast, a total of 50 MRSA isolates was recovered,

in agreement with the lower incidence (0.24/1,000 hospitalization days). Patient sex-ratio and median age were 1.84 and 65 years respectively.

***Enterobacter hsp60* distribution and antibiotic resistance patterns**

A total of 136 ECC nosocomial isolates were recovered, most of them were isolated from patients hospitalized in intensive care units (n=49, 36.0%), surgery (n=41, 30.2%) or medical wards (n=29, 21.3%). These bacteria were mainly isolated from urine (n=54, 39.7%), wound (n=24, 17.6 %), blood (n=23, 16.9 %) or medical devices (n=19, 14.0 %) (**Supplemental data set S1**). With regards to the antibiotic-resistance phenotype, 41 *Enterobacter* strains (30.1%) were characterized as wild-type against *β*-lactam antibiotics. The 3GC-R strains were associated with ESBL-production (n=58, 42.6 %) or CoP (n=37, 26.5 %), of whom one isolate (GENC133) was identified as carbapenemase producer as described previously **(385)**. Various levels of resistance against fluoroquinolones, gentamicin and trimethoprim–sulfamethoxazole were observed between 3GC-R strains (**Table S2**). Most of ESBL-producers were notified as being resistant to these antibiotics (n=42, 72.4 %). In global view, 3GC-R isolates were most common among urinary tract infection (44/56, 78.6%). Finally, in agreement with the previous paragraph, this bacterial collection reflected the clinical incidence of ESBL-producing ECC at the same period.

All clinical isolates were clearly assigned to an *hsp60* cluster. This assignation was first carried out with the approach proposed on the hsp60ECCtool, and confirmed on the basis of the reference used and bootstrap values in the phylogenetic tree (**Figure S1 and Data set S1.**) **(408)**. As expected, *hsp60* approach enable to provide greater resolution than MALDI-TOF MS for identification of species and subspecies. Among the 13 initial *hsp60* clusters related to *Enterobacter* genus, cluster III (*E. hormaechei* subsp. *hoffmannii*), C-VII (*E. hormaechei* subsp. *hormaechei*) and C-xiii (sequence crowd) were not recovered in this collection. Overall, the *E. hormaechei* related clusters were the most represented with C-VI, C-VIII (n=70, 51.5%) (**Figure 59**) **(64)**. Most of these isolates were characterized as 3GC-R (51/70, 72.9%). However, this observation was not species specific and when compared to other clusters this proportion was no significantly higher (44/66, 66.7%, *p=0.43*). Actually, the undefined *hsp60* clusters n°4 (UD4), which included ECC reference clades L recently identified by WGS accounted for 12.5% of the isolates (17 strains) and most of them were also 3GC-R (n=15, 88.2%).

ESBL-producing ECC populations' specificities

Due to the large distribution of ESBL-producing strains among ECC *hsp60* clusters (58/136), and similar antibiotic resistant phenotype, an in-depth analysis was carried out on these resistant strains (**Table S2**). First, core-genome phylogenetic analysis and MLST of the 58 strains revealed a limited diversity, as these resistant isolates belonged to 20 identified ST, the last one being not assigned to any ST (GENC209). The most represented were ST114 (n=14, 24.1 %) associated with clade A (*hsp60* cluster VI), ST1503 (n=9, 15.5%), associated with clade L (C-UD4), ST53 (n=5, clade J, C-I) and ST113 (n=4, clade B, C-VIII). (**Figure 60** and **supplemental data set S1**). Each *hsp60* clusters were correctly associated with related WGS clade including "UD4" **(69,408)**. In addition, 4 novel ST were characterized in this collection (*i.e.* ST1468, ST1537, ST1539 and ST1540). The detailed informations profiles of the seven

housekeeping genes used in the ECC MLST and ANI values against Sutton's clade references are presented in **supplemental data set S1**. Strains associated to the major STs seemed to be closely related, as suggested for ST114 (mean SNP between isolates n=60.5), ST1503 (n=15.2), ST53 (n=63.2) or ST113 (n=36). As they were recovered from different ward types of the hospital, core SNP values suggested an environmental reservoir, responsible of long-term transmission during this 17 months study. By focusing on the 2 majors ESBL-producing lineages, namely clade A and clade L, it was underlined that related bacteria were mostly isolated from urine associated infection sites (20/38, 52.7%) at medical wards or intensive care units (n=28, 73.7 %).

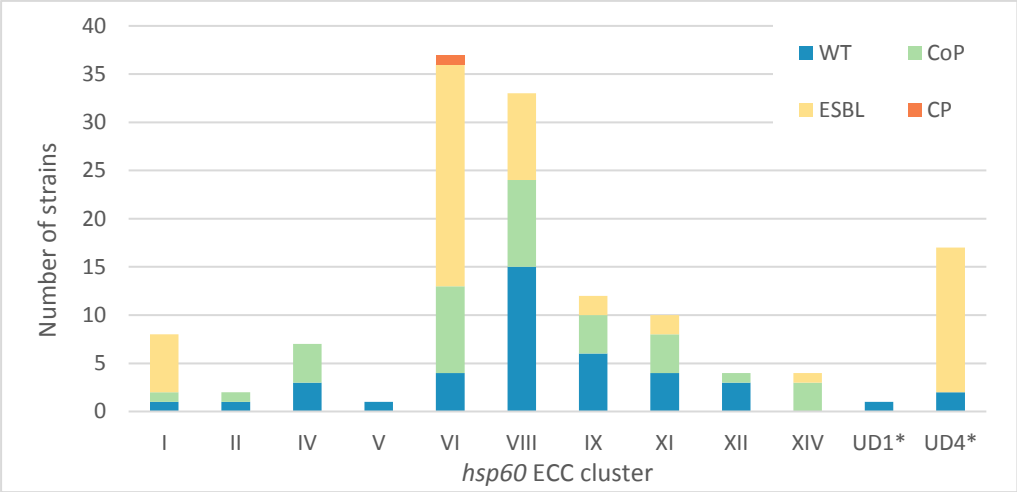


Figure 59. Distribution of 136 *E. cloacae* complex (ECC) members isolated from clinical samples. For each cluster recovered in this collection, nosocomial strains were grouped according to their resistance profile to *β*-lactam antibiotics: wild-type (WT), extended-spectrum-*β*-lactamase (ESBL), cephalosporinase overproduction without ESBL gene (CoP), or carbapenemase production (CP). Hoffman's cluster III (*E. hormaechei* subsp. *hoffmannii*), C-VII (*E. hormaechei* subsp. *hormaechei*), C-X (*Lelliottia nimipressuralis*, formerly *E. nimipressuralis*) and C-xiii (sequence crowd) were not recovered. Accession numbers of *hps60* sequences used as reference are detailed on **Figure S1**. Cluster XIV was defined according to Beyrouthy *et al.* and corresponded to ECC clade S **(64)**. *UD referred to "undefined *hsp60* cluster", and according to **Figure S1**, UD1 corresponded to ECC clade P and UD4 to ECC clade L (see previous **supplemental Figure 1**) **(408)**. Distribution was identical between **Figure S1** and the hsp60ECCtool output.

Sequence analyses and synteny of major *bla*$_{\text{CTXM-15}}$/IncHI2/ST1 plasmids

Overall, the majority of the ESBL-producing isolates harbored a *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene (96.6%, 56/58), and the last two strains possessed *bla*$_{\text{GES-7}}$ determinant (GENC084 and 220) (**Figure 60**). By using prediction tools, we were able to classify most of the ESBL-carrying contigs. Indeed, 79.3% (n=46) of them were predicted on the same location by the 3 softwares. The others were predicted on the same location with acceptable percent identity by 2 softwares (n=7), and only 5 isolates were not conserved for this analyze (different outcomes, percent identity under 70% when applicable). For these bacterial collection, ESBL genes where mostly predicted on plasmid sequence (40/53, 75.5%). The chromosomic location was predicted for different clades and especially clade A (7/13). The following ST114, ST171 and ST1537 were represented twice with this specific location (see **supplemental data set S1**).

Interestingly, independently to the previous prediction data, some strains not genetically related presented similar antibiotic resistance gene patterns, as previously described at the hospital in a local ST114 lineage **(385)**. Currently, in addition to genes coding for chromosomal AmpC, the *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ determinant and *mdf(A)*, *oqxA*/*oqxB*, the following genes were each present in more than 60% of the strains and confer resistance to aminoglycosides [*aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib-cr*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*], *β*-lactam class [*bla*$_{\text{OXA-1}}$, *bla*$_{\text{TEM-1B}}$], fluoroquinolones [*aac(6')-Ib-cr*, *qnrB1*], fosfomycin [*fosA*], sulfonamides [*sul2*], tetracyclines [*tet(A)*] and trimethoprim [*dfrA14*]. A truncated *catB3* gene was also highlighted (**Figure S3** and **supplemental data set S3**). These genes were identified in the different recovered clades, except for *E. bugandensis* (clade R) and *E. quasihormaechei* (clade S), which suggests a putative carriage by similar plasmid(s). Currently, most of these strains presented a PlasmidFinder and pMLST outputs indicating the presence of an IncHI2/ST1 plasmid replicon (n=36; allele profiles didn't enable us to determine IncHI2 ST for 5 strains, see **supplemental data set S3**).

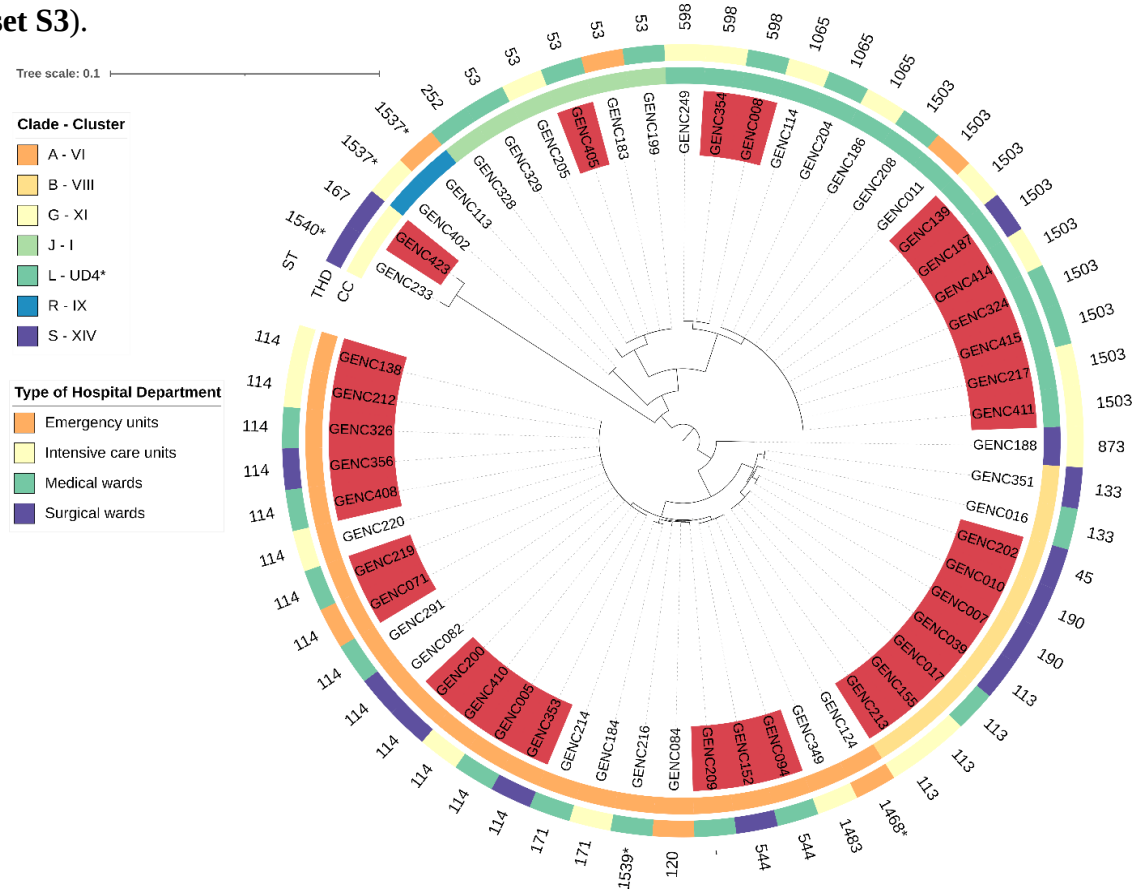


Figure 60. Maximum likelihood phylogenetic tree of clinical ESBL-producing *E. cloacae* complex (ECC) isolated between 2018 and 2019 in Guadeloupe. Whole-genome sequence phylogenetic tree was drawn by iTOL after Maximum likelihood phylogenetic reconstructions with RAxML software (1,000 bootstraps), from 58 genomes. The 4 new sequence types (STs) identified in this study are specified by a star. "Undefined *hsp60* cluster" number 4 (UD4*) was specified in previous paper **(408)**. The following metadata are indicated: the related ECC clades with the inner colored ring (CC) and the type of hospital department with the second one (THD). Strains with a *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene whose location has been predicted on a plasmid, and an InchI2/ST1 plasmid replicon were colored in red. These genes were identified by ResFinder and PlasmidFinder/pMLST respectively. Predictive association of contigs with plasmid location was done with MOB-recon, PlasFlow and RFPlasmid softwares. ANI values against ECC clades references and other genetic details are provided in supplementary **Data set S1 (69)**.

Reconstruction and mapping analysis using previous sequenced pGENC200 (291,493 pb) as reference, also suggested a possible carriage of these genes pattern on a similar mobile genetic element with 82.71 to 96.61% identity among the other ESBL-producing isolates with an IncHI2 signature (**Table S1**). By additional Illumina and ONT hybrid assembling, we were able to compare 4 new local plasmids recovered from different ECC members and to better investigate the presence of an "epidemic plasmid" in clinical isolates. Indeed, BRIG software allowed us to visualize a great similarity in the backbone structure. Different additional region were inserted in these plasmids resulting in variable length (from 291,493 to 349,057pb). Among them, an iron (III) transporter system in the larger plasmid pGENC414 was found (**Figures 61**, **S4**, and **supplemental data set S3**). Beside resistance genes to several antibiotics family, these plasmids encoded additional resistance determinants against heavy-metal ions previously characterized in pGENC200: arsenic [*ars*], mercury [*mer*, *tni*] and tellurium [*ter*], and also toxin-antitoxin system **(385)**.

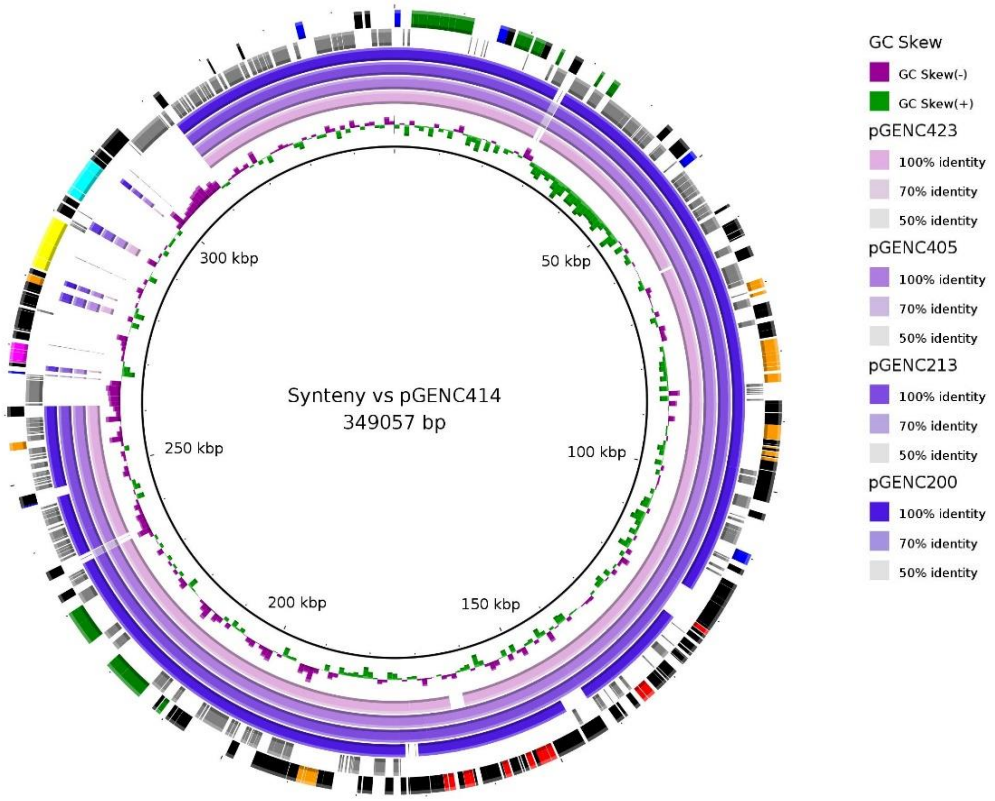


Figure 61. Syntenic analysis of 5 clinical IncHI2/ST1/CTX-M-15 plasmids. This figure was the output of BRIG software. The first black ring represents pGENC414 plasmid used here as reference, and the second ring indicated GC skew. This first plasmid was isolated from *E. cloacae* complex clade L ST1503 (GenBank accession number XXXX, recovered in July 2019). The others rings from the inner to the outer correspond to the following pairwise comparison with IncHI2/ST1 plasmids from other clinical ECC lineages isolated at the same hospital: pGENC423 (clade G, ST167, XXXX, August 2019), pGENC405 (clade J, ST53, XXXX, May 2019), pGENC213 (clade B, ST113, XXXX, November 2018) and pGENC200 (clade A, ST114, CP061495, October 2018). The last rings represented genetic map of pGENC414 with first hypothetical proteins in grey arrows. Then coding sequences in black arrows expect genes associated with antibiotic resistance (red), conjugation (green), formaldehyde detoxification (fuchsia), heavy-metal resistance (orange), Iron (III) transporter system (yellow), *lac* operon (aqua) and plasmid replication/partition/maintenance (blue). Plasmids genetic details and metadata are provided in supplementary **Data set S3**.

The specific case of ESBL-producing *E. bugandensis*

In the two sequenced strains identified as *E. bugandensis* (GENC233, GENC423, 18 SNP) with the new ST1537 (*dnaA*: 207; *fusA*: 18; *gyrB*: 166; *leuS*: 174; *pyrG*: 31; *rplB*: 189; *rpoB*: 29), no specific resistance gene was associated with $bla_{\text{CTXM-15}}$ except $bla_{\text{ACT-15}}$, *fosA* and *mdf(A)*. Chromosomal location for this ESBL determinant was suggested with two prediction softwares (MOB-recon; RFPplasmid > 0.8%) **(261,298)**. This prediction was also supported by its location in a large contig for both strains (*i.e.* 50,402bp), and a BLASTn analysis against NCBI database which matched with chromosomal genome of *E. bugandensis* isolates (best query coverage: 89%; nucleotidic identity: 97.17%; accession number: CP039453.1), despite the identification on an IncF-type replicon in another contig. Annotation and genetic context analysis of the ESBL gene for these two strains showed an identical integration mediated as follow: IS*Ecp1*-$bla_{\text{CTX-M-15}}$-*orf477*-Tn*2* (5,048pb) **(239,409)**. A local BLASTn comparison against other CTX-M-15-producing ECC underlined the same intact structure for 45 isolates.

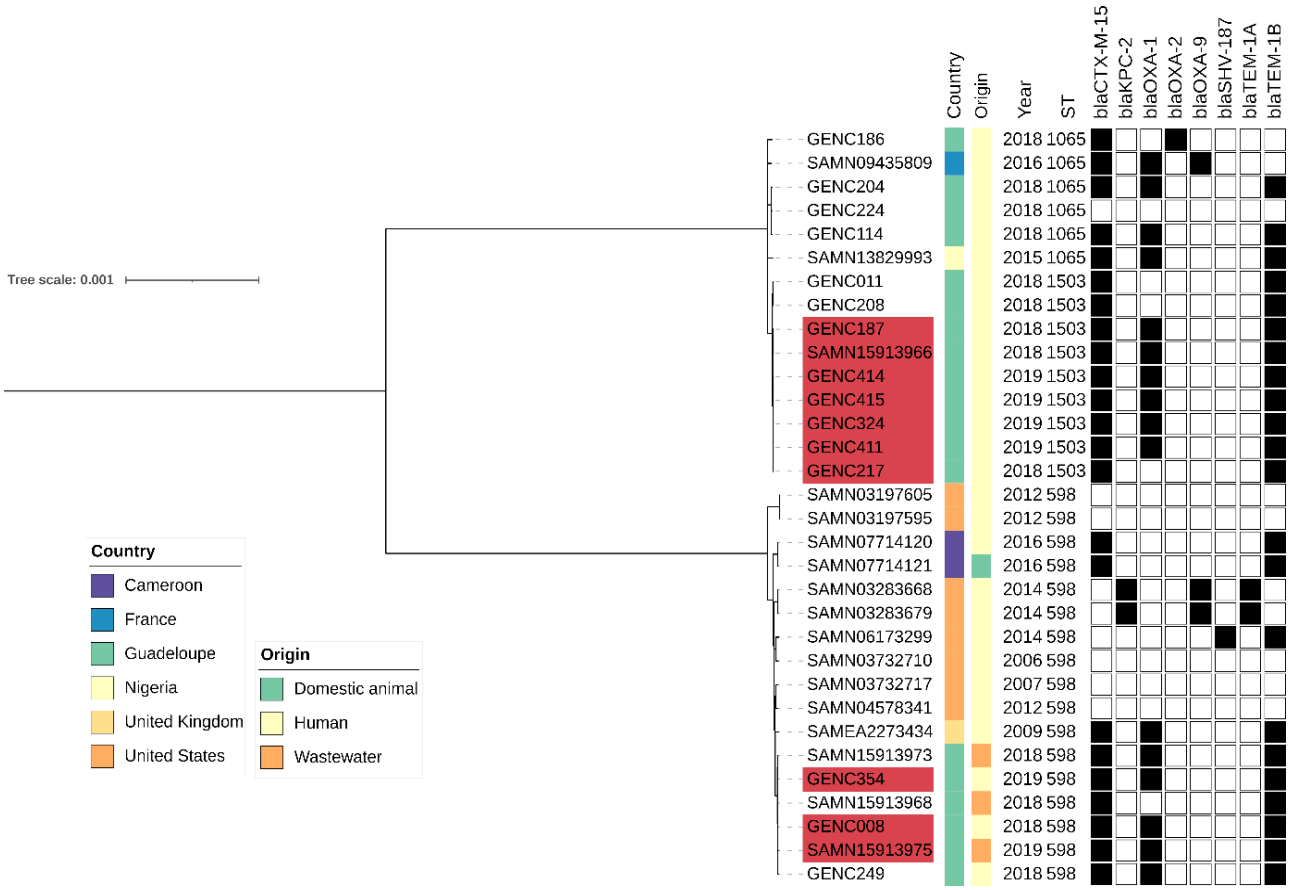


Figure 62. Maximum likelihood phylogenetic tree of *E. cloacae* complex (ECC) clade L – "Taxon 4" isolated in Guadeloupe (n=19) and worldwide (n=13) (69,70). Whole-genome sequence phylogenetic tree was drawn by iTOL after Maximum likelihood phylogenetic reconstructions with RAxML software (1,000 bootstraps), from 32 ECC clade L, "Taxon 4" recovered worldwide between 2006 and 2019. The tree was rooted at the midpoint and the following metadata are indicated: date of isolation, sequence type (ST) and antibiotic resistance genes presence in black squares. Only acquired genes that confer resistance to *β*-lactam antibiotics were included. Strains with a $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene whose location has been predicted on a plasmid, and an InchI2/ST1 plasmid replicon were colored in red. These genes were identified by ResFinder and PlasmidFinder/pMLST respectively. Predictive association of contigs with plasmid location was done with MOB-recon, PlasFlow and RFPlasmid softwares. All genetic details are provided in supplementary **Data set S1.**

Phylogenetic analysis of ECC clade L in Guadeloupe, and worldwide comparison

To place our ESBL-producing clade L collection into a global context, we compared them to international and other local genomes included in this clade **(69,70,385,408)**. Overall, the ECC clade L with complete metadata contained 40 isolates, including 16 from the present clinical study, 4 from a previous local screening in the hospital and urban wastewater continuum **(385)**. Among the 20 international strains retained for this analysis, most of them were isolated from humans (n=19), except for one collected from a pig (SAMN07714121). Different isolation sources were recorded from human, urine (13/36) and blood (n=7) being the most represented for this clade. Overall, these strains were isolated from 9 territories and the oldest one was recovered in 2006 in USA (SAMN03732710) (**Data set S2**).

Based on the antibiotic resistance profile, this analysis underlined the high prevalence of 3GC-R strains in the worldwide collection (11/20). Indeed $bla_{\text{CTX-M}}$ genes were identified in 7 strains, especially $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (6/7). Moreover, 4 strains (2 from USA and 2 from Columbia) harboring bla_{KPC-2} genes and one from China with bla_{OXA-48}, were characterized as carbapenem resistant. In Guadeloupe the 3GC-R isolates were also predominant (*i.e.* $bla_{\text{CTX-M-15}}$, 18/20). Moreover comparison with international clade L proved the predominant lineage at the hospital was currently limited through the island (ST1503), as well as the presence of an IncHI2/ST1 plasmid replicon (**Data set S2**).

ML phylogenetic analysis revealed clustering into 3 main branches (**Figure S2**). The first one contained 7 strains belonging to ST414 collected at the international and one strain with a new ST (*i.e.* ST1535) from Guadeloupe. These isolates were all recovered from humans and referred as to *E. chengduensis* species according to Wu W. *et al*., and were distinct to the others ECC clade L members (isDDH values ≥ 70.0% see **Data set S2**) **(70,410)**. The two other branches corresponded to clade L named "Taxon 4" in previous research paper (n=32), and were of particular interest (**Figure S2** and **Data set S2**) **(70)**.

Majority of these "Taxon 4" isolates belonged to ST598 (17/32; **Figure 62**). Among them, in Guadeloupean samples, this specific ST contained 3 ESBL-producing isolates recovered along the wastewater of the UHCG in 2018-2019 (SAMN15913968, SAMN15913973 and SAMN15913975), and 3 ESBL-producing strains isolated from patients during the same date period (mean SNP of all ST598 isolates from Guadeloupe, n=29.1, minimum n=15, maximum n=44) **(385)**. A more direct circulation between different compartments was also suggested with two strains ST598 from Cameroun (SAMN07714120 and SAMN07714121) isolated in 2016 from human and pig respectively (2 SNP; **Data set S2**). However, most of the clinical ECC clade L "Taxon 4" from Guadeloupe belonged to the recently defined ST1503 (n=9) and formed a cluster with ST1065 which were human specific until now (**Figure 62**).

DISCUSSION

Specific nosocomial incidence of some resistant ESKAPE pathogens

This study carried out at the UHCG during a 17 months period showed a high incidence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (1.59/1,000 hospitalization days) and a low incidence of MRSA infections (0.24) compared to those recovered in France mainland in 2018 (0.52 and 0.17 respectively) **(341)**. Among ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* (1.05), and ECC (0.35) incidences were higher in Guadeloupe than in France mainland, and lower for *E. coli* (0.13). It clearly underlies probable epidemiological specificities for this island **(341)**. Indeed, according the French national Spares surveillance, ESBL-producing ECC incidence was equal to 0.05 in 2018, lesser than those observed for *K. pneumoniae* (0.17) and *E. coli* (0.27). Similar observations were done with other national surveillance system **(39)**.

Local *E. cloacae* complex do not mirror the national population distribution

By using different and complementary sequencing approaches, we first investigated the *hsp60* cluster distribution of clinical ECC isolates from hospitalized patients at the UHCG. Although *hsp60* ECC clusters as defined by Hoffman *et al.* was a limited method which could be updated, it allowed a more accurate diversity characterization than traditional approaches and a good first step for preliminary inter-hospitals comparison **(59–62,408,412)**. Compared to a direct submission by BLASTn against the entire NCBI database, the web-tool developed here showed usefulness for a clear and easy identification of *hsp60* cluster in the *E. cloacae* complex (in-depth study in preparation). As other recent proposed method, this updated approach should be helpful for scientist community to rapidly sorted *Enterobacter* members for epidemiological and screening purposes **(65,407)**.

Due to the important changes in ECC assignment with the evolution of bioinformatic and genetic methods, we assume the use of different taxonomic approaches and vernacular names to link previous and future works on this genus. To date, associated misidentifications in clinic have no impact on antibiotic therapy, as strains identified here as belonging to *E. cloacae* complex globally harbored similar antibiotic resistance patterns. However, large emergence and spread of resistant plasmids and specific lineages could change this global observation in the future. The cluster distribution was concordant with observations in European studies, as highlighted by the high proportion of the successful C-VI and C-VIII (*E. hormaechei*) **(60,412,413)**. These related opportunistic pathogens were isolated in various sites of infection including invasive samples, the urinary tract being the most common. Although *E. hormaechei* was the most frequent species in our study, we noticed local specificities as the successful C-III was no represented here, in comparison to other previous French hospitals data **(60,62)**. Not surprisingly, other recent surveys suggest clear geographical variations in ECC distribution in human infections (*i.e.* C-II in China) **(61)**.

A long-term resistant lineage dissemination through hospital wards

WGS demonstrated a good clustering of ECC members as expected with initial observation on partial *hsp60* phylogenetic tree **(69,408)**. ESBL-producers sequencing indicated a circulation of several specific lineages in the hospital. Some members of the ECC have been recognized as nosocomial pathogens, and worldwide diffusion of specific lineages harboring a large panel of antibiotic resistance genes is still under characterization. Different clinical and also veterinary analyses revealed that ST113, ST114, ST133 and ST171 identified as part of

our study and belonging to *E. hormaechei*, are successful clones isolated worldwide **(79,82,83,198,413,414)**. In addition, among clinical relevant STs in our collection, ST53 (associated to *E. asburiae* or clade J) was initially described from clinical strains in Japan and presented a growing importance due to carbapenemase production, as also observed for ST873 (*E. quasihormaechei*, clade S) **(64,67,70,415)**. In our study, ESBL-producing clinical clones associated with ST114 and ST1503 were predominant. ST114 has been frequently reported and described worldwide in human, environmental and animal isolates as ESBL-producer. It has further often been associated with *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, which was also the most common ESBL determinant in our collection **(82,83,198,385)**.

On another hand, the second most prevalent ESBL-producing lineage was currently limited through the island (*i.e.* ST1503). As for ST114, corresponding strains seem to be well conserved through the sampling period (max SNP: 28) and were isolated from patients in different wards. Previous local analysis grouped these bacteria into an *hsp60* cluster named "UD4" and associated to clade L (confirmed by WGS ANI values, see **Figures 62, S2** and **supplemental data set S1**) **(69,408)**. As an accurate ECC identification is crucial to well monitor outbreaks, these in-depth observations underlined the usefulness of *hsp60* typing approach to well discriminate by an initial cheap screening this emergent clade. All new identified amplicons were added to the hsp60ECCtool database. Thanks to comparison with international published genomes collection, we identified few isolates within this clade, which also referred to *E. chengduensis* and ECC "Taxon 4" in recent analyses **(70,410)**. Human infections caused by these ECC members were rarely reported, and as far as we know, this is the first description of its wide nosocomial prevalence (17/136, 12.5%). It also clearly underlined the importance to phenotypically characterized ECC "Taxon 4" related strains in the future **(70)**.

The temporal isolation of the different resistant lineages indicated a possible long-term transmission with a sporadic presence and persistence in the nosocomial environment of different wards. Further studies are needed to understand ECC transmission pathways at the hospital (patient to patient, environment to patient) in order to propose specific infection control measures and to reduce in-hospital transmission **(64,210,416)**. However, it could not mirror the nosocomial situation in other medical centers through the island. Because of the interaction with other Caribbean islands, it is important to enlarge data collections to identified if specific lineages as ST114 and ST1503 are circulating and persisting as hospital-associated ESBL-producing strains, as it was described recently for *K. pneumoniae* complex in different Caribbean states **(110)**. Previous works in UK and Ireland indicated a great dissemination of some ECC clones and an inter-hospital connectivity **(413)**. The same observation was done for a successful ESBL-producing clone in China (*i.e.* ST591) **(61)**. Finally, a larger "one-health" approach could be really interesting to investigate a possible circulation and persistence in the environment, and a local community carriage **(13,385,408)**.

A successful *bla*$_{\text{CTXM-15}}$/IncHI2/ST1 plasmid is circulating in ECC nosocomial population

In this study, thanks to a first mapping approach and then a hybrid assembling, we confirmed a plasmid-borne dissemination of antibiotic resistance gene pattern associated with

the local development of some *E. cloacae* complex clades (*i.e.* A, B, G, J and L). The high prevalence of a well-conserved IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ plasmid in different ECC lineages suggests it key role in the expansion of novel *Enterobacter* lineages (*i.e.* ST1503). An IncHI2 signature have been frequently identified from ECC members in different clinical and veterinary studies worldwide, and was more recently associated with carbapenemase determinants **(61,64,81,82,413)**. Its large association to the *Enterobacter* genus remains unclear and needs further exploration.

Globally, this plasmid type is well-known to be present in a wide bacterial range, which could play an important role in critical resistance maintenance **(238,417)**. Fully sequenced IncHI2/ST1 plasmids obtained from ESBL-producing ECC of local wastewater and different animal taxa showed a high percent identity with international ones and raised concern about transfer though various compartments, hosts and bacterial species (> 99% nucleotidic identity over 88% coverage) **(385)**. Among them, conjugative transfer through other *Enterobacteriaceae* species has been clearly demonstrated (*i.e.* pEB-247, LN830952) **(81)**. However this event was underlined to be thermosensitive for this incompatibility group with a low range of temperature efficacy globally under 30°C **(81,238)**. The regulation process of conjugation for this incompatibility group is being clarified and according to the last study provided by Gibert M. *et al.*, the expression of a membrane protein (TrhR) and a cytoplasmic protein (TrhY), encoded in the plasmid, is associated with the activation of transfer operons (associated with *tra* genes) and by cascade effect with the initiation of its conjugation. The action of these two proteins is however regulated by different mechanisms. First, the HtdA protein partially counteracts the activity of TrhR/TrhY at low temperatures, whereas at higher temperatures (37°C), overexpression of an H-NS/Hha protein complex repress the gene encoding the TrhR protein and block transfer initiation **(279,280)**. This specificity was in accordance with an environmental conjugation but not in mammalian's gut.

The plasmid presented a toxin-antitoxin system and important genetic plasticity. For instance the iron (III) transporter system was also identified in a large similar IncHI2/ST1 (352,906 bp) plasmid recovered from a *Salmonella enterica* strain isolated in Kenya in 2003. As this previously sequenced mobile genetic element, pGENC414 also contained a complete *lac* operon and formaldehyde detoxification system but not the region with genes related to sucrose catabolism (percent identity of 89.25% between these two plasmids) **(417)**. This large "epidemic" plasmid type has numerous genes encoding to formaldehyde detoxification and resistance to different antibiotic families and heavy metal ions, which leads its hosts to develop in unfavorable conditions as wastewater or contaminated stream due to important exposome. However, its persistence in the nosocomial environment without specific selective pressure is still undefined **(258,418)**. Well-adapted bacteria in the clinical environment could be a major contributor to nosocomial outbreak and maintenance of this resistant plasmid and *vice versa* **(64,416,419)**.

Specific resistances and future critical points

In contrary to the persistence of *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ genes driven by an epidemic plasmid and different ECC lineages, no additional carbapenemase-producing strains was identified at the

UHCG during the study period. Since the only recovered carbapenemase-producing strain belonged to ST114, monitoring should be done to avoid the spread of this specific strains adapted to nosocomial environment. This observation underlined territorial specificities in comparison to other country were the incidence of carbapenemase-producing ECC and specific related STs is well documented and remains a growing public health issue **(198,210,414–416)**. Two strains related to an ECC ST171 clone (0 SNP), presented the *mcr-9* gene which could displayed colistin resistance. Additional screening of its contigs nature revealed that it was associated with chromosome for one strain (2 softwares; see material and method section). For the other isolate, results were not conclusive. IncHI2 plasmid typing for possible related mobile genetic element was also not clear and mapping with previous local sequenced one revealed differences in the hypothetic structure (percent identity < 83.06%, see **Table S1** and **Data set S3**). This resistance signature is of concern as, it was clearly underlined for *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ diffusion, and was recently notified to be present in wild fauna **(85,191)**. However *in-silico* analysis did not allow us to identify the *qseC/qseB* system generally associated with an up-regulation of this gene **(137)**.

Finally, until no long-reads sequencing was done to confirm predictions and BLASTn observations for the chromosomal location of *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ determinants in the two *E. bugandensis* related strains, particular attention needs to be paid to this probable specificity. Actually, this species is known to present a higher level of virulence in this complex and a growing importance in clinic **(70,76,81)**. That event could ensure a stable propagation of resistant strains without antibiotic pressure and a new problematic for the ESKAPE pathogens control **(241)**.

CONCLUSION

This project revealed for the first time in Guadeloupe, concerns about emerging ECC resistance clusters associated to successful plasmid. Thanks to different and complementary sequencing approaches, we carried out an in-depth analysis of the genomic context of *E. cloacae* complex between 2018 and 2019. Results on the ESBL-producing strains suggested the dominance of specific lineages with intra-hospital dissemination, and a large diffusion of a well-conserved IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ plasmid. By comparison with international data, we underlined a local emergence of a novel lineage. As several hospitalized patients were infected by similar clones carrying large antibiotic resistance genes pattern, comparison with other strains and species collection from hospitals and community surveillance should be done especially in the Caribbean. It will allow to better appreciate regional differences and possible spread of successful ESBL-producing lineages and associated plasmids in addition to the nosocomial environmental reservoirs screening.

CONFLICTS OF INTEREST AND FUNDING

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest. This work was supported by a FEDER grant (2018-FED-1084), financed by the European Union and the Guadeloupe Region.

CHAPITRE 5

Analyse approfondie de la collection d'*E. coli* BLSE et phylogénie.

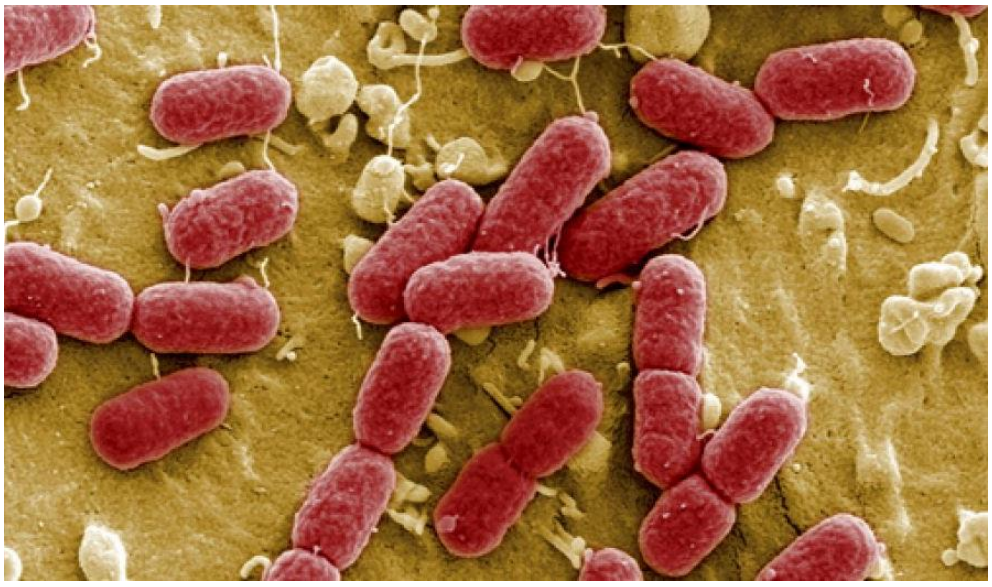


Image : https://www.slate.fr/story/39015/e-coli-escherichlia-coli-origine

I. Analyse phylogénétique

Le core-génome de la collection d'*E. coli* a été extrait avec Roary et les éléments de recombinaison supprimés avec ClonalFrame ce qui nous a donné un alignement global de 22 428 pb, avec 2 605 gènes partagés par 100% des isolats BLSE (n=137) **(389,390)**.

A) Contexte clinique initial

L'analyse phylogénétique fondée sur le core-génome des souches d'*E. coli* a révélé que les ST les plus représentés pendant la période d'étude parmi les isolats cliniques (n=41) étaient ST131 (31,7 %, n=13) et ST1193 (17,1 %, n=7). Les 19 autres ST n'ont été retrouvés qu'une ou deux fois dans cette collection humaine, dont 3 nouveaux : ST11364, ST11367 (lignées au sein du complexe clonal 86) et ST11368 (lignée au sein du CC131). Ces nouvelles souches ont été renseignées sur le site dédié : EnteroBase (https://enterobase.warwick.ac.uk/; **Figure 65**).

En se concentrant tout d'abord sur le CC131 chez l'homme (n=14), deux sérotypes complets et non-mixtes ont été observés : O25b:H4 (n=10) correspondant au clade C et O16:H5 (n=3 ; clade A). La dernière souche (GESC147) présentait un profil de type -H4 (**Tableau 12**). Les bactéries apparentées étaient pour la plupart isolées à partir d'infections urinaires (10/14). Le clade A était le plus polymorphe chez l'homme avec une moyenne de SNP de 426,5 (min : 369 ; max : 484). Le clade C ST131 strict présentait quant à lui beaucoup moins de polymorphisme (moyenne de SNP : 98,4 ; min : 7 ; max : 296), suggérant une circulation de clones au sein de l'établissement (**Tableau 10**). De même pour le ST1193, les 7 souches associées chez l'homme présentaient une moyenne de 23,1 SNP (min : 14 ; max : 30 ; **Tableau 13**).

La majorité des souches d'*E. coli* BLSE de l'hôpital était porteuse du gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (28/41). Ce gène a été trouvé en particulier au sein de la lignée ST131. Le deuxième gène codant pour une BLSE était $bla_{\text{CTX-M-27}}$, avec 10 souches et majoritairement associé au ST1193 (6/10). En ce qui concerne les autres résistances, les gènes *aac(3)-IIa* / *aac(6')-Ib-cr* / *aadA2* / $bla_{\text{OXA-1}}$ / $bla_{\text{CTX-M-15}}$ / *dfrA12* et *qnrB19* n'ont pas été retrouvés dans le clade A du ST131 en comparaison avec le clade C des souches humaines, traduisant un portage d'éléments génétiques différents au sein de ce complexe clonal. Par ailleurs les plasmides IncF associés étaient variés et n'étaient pas spécifiques à un clade (*i.e.* IncF RST, **Tableau 12**).

Tableau 10. Analyse du polymorphisme au sein des souches humaines associées au clade C du ST131. La matrice indique le nombre de SNP entre les isolats (n=10) ; la souche GESC320 (ST11368*-*H30*) n'a pas été considérée dans ce tableau ; LBA : lavage broncho alvéolaire, GB : glande de Bartholin ; * le secteur d'activité correspond au regroupement fait pour la **Figure 45** initiale.

Secteur d'activité*	Origine	Date d'isolement	Souche	GESC002	GESC023	GESC073	GESC095	GESC144	GESC147	GESC363	GESC380	GESC386	GESC391
Chirurgie	Sang	mai-18	**GESC002**		45	62	64	58	67	262	56	70	68
Médecine	Urines	jui-18	**GESC023**	45		73	75	71	78	273	65	81	79
Soins critiques	Urines	sep-18	**GESC073**	62	73		20	18	7	288	84	10	24
Urgences	Urines	sep-18	**GESC095**	64	75	20		20	25	290	86	28	26
Urgences	Urines	oct-18	**GESC144**	58	71	18	20		23	286	82	26	24
Médecine	LBA	nov-18	**GESC147**	67	78	7	25	23		293	89	15	29
Médecine	GB	avr-19	**GESC363**	262	273	288	290	286	293		284	296	294
Soins critiques	Cathéter	avr-19	**GESC380**	56	65	84	86	82	89	284		92	90
Médecine	Urines	juin-19	**GESC386**	70	81	10	28	26	15	296	92		32
Urgences	Urines	juil-19	**GESC391**	68	79	24	26	24	29	294	90	32	

Tableau 11. Analyse du polymorphisme au sein des souches humaines associées au ST1193. La matrice indique le nombre de SNP entre les isolats (n=7) ; LCR : liquide céphalo-rachidien ; * le secteur d'activité correspond au regroupement fait pour la **Figure 45**.

Secteur d'activité*	Origine	Date d'isolement	Souche	GESC071	GESC091	GESC092	GESC093	GESC145	GESC255	GESC384
Soins critiques	LCR	sep-18	**GESC071**		21	19	15	21	23	23
Urgences	Urines	sep-18	**GESC091**	21		28	24	26	28	28
Soins critiques	Urines	sep-18	**GESC092**	19	28		20	28	30	30
Médecine	Urines	sep-18	**GESC093**	15	24	20		24	26	26
Urgences	Urines	oct-18	**GESC145**	21	26	28	24		16	16
Urgences	Sang	fév-19	**GESC255**	23	28	30	26	16		14
Chirurgie	Urines	juin-19	**GESC384**	23	28	30	26	16	14	

Tableau 12. Caractéristiques des 25 souches d'*E. coli* du complexe clonal 131. Les souches en rose ont été isolées chez l'homme, les souches en jaune étaient présentes dans les eaux usées à différents points du continuum ; *le ST11368 fait partie du CC131, les autres isolats ont tous été affiliés au ST131 ; l'association des clades a été vérifiée par phylogénie (arbre non présenté ; références issues de https://doi.org/10.1038/s41598-019-54004-5) ; LBA : lavage broncho alvéolaire, GB : glande de Bartholin ; la localisation du contig portant le gène bla_{CTX-M} a été prédite selon la méthode décrite en page 136, « ** » seulement trois logiciels concordants, « – » sorties non-concordantes ; les couleurs des formules FAB sont associées au pMLST « classiques » des clades (voir **Figure 18**) ; les mutations chromosomiques associées à la résistance aux quinolones ont été identifiées par ResFinder/PointFinder et ne concernaient que le gène *gyrA* dans ce set de données.

Souche/Origine	Sérotype	*fimH*	ST131 Clade	*gyrA*		bla_{CTX-M-}			Prédiction de la localisation du gène bla_{CTX-M}	IncF RST
				S83L	S83L-D87N	15	27	55		
GESC107 – Site B	O16:H5			x		x			Chromosome	[F1:A1:B16]
GESC154 – Site B	O16:H5			x		x			Chromosome	[F1:A1:B16]
GESC174 – Urines	O16:H5			x			x		Chromosome**	[F29:A-:B10]
GESC024 – Site B	-:H5			x			x		–	[F2:A1:B10]
GESC045 – Site C	O153:H5	41	A	x			x		–	[F2:A1:B10]
GESC057 – Site C	O16:H5				x		x		–	[F1:A2:B20]
GESC140 – Site D	O16:H5				x		x		–	[F1:A2:B20]
GESC383 – Urines	O16:H5				x		x		–	[F35:A2:B20]
GESC003 – Urines	O16:H5				x			x	Plasmide	[F1:A2:B20]
GESC047 – Site B	O25b:H4		B			x			Plasmide**	[F29:A-:B10]
GESC002 – Sang	O25b:H4				x	x			Chromosome	[F-:A-:B-]
GESC023 – Urines	O25b:H4				x	x			Chromosome	[F-:A-:B-]
GESC030 – Site D	O25b:H4				x	x			Chromosome	[F-:A-:B10]
GESC095 – Urines	O25b:H4				x	x			–	[F31:A4:B1]
GESC363 – GB	O25b:H4				x	x			–	[F1:A1:B16]
GESC073 – Urines	O25b:H4				x	x			Plasmide	[F31:A4:B1]
GESC144 – Urines	O25b:H4				x	x			Plasmide**	[F31:A-:B1]
GESC147– LBA	-:H4	30	C		x	x			Plasmide**	[F31:A4:B-]
GESC152 – Site B	O25b:H4				x	x			Plasmide**	[F31:A4:B1]
GESC380– Cathéter	O25b:H4				x	x			Plasmide	[F2:A1:B-]
GESC386 – Urines	O25b:H4				x	x			Plasmide**	[F10:A-:B-]
GESC391 – Urines	O25b:H4				x	x			Plasmide	[F31:A4:B1]
GESC160 – Site C	O25b:H4				x		x		–	[F1:A2:B20]
GESC376 –Site D	O25b:H4				x	x			Plasmide**	[F-:A2:B20]
GESC320 [ST11368*] – Urines	O25b:H4				x		x		–	[F-:A2:B-]

B) Sérotypes, phylogroupes et séquence types entre compartiments

L'étude de la diversité au sein de l'espèce *E. coli*, est généralement effectuée à partir des profils MSLT ou des sérogroupes **(4,55)**. Ici nous avons souhaité détailler l'ensemble de ces informations pour mieux appréhender une possible diffusion de souches. Sur tout le continuum, les groupes O25, O8 et O1 étaient les plus représentés. Par ailleurs, nous n'avons pas clairement identifié le groupe O pour 46 souches et le type H pour 2 isolats. Vingt-huit sérotypes O:H complets et non-mixtes ont été identifiés parmi les 137 souches séquencées. Ces sérotypes représentaient 60,6% de la collection (n=83), avec une prédominance d'O25b:H4 (n=15), O1:H28 (n=12) et O8:H12 (n=10). Ils étaient associés aux ST131, ST6745 et ST3580 respectivement. Parmi les sérotypes complets chez l'homme on retrouvait surtout O25b:H4 (10/25), tout comme dans les eaux usées (5/26). Le sérotype O1:H28 a été identifié chez des souches d'animaux domestiques (9/12), tandis que le O8:H12 provenait des isolats de la faune sauvage (6/20). La **Figure 63** ci-dessous représente la distribution de ces derniers.

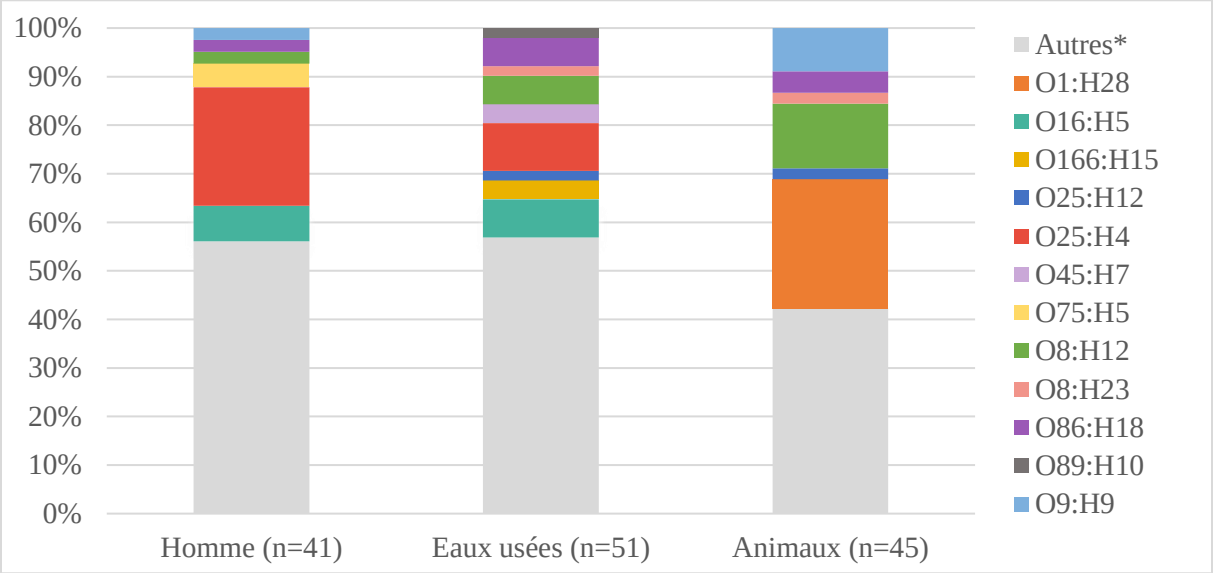


Figure 63. Répartition des principaux sérotypes d'*E. coli* BLSE dans la collection ECHANGENE. Les sérotypes complets et non-mixtes retrouvés au moins 2 fois dans la collection sont indiqués ; * l'indication « Autres » inclut le reste des isolats (incomplets ou solitaires) ; tous les animaux ont été regroupés.

Selon les compartiments et le phylogroupe qui ont été considérés, les souches étaient réparties de manière hétérogène. Les principaux phylogroupes identifiés étaient : B2 (30,7%), D (19,7%) et B1 (17,5% ; **Tableau 13**). Par ailleurs le phylogroupe B2 restait principalement associé à l'homme (65,9% des isolats humain). Il comprenait notamment les ST131 et ST1193 (**Figure 65**). Au sein des eaux usées la distribution des isolats en fonction du phylogroupe était plus homogène. Les phylogroupes D et B2 étaient prédominants (31,4% et 29,4%). Enfin le compartiment animal ne présentait pas de souche B2. Les principaux phylogroupes au sein de la faune sauvage et chez les animaux domestiques étaient le E et le B1 (31,1% et 28,9%). À noter que le phylogroupe E n'a pas été retrouvé dans les autres types de prélèvement en amont (**Tableau 13**).

Tableau 13. Répartition des souches séquencées d'*E. coli* BLSE en fonction des phylogroupes. La désignation des phylogroupes a été effectuée avec l'outil en ligne EzClermont ; U* correspond à unknown (en complément voir **Figure 65**) ; la colonne « Animaux » concentre la faune sauvage et les animaux domestiques du projet ECHANGENE.

Phylogroupe	Nombre de souches *(N=137)*	Origine N (%)		
		Homme *(N=41)*	Eaux usées *(N=51)*	Animaux *(N=45)*
A	17	1 (2,4)	10 (19,6)	6 (13,3)
B1	24	5 (12,2)	6 (11,8)	13 (28,9)
B2	42	27 (65,9)	15 (29,4)	
C	2	1 (2,4)		1 (2,2)
D	27	5 (12,2)	16 (31,4)	6 (13,3)
E	14			14 (31,1)
F	7	2 (4,9)	3 (5,9)	2 (4,4)
U*	4		1 (2,0)	3 (6,7)

L'analyse des phylogroupes et la comparaison entre souches d'*E.coli* cliniques et non-cliniques ont permis de souligner qu'une partie des isolats se trouvaient sur des branches distinctes de l'arbre phylogénétique selon le compartiment (**Figure 65 et Tableau 13**). Nous avons identifié 6 clades au sein de cet arbre. Le premier clade qui correspondait en grande majorité au phylogroupe B2 regroupait 44 souches. Dont la majorité appartenait au CC131 (25/44 ; **Tableau 12**). La plupart d'entre elles ont été isolées à partir des prélèvements infectieux (n=26) ou d'eaux usées (n=15). Une seule souche isolée chez un animal a été retrouvée dans ce clade (GESC250 – ST420). Par ailleurs, l'analyse *via* EzClermont n'a pas permis d'identifier le phylogroupe pour cette souches (noté U* ; **Figure 65 et Tableau 13**). Il en va de même pour une seconde souche provenant des effluents et du même ST (GESC356) **(396)**.

Le clade suivant incluait le phylogroupe F. Au total 6 souches étaient regroupées sur cette branche dont 1 seule humaine. Ensuite, le ST38 qui correspond au phylogroupe D représentait la majorité du 3ème embranchement (16/27). Cette branche comprenait 16 souches provenant des différents points d'échantillonnage des eaux usées, 6 isolats de la faune sauvage et 5 échantillons de patients. La 4ème branche (phylogroupe E) comprenait une majorité de souches provenant d'animaux sauvages ou domestiques, et notamment le ST6745 (13/15). Aucun isolat des eaux usées n'a été inclus au sein de cet embranchement et une seule souche a été retrouvée en clinique (GESC005 – ST1300). Elle a par ailleurs initialement été identifiée comme appartenant au phylogroupe F. Le cinquième clade englobait le phylogroupe A. Il y avait au total 11 ST différents sur les 16 isolats dont le complexe clonal 10 (ST10, ST34 et ST617). Une seule souche humaine a été incluse dans ce clade contre 6 isolats de la faune sauvage et 9 des eaux usées. Enfin, le dernier clade était majoritairement représenté par le phylogroupe B1 (24/29). Deux souches provenaient du phylogroupe C, une du A et deux n'ont pas été identifiées (notées U* ; ST7472). Ce dernier embranchement comprenait principalement des souches d'origine animale (n=16), suivi par des souches des eaux usées (n=7) et de l'homme (n=6). Ce clade était le deuxième qui incluait des souches d'animaux domestiques (ST2179 ; n=3) après le clade n°4. Le ST3580 était le plus représenté avec 10 souches. De façon générale,

le clade n°4 était le moins polymorphe (moyenne de SNP entre les isolats n=4 820, minimum=0, maximum n=20 243), suivi par le clade n°1 (moyenne de SNP entre les isolats n=11 555, minimum=0, maximum n=18 599). La plus grande diversité a été retrouvée pour le dernier embranchement (moyenne de SNP entre les isolats n=16 657, minimum=0, maximum n=28 624).

Plusieurs ST (n=7) étaient communs entre les eaux usées et les échantillons cliniques (**Figure 64 et Tableau 13**), les eaux usées représentaient ainsi 33,3% de la diversité retrouvée chez l'homme pour *E. coli*. La diversité des souches BLSE au sein des eaux usées serait donc en partie à l'image de celle observée en clinique. Les lignées les plus fréquemment identifiées dans les infections étaient présentes dans les différentes étapes du process de traitement jusqu'à la sortie avant la mer (**Tableau 14**). C'était notamment le cas pour les ST131 et ST1193. Si l'on compare la diversité des souches BLSE au sein de la faune sauvage de la STEP, celles-ci avaient pour la plupart un ST différent, témoignant d'une circulation environnement → animaux plutôt que d'une circulation animaux → animaux pouvant influencer l'appréciation de la prévalence (**Figure 65**).

Ces observations phylogénétiques ont indiqué que même si certains phylogroupes de cette collection (*i.e.* B2 et E) étaient associés à une origine, des souches cliniques et non cliniques étaient également mélangées (**Figure 65**). Par ailleurs, en accord avec les travaux de Zhi *et al.*, nous avons recherché le biomarqueur *uspC-IS30-flhD* qui pourrait être associé à une population naturalisée d'*E. coli* dans les eaux usées **(29)**. Cette recherche a été effectuée *in silico* par un BLAST sur l'ensemble de la collection (primer). Aucun isolat n'était positif pour cette mutation. L'analyse MLST a identifié une diversité équivalente entre les trois collections avec 23 ST dans les effluents contre 21 chez l'homme et 20 chez les animaux. Parmi eux, seulement 3 étaient communs entre des souches de l'hôpital et animales. Ils correspondaient aux ST38 (n=2), ST69 (n=1) et ST3580 (n=1). Le **Tableau 14** focalisé sur les valeurs de SNP a confirmé un partage de souches entre les compartiments. Par ailleurs, le ST131 n'a pas été isolé chez les animaux tout comme le ST1193. En revanche, le ST6745 n'a pas été retrouvé dans les isolats humains ni dans les eaux usées, mais était fortement représenté dans la collection animale (13/45). Enfin, un nombre limité de clones résistants semblaient circuler chez les animaux domestiques échantillonnés (ST2179 et ST6745), contrairement aux animaux sauvages avec 19 ST. Plusieurs souches présentes chez les animaux sauvages avaient une origine associée aux eaux usées avérée si l'on compare les SNP entre ces deux collections (**Tableau 14**).

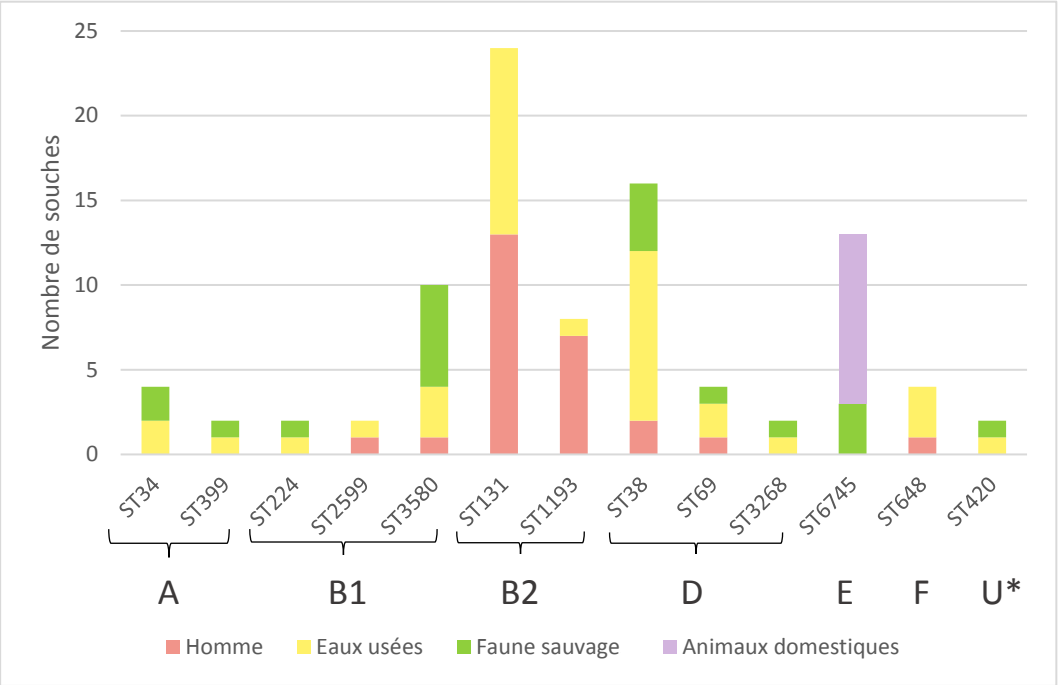
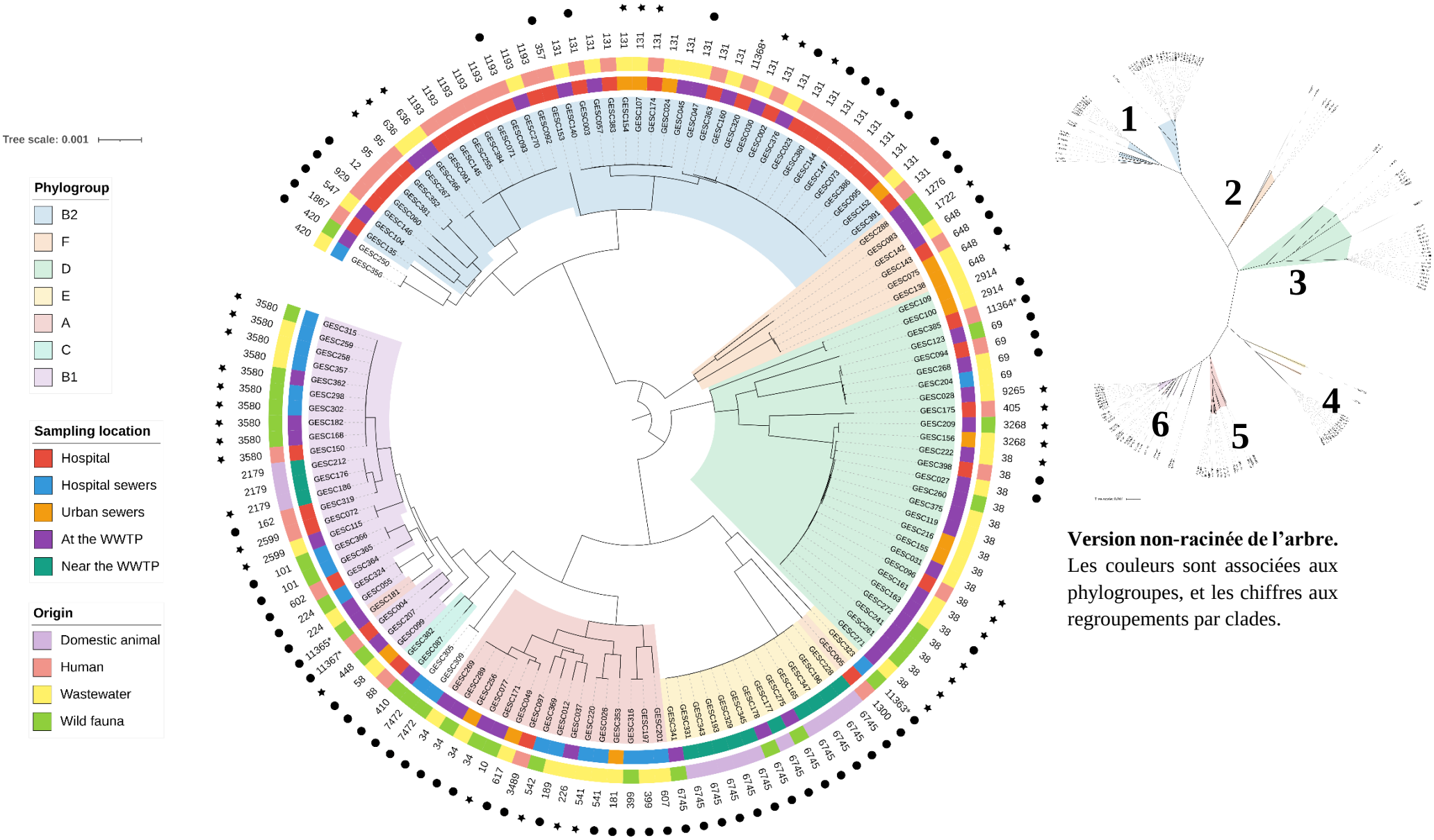


Figure 64. Distribution des séquences types retrouvés entre plusieurs compartiments. Les animaux domestiques et sauvages ont été séparés ; ces données ont été obtenues avec le logiciel mlst + pubMLST database (schéma MLST Warwick) ; au total cette figure représente 67,9% de la collection d'*E. coli* (n=93), dont 6 isolats du phylogroupe A, 14 du B1, 35 du B2, 22 du D, 13 du E, 4 du F et 2 notés U* (unknown).

Tableau 14. Clonalité entre isolats de différents compartiments. Le tableau inclus seulement les ST qui ont circulé le long du continuum des eaux usées et en dehors (voir **Figure 64** ci-dessus) ; la valeur minimale de SNP correspond à la comparaison entre deux souches de deux compartiments avec H pour l'homme, E pour les eaux usées, S pour la faune sauvage et D pour les animaux domestiques.

ST	Nombre de souches	Moyenne de SNP	Valeur minimale de SNP			
			H	H	S	S
			E	S	E	D
34	4	0			0	
38	16	1157,1	2	1	3	
69	4	2858,8	2683	0	2683	
131	24	2330,3	8			
224	2				29	
399	2				27	
420	2				49	
648	4	2858,8	1774			
1193	8	29,4	42			
2599	2		1			
3268	2				1	
3580	10	154,2	750	745	1	
6745	13	0,2				0



Version non-racinée de l'arbre. Les couleurs sont associées aux phylogroupes, et les chiffres aux regroupements par clades.

Figure 65. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des souches d'*E. coli* (n=137) BLSE isolées autour du continuum des eaux usées et en clinique. L'arbre a été réalisé *via* iTOL après des reconstructions avec le logiciel RAxML (1 000 bootstraps) basées sur des alignements de séquences multiples de 2 605 *loci* du génome central, avec une suppression des recombinaisons et un enracinement en point central ; les séquences types (ST) ont été identifiés avec le logiciel mlst + pubMLST database (schéma MLST Warwick) ; les 5 nouveaux ST sont marqués par un astérisque ; les phylogroupes sont indiqués sur chaque clade en rotation horaire et ont été identifiés avec le logiciel EzClermont : B2 n=42 ; F n=7 ; D n=27 ; E n=14 ; A n=17 ; C n=2 et B1 n=24 ; quatre souches n'ont pas été assignées (blanc) ; la prédiction de la localisation du gène codant pour la BLSE est indiquée par une étoile pour un contig chromosomique (n=40) et par un rond pour un contig plasmidique (n=69) ; cette prédiction tient compte de 3 résultats concordants sur les 4 outils utilisés (voir p136) ; parmi ces souches 28 contigs n'ont pas pu être correctement prédits (**Figure 55**).

II. Focus sur la résistance aux antibiotiques

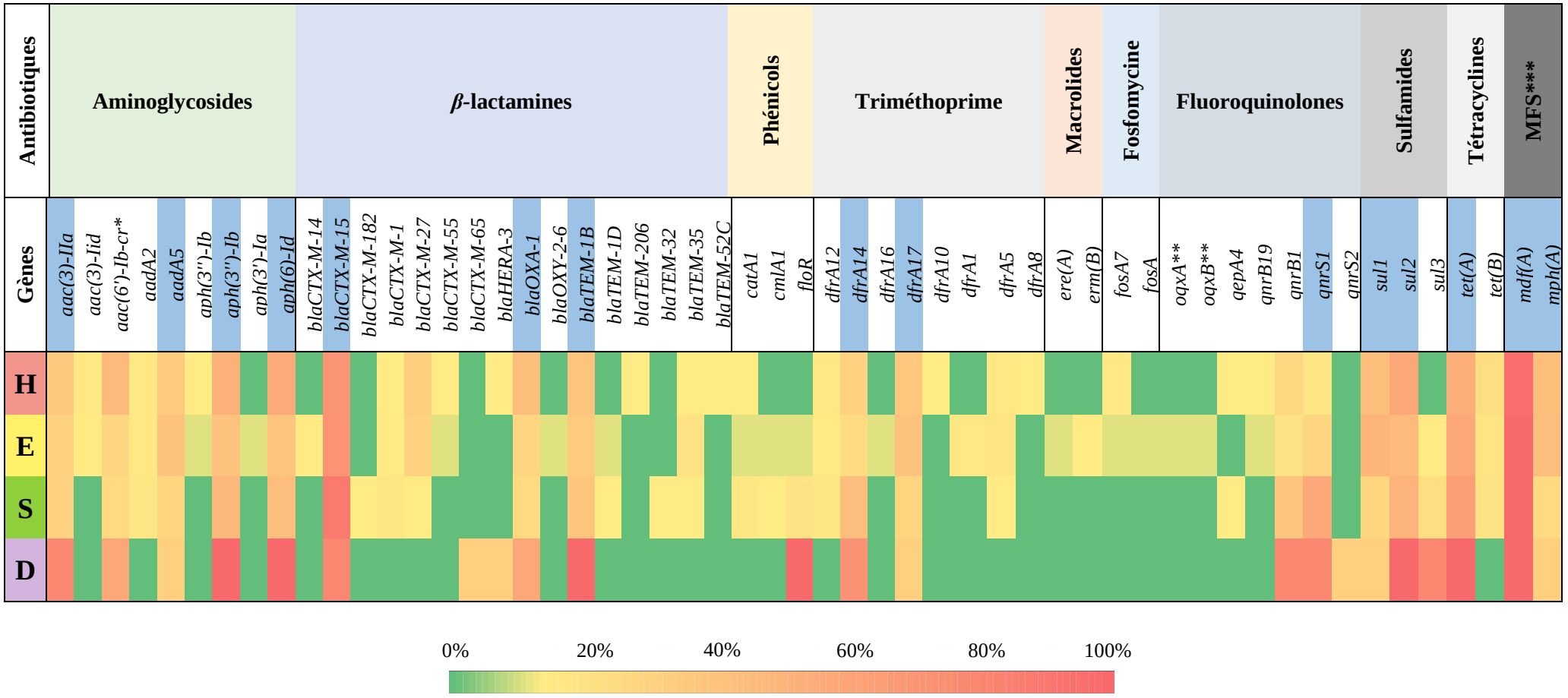
A) Gènes de résistance et compartiments associés

Au sein de la collection d'*E. coli*, un total de 54 gènes codant pour une résistance aux antibiotiques a été détecté (**Tableau 15**). Ces gènes étaient associés à une résistance envers 9 familles d'antibiotiques différentes. Une plus grande diversité a été retrouvée pour la famille des *β*-lactamines (n=16). Concernant les CTX-M, si l'on sépare les animaux domestiques de la faune sauvage, seul le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ a été retrouvé dans tous les compartiments. Les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ et *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ n'ont pas été retrouvés chez les animaux domestiques. Les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-182}}$ et *bla*$_{\text{CTX-M-65}}$ ont été identifiés dans un seul compartiment chacun, à savoir respectivement les effluents (n=2), la faune sauvage (n=1) et les animaux domestiques (n=3). Par ailleurs *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ (n=22) n'était identifiable qu'au sein d'un nombre restreint de ST : 38, 69, 95, CC131 et 1193. Les gènes codant pour la BLSE ont été prédits dans 29,1% des cas sur un chromosome (n=40 ; **Figures 55 et 65**). Cette localisation était majoritairement ST spécifique (*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$) avec notamment les ST636, ST2599, ST3268 et surtout le ST3580 (9/10). Les autres gènes BLSE ont été prédits sans ambiguïté sur une structure plasmidique dans 50,4% des cas (n=69 ; **Figures 55 et 65**).

À l'exception des gènes associés à une résistance aux macrolides qui n'étaient présents qu'au sein des eaux usées (n=3 ; 2,2%), les autres familles de gènes ont été retrouvées dans au moins deux compartiments. La résistance aux aminoglycosides était la seconde la plus retrouvée avec 65,8% des souches. Elle était notamment représentée par les gènes *aph(3'')-Ib* et *aph(6)-Id* (n=62 isolats chacun). Une prévalence équivalente a été retrouvée pour la résistance au triméthoprime (65,7%), avec en premier lieu les gènes *dfrA17* (n=38) et *dfrA14* (n=37). Quatre-vingt-neuf souches présentaient un des gènes associés à une résistance aux sulfamides (65,0%) avec principalement *sul2* (n=69) et *sul1* (n=46). Les gènes de résistance aux tétracyclines concernaient 63,5% des isolats avec majoritairement *tet(A)* (n=79) contre seulement 13 souches avec *tet(B)*. La résistance aux phénicols concernait trois gènes et seulement 23 isolats (16,8%). Le gène majoritaire pour cette famille était *floR*. À l'exception d'un isolat des effluents, ce gène a été retrouvé essentiellement chez des souches provenant des animaux (n=13 domestiques, n=3 sauvages). En revanche, le gène *catA1* a été identifié dans tous les compartiments en petite proportion (n=4). Enfin, les gènes de résistance à la fosfomycine (*fosA*-like) n'étaient pas présents chez les animaux et seulement en faible quantité (n=4 ; 2,9%) chez l'homme (n=1) et dans les eaux usées (n=3).

L'acquisition de gènes de résistance aux quinolones/fluoroquinolones représentait 56,9% des isolats (n=59). Les gènes *qnrS1* (n=40), *aac(6')-Ib-cr* (n=38) et *qnrB1* (n=32) étaient les plus représentés. Par ailleurs, l'évaluation des QRDR pour *E. coli* a permis de mettre en évidence que 51,8% des isolats présentaient au moins une mutation (n=71), avec une prévalence significativement supérieure chez l'homme (68,3%) par rapport aux autres compartiments réunis (44,8% ; *p=0.01*). Ces mutations étaient uniquement associées au gène *gyrA* et aux schémas suivant : D87N+S83L (n=43 ; 31,4%), S83L (n=19 ; 13,9%), S83A (n=8 ; 5,9%), ou D87Y (n=1 ; 0,7%).

Tableau 15. Abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques chez *E. coli* selon le compartiment. La prévalence a été calculée pour chacun des compartiments considérés, avec H pour l'homme (n=41), E pour les eaux usées (n=51), S pour la faune sauvage (n=32) et D pour les animaux domestiques (n=13) ; * le gène *aac(6')-Ib-cr* confère aussi une résistance aux fluoroquinolones ; ** les gènes *oqxA/B* codent pour un système de pompe à efflux susceptible d'apporter une résistance à d'autres familles ; *** MFS : Major Facilitator Superfamily, gènes associés à un système de pompe à efflux (non-spécifique) ; les gènes encadrés en bleu étaient présents dans plus de 25% des isolats de cette espèce.



B) Contexte plasmidique

Comme évoqué dans le **Chapitre 2**, les plasmides de type IncF étaient prédominants dans la collection (**Figure 57**). En effet, 73,7% des souches d'*E. coli* présentaient au moins un réplicon de cette famille (n=101). Les plasmides de type Col étaient aussi très fréquents (n=83 ; 61,0%). Ces 2 familles ont été retrouvées dans tous les compartiments analysés (**Tableau 16**).

Pour la famille IncF, 11 isolats avec un réplicon présentaient un schéma FAB de type [F-:A-:B-] (non-typable). Trente-neuf autres formules « mosaïques » ont été répertoriées, ce qui souligne la difficulté d'analyse des plasmides de cette famille. Cependant, comme le montre la **Figure 66** certaines spécificités ont pu être mises en évidence. Ainsi, les plasmides de type [F1:A2:B20] étaient uniquement retrouvés chez *E. coli* ST131 tout comme [F-:A1:B10] pour le ST1193. D'autres formules de typage à l'image du [F29:A-:B10] étaient identifiables au sein de différentes lignées. Enfin une formule généralement associée au genre *Klebsiella* a aussi été retrouvée dans cette collection : [K7:A-:B-] (**Figure 66**).

Au sein des 22 plasmides de type IncI1, la diversité était moins importante puisque 5 ST ont été identifiés. Quatre étaient de type ST3 et associés à la présence d'une CTX-M-1. Cette association a été retrouvée chez l'homme, (GESC364 – ST302), dans les eaux usées (GESC055 – ST224 et GESC099 – ST58) et chez un crapaud (GESC288 – ST1276). Un plasmide de type IncI1/ST26 était présent chez les animaux domestiques (ST2179 ; n=3) et chez l'homme (GESC382 – ST88). En ce qui concerne le schéma pMLST pour les plasmides de type IncA/C (n=1), IncHI1 (n=1) et IncN (n=2), les ST étaient inconnus **(268)**.

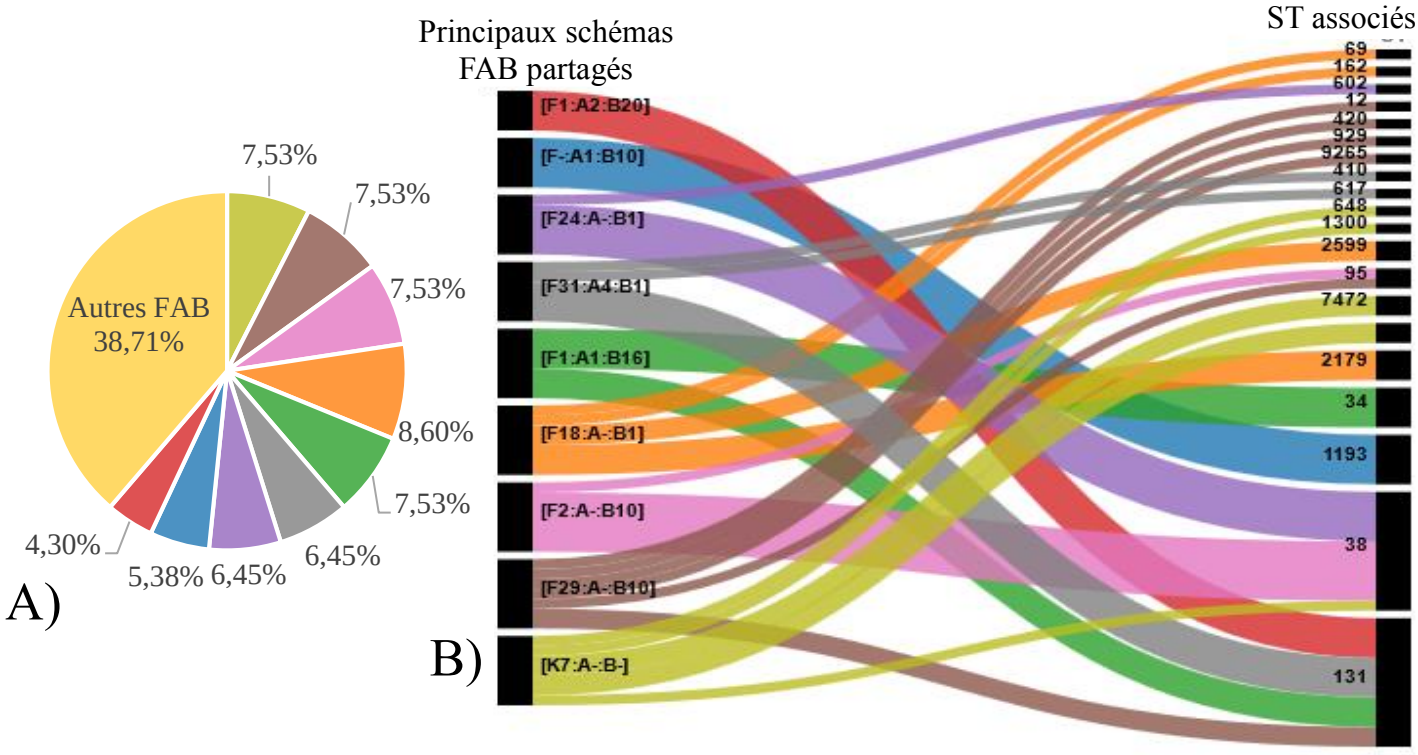


Figure 66. Distribution des principaux schémas FAB du groupe d'incompatibilité IncF chez *E. coli*. La prévalence des formules est indiquée en **A)** et a été calculée à partir des 93 souches ayant un réplicon IncF typable ; seules les formules retrouvées dans au moins 3 isolats ont été conservées, les autres sont regroupées dans la portion « autres FAB » ; la distribution selon les ST est représentée dans le diagramme **B)** (fait avec rawgraphs).

Tableau 16. Abondance relative des réplicons associés aux groupes d'incompatibilité plasmidique chez *E. coli* selon le compartiment (schéma PBRT). La prévalence a été calculée pour chacun des compartiments considérés, avec H pour l'homme (n=41), E pour les eaux usées (n=51), S pour la faune sauvage (n=32), et D pour les animaux domestiques (n=13) ; * la relaxase est indicative et a été prédite selon les données de la littérature pour chaque type de réplicon et la **Figure 16** ; ** plasmides de type MOB_P ou MOB_Q ; IncR et IncY ne font pas partie du schéma de typage DPMT pour les relaxases ; les réplicons encadrés en bleu étaient présents dans plus de 25% des isolats de cette espèce.

Relaxase associée*	MOB_F					MOB_H			MOB_P								**	MOB_Q	-	
Réplicon	IncF				IncN	IncA/C	IncH		IncI		IncX						Col-like	IncQ1	IncR	IncY
	IncFIA	IncFIB	IncFIC	IncFII			IncHI1	IncHI2	IncB/O/K/Z	IncI1	IncI2	IncX1	IncX2	IncX3	IncX4					
H																				
E																				
S																				
D																				

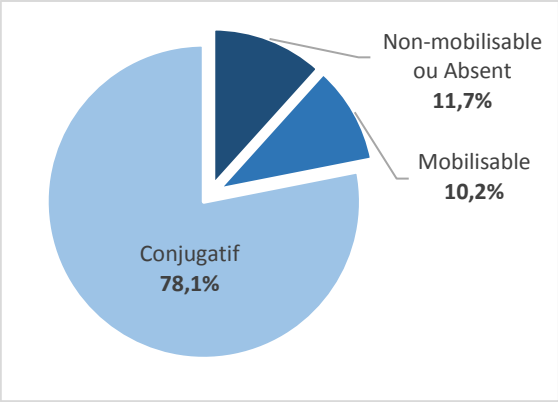


Figure 67. Types de plasmide portés par les souches BLSE. La prédiction a été effectuée par MOB-typer sur les 137 isolats.

La majorité des souches d'*E. coli* présentaient au moins un plasmide considéré comme conjugatif (78,1%). La prédiction MOB-typer a souligné qu'à l'exception d'une souche (GESC145), les isolats ST1193 présentaient un plasmide considéré comme non-conjugatif mais mobilisable (7/8). Sept autres *E. coli* étaient classés comme hôte d'un plasmide mobilisable. Enfin plus de 11% des bactéries ne présentaient soit aucune structure plasmidique identifiable, soit un plasmide non-mobilisable (n=16). La majorité des souches ST3580 étaient dans cette catégorie appuyant de nouveau l'hypothèse faite sur l'intégration chromosomique du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ au sein de cette lignée (8/9 ; **Figures 65 et 67**).

Tableau 17. Caractéristiques génétiques des isolats d'*E. coli* présentant un réplicon de type IncHI2. Les 22 souches proviennent de prélèvements uniques et les cafards* ont été capturés dans les égouts de l'hôpital ; les gènes de résistances ont été identifiés avec ResFinder leur présence est indiquée par une case rouge ; phylogroupe U : unknown (EzClermont), NT : non-typable (pMLST) ; Ph : phénicols, Ma : macrolides, Fq : fluoroquinolones, Te : tétracyclines, Mf : major facilitator superfamily ; ** le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ a été prédit sur une structure plasmidique pour 20 isolats (sauf GESC356 et GESC542 ; voir **Figure 65**) ; les gènes encadrés en bleu étaient présents dans plus de 90% des isolats de cette sélection.

							Aminoglycosides					β-lactamines			Ph		Triméthoprime				Ma	Fq		Sulfamides			Te		Mf
Origine	**Souche**	**Date**	**Phylogroupe**	**ST**	**SNP**	**IncHI2 DLST**	*aac(3)-IIa*	*aac(6')-Ib-cr*	*aadA2*	*aph(3'')-Ib*	*aph(6)-Id*	*blaCTX-M-15***	*blaOXA-1*	*blaTEM-1B*	*cmlA1*	*floR*	*dfrA12*	*dfrA14*	*dfrA16*	*dfrA1*	*ere(A)*	*qnrB1*	*qnrS1*	*sul1*	*sul2*	*sul3*	*tet(A)*	*tet(B)*	*mdf(A)*
Site A	**GESC012**	mai-18	A	189		1																							
Cafard*	**GESC324**	mar-19	B1	224		NT																							
Cafard*	**GESC316**	mar-19	A	399	27	1																							
Site A	**GESC197**	sep-18				1																							
Crapaud	**GESC250**	fév-19	U	420	49	1																							
Site A	**GESC356**	mar-19				1																							
Site A	**GESC026**	juin-18	A	541		1																							
Cafard*	**GESC369**	mar-19	A	542		1																							
Site A	**GESC201**	nov-18	A	607		1																							
Chien	**GESC165**	déc-18				1																							
Cochon	**GESC177**	déc-18				NT																							
Crapaud	**GESC178**	nov-18				1																							
Oie	**GESC193**	déc-18				1																							
Poule	**GESC196**	déc-18				1																							
Chien	**GESC228**	déc-18				NT																							
Merle	**GESC275**	fév-19	E	6745	Moyenne : 0,2	NT																							
Cochon	**GESC329**	mar-19				1																							
Cochon	**GESC331**	mar-19				1																							
Crapaud	**GESC341**	déc-18				1																							
Poule	**GESC343**	mar-19				1																							
Poule	**GESC345**	mar-19				1																							
Chien	**GESC347**	mar-19				1																							

Une autre famille de plasmide était particulièrement représentée en dehors du secteur clinique. En effet, un réplicon de type IncHI2 a été fréquemment retrouvé dans les eaux usées de l'hôpital (Site A ; n=5) et chez les animaux (n=17). Le schéma pMLST de ces éléments génétiques mobile a indiqué que 81,8% était du ST1. Les 4 derniers n'étaient pas identifiables (*i.e.* NT **Tableau 17**). À l'image du ST114 dans les précédents chapitres, le plasmide IncHI2/ST1 était spécifiquement associé à différents ST et notamment au ST6745 retrouvé au sein de la faune sauvage (n=3) et surtout chez les animaux domestiques (n=10). Un pattern de gènes de résistance semblable a été identifié dans la majorité de ces isolats, qu'ils soient d'une même lignée ou non, suggérant la présence de ces gènes sur un élément génétique mobile similaire. Cette localisation plasmidique a par ailleurs été prédite pour le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ chez 91,0% de ces souches **(Tableau 17 et Figure 65**). Afin de conforter cette observation un séquençage « long-reads » (MinION, nanopore) sera effectué ultérieurement au **Chapitre 7** pour comparer les structures plasmidiques.

III. Focus sur *E. coli* ST38

Le principal ST retrouvé entre l'homme les eaux usées et les animaux (sauvages) était le ST38 (**Figure 64**). De plus, ce ST était le plus représenté après le ST131, avec 16 isolats contre 24 pour le ST131. Afin d'approfondir cette lignée du phylogroupe D un second arbre phylogénétique a été construit en **Figure 68** (alignement global de 6 671 et 3 933 gènes partagés par 100% des isolats).

Un sérotype complet a été obtenu pour 6 isolats (O86:H18), et à l'exception du GESC398 (-H15) toutes les souches de ce ST avaient aussi un H-type -H18. Selon l'arbre phylogénétique obtenu, ce ST a pu être divisé en 2 principaux clades. Le 1er noté A) sur la **Figure 68** comprenait principalement des souches isolées au niveau des effluents (n=5) et une souche isolée d'un crapaud (animal n°15, GESC260). Toutes ces souches présentaient une *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ et un plasmide de type IncF a systématiquement été identifié avec le même profil FAB [F2:A-:B10]. Ce clade présentait une moyenne de SNP ajustée à 42,1. Le second clade noté B) incluait 8 souches, dont 4 isolats d'effluents, 3 souches d'animaux sauvages et une souche humaine. Les souches GESC261 et GESC272 provenaient également du crapaud n°15. La dernière souche animale (GESC241) a été isolée d'un merle. Les différences majeures avec le clade A) étaient la présence d'un gène de type *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ et d'un plasmide IncF avec le profil [F24:A-:B1] parmi 6 des 8 souches. Par ailleurs nous avons pu typer le gène *fimH* pour ce second clade (-H5) et seul ce clade présentait une mutation au niveau de la QRDR. Celle-ci était de type S83A pour *gyrA* (sauf GESC222 : S83L). Enfin pour 7 des 8 isolats du clade B le gène codant pour la BLSE a été prédit sur le chromosome. La moyenne de SNP ajustée était de 20,5, ce qui suggère comme pour le précédent clade une circulation des souches entre les différents compartiments. Deux autres souches : GESC398 et GESC222, n'étaient pas incluses dans ces clades et présentaient des patterns de gènes de résistance différents (**Figure 68**). Enfin, un gène *intI*1 était présent chez 50,0% (clade B).

Le portage de ces lignées chez 2 animaux sauvages de la station était clairement associé à leur environnement direct. Les souches GESC163, GESC271, GESC031 et GESC375 ont été isolées d'échantillons en sortie de STEP (*i.e.* Site D ; **Tableau 18**), ce qui pourrait entrainer une diffusion dans l'environnement marin. Le crapaud n°15 était porteur de 3 souches aux caractéristiques différentes. La première provenait du clade A) tandis que les deux autres étaient incluses dans le clade B). Ces dernières ne présentaient pas le même plasmide IncF : [F24:A-:B1] et [F35:A-:B-]. Ces souches ont été sélectionnées initialement car elles présentaient un phénotype de résistance différent (**Tableau 18**). La souche GESC272 après avoir changé d'élément génétique mobile a par ailleurs perdu les gènes suivant : $bla_{\text{TEM-35}}$, *sul1* et *dfrA5* en comparaison des autres membres du clade B). La même observation a été faite pour GESC241. Ce qui conforte l'hypothèse de la localisation chromosomique du gène de la BLSE au sein de ce clade et serait à l'image des dynamiques plasmidiques observables au sein du ST131 (**Figure 18**).

Une bonne concordance a été observée entre les phénotypes observés et les gènes de résistance retrouvés (**Tableau 18, Figure 68**). En effet seules les souches du clade B ont été notées résistantes à l'acide nalidixique par une mutation QRDR. La souche GESC222 qui présente un gène $bla_{\text{CTX-M-14}}$ était notée sensible à la ceftazidime. Toutes les souches avec un gène $bla_{\text{CTX-M-27}}$ étaient par ailleurs sensibles à l'augmentin. Des résultats discordants étaient observables pour la résistance au triméthoprime et à la gentamicine. Enfin comme pour le ST131 au **Tableau 12** aucune souche BLSE du ST38 n'a été identifiée au sein des eaux usées en sortie de l'hôpital (Site A), ce qui suggère que cet établissement n'est pas l'unique pourvoyeur de souches BLSE. Le milieu communautaire aurait aussi une incidence en plus d'autres établissements de soins sur la diffusion de ces lignées multirésistantes.

Tableau 18. Détails des antibiotypes des souches du ST38. Les souches en rose ont été isolées chez l'homme, les souches en jaune proviennent des eaux usées aux différents sites ; *un seul crapaud présentait 3 souches différentes ; les cases en rouge correspondent à un phénotype résistant et en vert sensible ; le clade réfère à la **Figure 68** ci-dessous.

Souche	Origine	Date	ST38 Clade	AMP	AMC	FOX	COX	CZD	FEP	ETP	NAL	CIP	GMN	AKN	TGC	SXT
GESC027	Site C	juin-18	A													
GESC260	Crapaud*	fév-19														
GESC375	Site D	mar-19														
GESC119	Site C	oct-18														
GESC155	Site B	nov-18														
GESC216	Site B	oct-18														
GESC398	Sang	aoû-19														
GESC222	Site C	oct-18														
GESC161	Site C	nov-18	B													
GESC096	Sonde	sep-18														
GESC271	Site D	fév-19														
GESC261	Crapaud*	fév-19														
GESC031	Site D	juin-18														
GESC163	Site D	nov-18														
GESC272	Crapaud*	fév-19														
GESC241	Oiseau	fév-19														

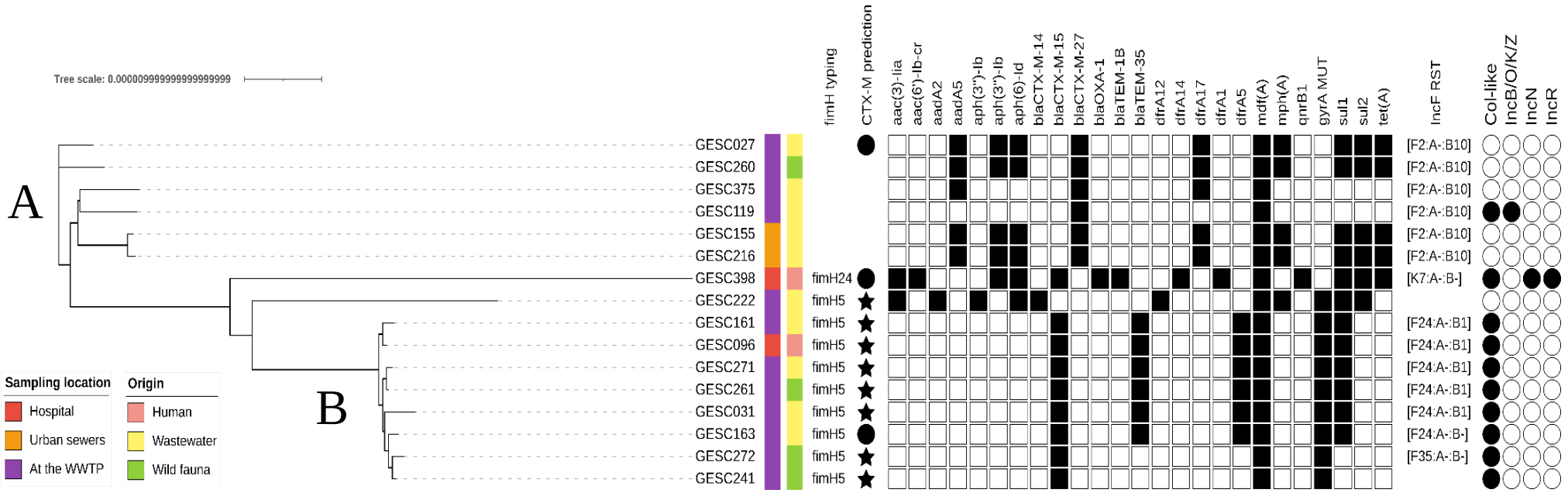


Figure 68. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance d'*E. coli* ST38 (n=16) BLSE isolées près du continuum des eaux usées et en clinique. L'arbre a été réalisé *via* iTOL après des reconstructions avec le logiciel RAxML (1 000 bootstraps) basées sur des alignements de séquences multiples de 3 933 *loci* du génome central, et suppression des recombinaisons ; le typage *fimH* a été positif pour 10 souches ; la prédiction de la localisation du gène codant pour la BLSE est indiquée par une étoile pour un contig chromosomique (n=8) et par un rond pour un contig plasmidique (n=3) ; Cette prédiction tient compte de 3 résultats concordants sur les 4 outils utilisés (voir p136), elle n'a pas été concluante pour 5 isolats du clade A) (**Figure 55**) ; la présence de gènes de résistance aux antibiotiques (carrés noirs), et les groupes d'incompatibilité plasmidique (ronds noirs) ont été identifiés respectivement par ResFinder et PlasmidFinder ; une mutation au niveau QRDR été identifiée pour le gène *gyrA* (« gyrA MUT » ; n=10) essentiellement de type S83A, excepté pour GESC222 (S83L) ; le schéma FAB est indiqué pour les 14 souches ayant un réplicon de type IncF (pMLST) ; le clade A inclus les souches GESC027 → GESC216 et le clade B les souches GESC161→ GESC241.

Points clés sur la phylogénie et les résistances retrouvées au sein de la collection d'*E. coli* productrices de BLSE.

- ✓ La diversité chez *E. coli* était plus importante qu'au sein de la précédente espèce analysée. Les résultats ont confirmé cependant que les animaux vivant autour du continuum des eaux usées présentaient bien des souches d'intérêt clinique et multirésistantes dans leurs fèces.

- ✓ A l'hôpital les infections à *E. coli* BLSE étaient essentiellement dues à deux lignées : le ST131 avec notamment le clade C et le ST1193. Ces lignées étaient bien retrouvées au sein des effluents et une diffusion au niveau du milieu naturel récepteur est possible. Par ailleurs, ces deux ST n'ont pas été retrouvés au niveau terrestre parmi les animaux étudiés.

- ✓ Les principales souches circulant entre animaux sauvages et domestiques appartenaient au même ST avec un fond génétique et une composition en éléments génétiques mobiles et gènes de résistances semblables (ST6745).

- ✓ Comme pour le ST114 chez *Enterobacter*, un plasmide de type IncHI2/ST1/$bla_{\text{CTX-M-15}}$ a été retrouvé dans le compartiment animal et dans les eaux usées. Cet élément génétique mobile était notamment associé au ST6745. Une analyse plus poussée par séquençage MinION est requise pour comparer les plasmides issus d'*E. coli* et d'*Enterobacter* puisqu'ils présentaient un pattern de gènes de résistance très proche (**Chapitre 7**).

- ✓ De nombreux isolats d'*E. coli* BLSE présentaient le gène $bla_{\text{CTX-M}}$ au niveau chromosomique (prédiction) ce qui correspond à une évolution plus stable des résistances et une autre future problématique. C'était notamment le cas pour le ST3580. L'environnement de ce gène sera approfondi par du séquençage « long-reads » (MinION, nanopore) au **Chapitre 7**.

- ✓ Le ST38 faisait partie des principaux ST ayant été retrouvés dans les eaux usées. Son origine humaine a été confirmée pour une des clades et sa propagation dans l'environnement de la station a été clairement établie.

CHAPITRE 6

Analyse approfondie de la collection de *K. pneumoniae* complex BLSE et phylogénie.



Image : https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/drigalski-mac-conkey-blse

I. Analyse phylogénétique de la collection

L'arbre phylogénétique de ce dernier genre analysé a été effectué sur une collection de 58 isolats : 16 cliniques, 20 des eaux usées et 22 d'animaux. Parmi les 7 phylogroupes du complexe, seulement 3 ont été identifiés par séquençage complet : *K. pneumoniae sensu stricto* (KP1, n=47), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KP2, n=5) et *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KP4, n=6). Cette première analyse a été faite sur un alignement global de 14 615 pb et 3 249 gènes partagés par 100% des isolats ; **Figure 69**). Aucune souche humaine n'a été assignée comme appartenant à l'espèce *K. quasipneumoniae.* Cette première observation souligne qu'à l'instar d'*E. cloacae* complex il est actuellement difficile de correctement assigner un nom d'espèce aux membres de ce complexe par des approches biochimiques et de spectrométrie de masse. En effet, l'identification initialement obtenue en laboratoire pour ces 11 *K. quasipneumoniae* était « *K. pneumoniae* ».

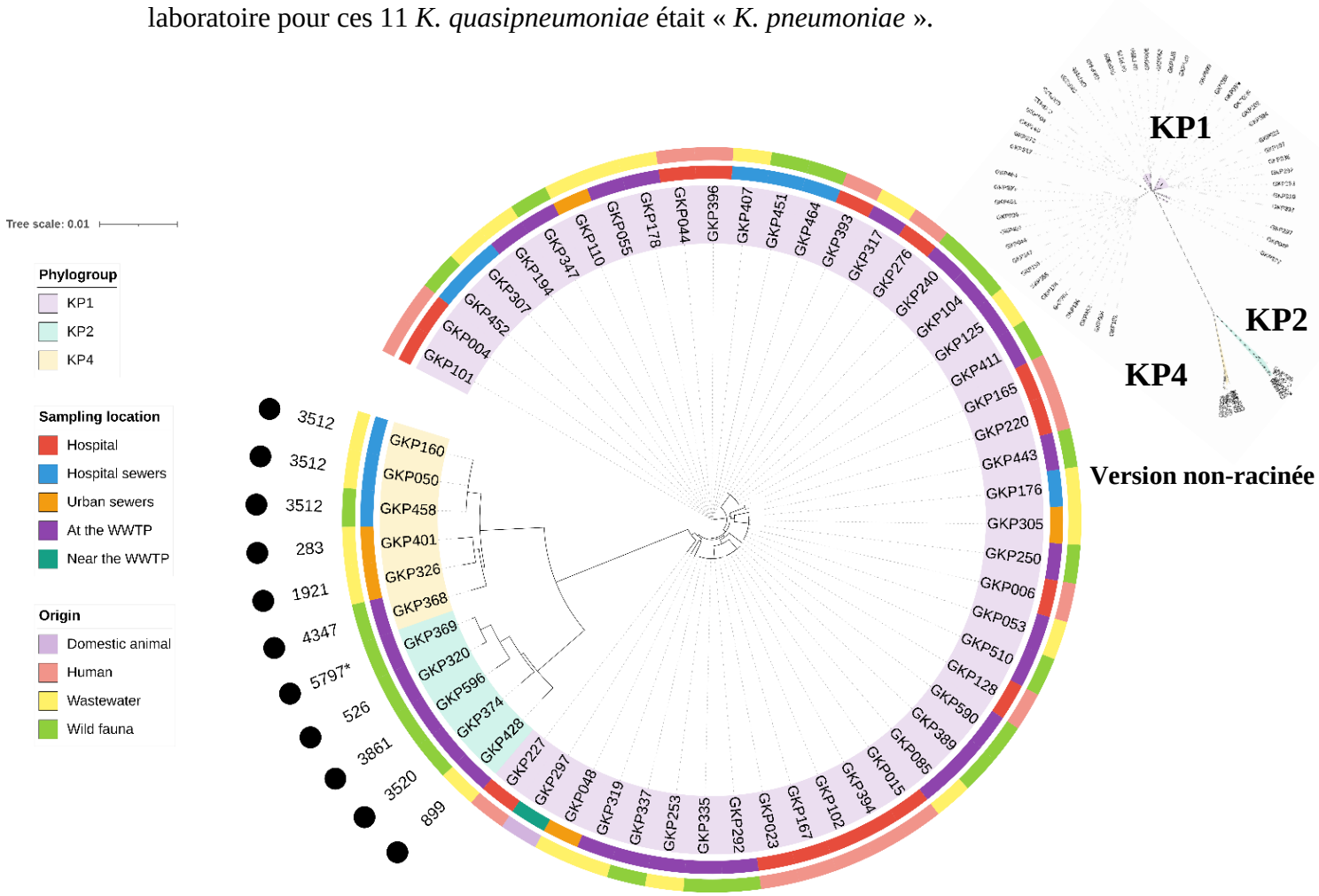


Figure 69. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des *K. pneumoniae* complex BLSE cliniques et non-cliniques. L'arbre a été réalisé *via* iTOL après des reconstructions avec le logiciel RAxML (1 000 bootstraps) basées sur des alignements de séquences multiples de 3 249 *loci* du génome central après suppression des recombinaisons ; les espèces et sous-espèces ont été identifiées avec le logiciel Kleborate et BIGSdb ; 47 souches sont associées à *K. pneumoniae sensu stricto* (Kp1), 5 à *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2) et 6 à *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4) ; l'origine des échantillons est précisée par une couleur spécifique avec 16 souches humaines, 20 des eaux usées, 21 de la faune sauvage et 1 souche d'un animal domestique ; seules les métadonnées de KP2 et KP4 sont indiquées avec un nouvel ST (astérisque) ; la prédiction de la localisation du gène codant pour la BLSE est plasmidique chez KP2 et KP4 (rond) ; cette prédiction tient compte de 3 résultats concordants sur les 4 outils utilisés (voir p136).

La diversité était peu importante avec 20 ST pour l'ensemble des isolats (**Figures 69 et 71**). *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* n'a été isolé qu'en début du continuum (Sites A et B) et chez 2 cafards capturés dans les égouts du CHUG (GKP458) et à la STEP (GKP368). Un de ces cafards présentait le même ST que des souches isolées dans les eaux usées de l'hôpital (n=2, ST3512 ; **Figure 69**). Ces isolats animal/effluents présentaient une forte similarité (min : 17 SNP ; **Tableau 19**). *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* n'a été retrouvé qu'au niveau de la STEP et en majorité chez des animaux, dont 3 oiseaux et 1 cafard (GKP374). La dernière souche provenait de la sortie du process de traitement (GKP428). Aucun isolat ne présentait le même ST pour cette sous-espèce (**Figure 69**).

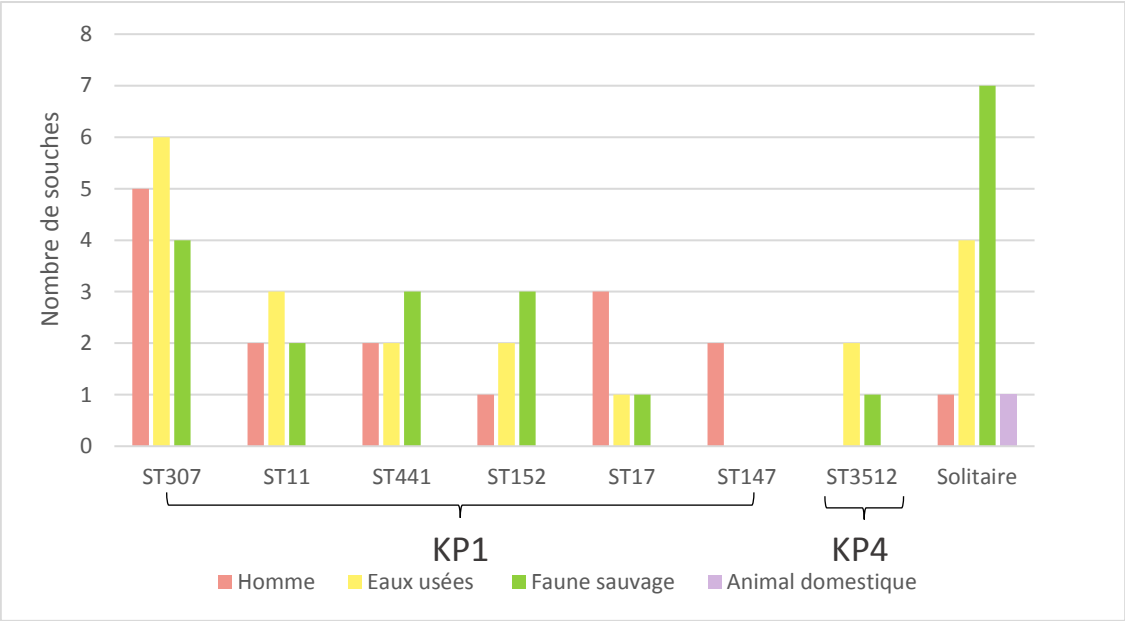


Figure 70. Distribution des Séquences Types (ST) des 58 *Klebsiella pneumoniae* complex séquencées selon l'origine du prélèvement. Ces données ont été obtenues avec le logiciel Kleborate et BIGSdb pour KP4 ; les ST « solitaires » (n=13) ont été regroupés.

Tableau 19. Clonalité entre isolats de *Klebsiella* de différents compartiments. Le tableau inclut seulement les ST qui ont circulé le long du continuum des eaux usées et en dehors (voir **Figure 70** ci-dessus). La valeur minimale correspond à la comparaison entre deux souches de 2 compartiments avec H pour l'homme, E pour les eaux usées, S pour la faune sauvage.

ST	Nombre de souches	Moyenne de SNP	Valeur minimale de SNP		
			H E	H S	S E
11	7	60,3	29	37	26
17	5	45,7	56	61	56
152	6	43	66	61	17
307	15	91,7	26	49	54
441	7	45,9	23	29	32
3512	3	36,7			17

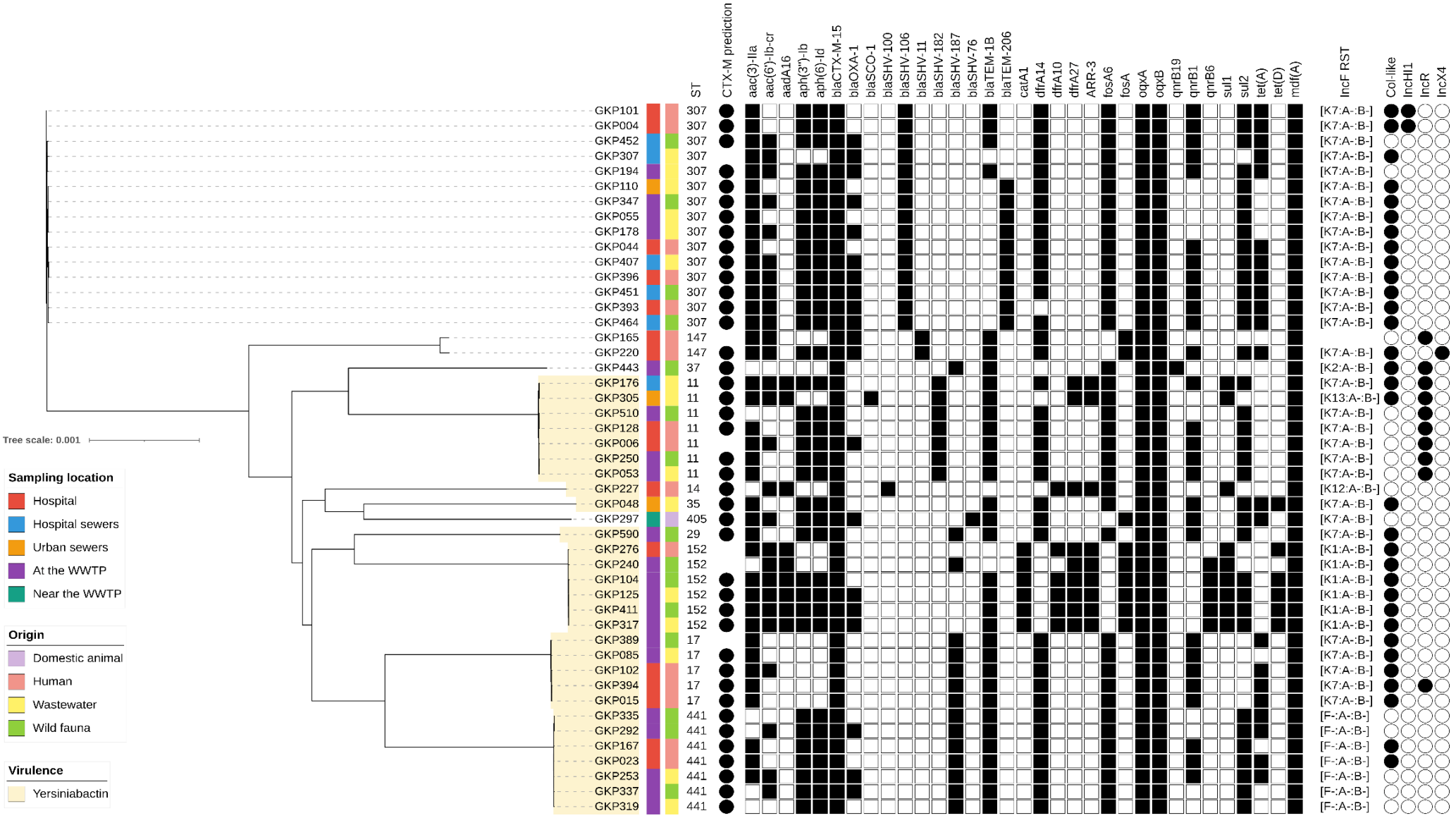


Figure 71. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance de *Klebsiella pneumoniae sensu stricto* BLSE (KP1, n=47). L'arbre a été réalisé *via* iTOL après des reconstructions avec le logiciel RAxML (1 000 bootstraps) basées sur des alignements de séquences multiples de 4 054 *loci* du génome central après suppression des recombinaisons ; les séquences types (ST) ont été identifiés avec le logiciel Kleborate tout comme la présence d'une yersiniabactine (n=28 ; jaune) ; le gène codant pour la CTX-M a été prédit sur un contig plasmidique pour 41 souches, cette prédiction tient compte de 3 résultats concordants sur les 4 outils utilisés (voir p136) ; la présence de gènes de résistance aux antibiotiques (carrés noirs), et les groupes d'incompatibilité plasmidique (ronds noirs) ont été identifiés respectivement par ResFinder et PlasmidFinder ; le schéma FAB est indiqué pour les 46 souches ayant un réplicon de type IncF (pMLST) ; 7 réplicons étaient non typables [F-:A-:B-].

Comme pour *E. coli*, nous avons souhaité dans un premier temps détailler l'ensemble des données de typage capsulaire et lipopolysaccharidique. Malheureusement en ce qui concerne les séquences ciblées pour la capsule, les indices de confiance étaient très bas (*i.e.* « low » ou « none »). Dans ce cas les données n'ont pas été conservées (« unknown ») **(94,99)**. Sur les 58 souches, seulement 7 présentaient un antigène -K clairement identifiable (KL62 n=3 ; KL102 n=2 ; KL149 n=2). Ceci est probablement dû à une trop grande fragmentation des zones ciblées ou à de possibles nouveaux variants. Ensuite, l'antigène O2 était prédominant (n=25 ; 48%), suivi par O3, O4 et O5 (n=7 chacun ; 12,1%). Contrairement à *E. coli* la distribution de ces antigènes de surface était globalement homogène entre les compartiments à l'image des ST (**Figures 71 et 72**). Par ailleurs, il est aussi possible de distinguer plusieurs variants parmi les sérotypes O1, O2 et O3 : O1v1 (n=2), O1v2 (n=1), O2v1 (n=10), O2v2 (n=15), O3/O3a (n=6) et O3b (n=1) **(99)**. Le sérotype O2 est représenté par les ST11, ST307 et ST441 notamment. On retrouve O4 chez le ST152 et O5 chez le ST17.

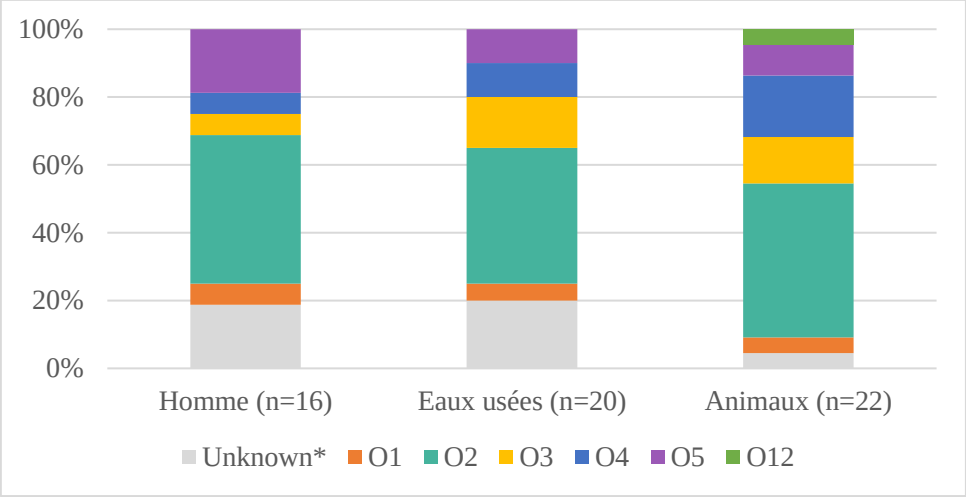


Figure 72. Répartition des principaux sérotypes -O de KPNC dans la collection ECHANGENE. * Les antigènes Unknown n'ont pas été clairement identifiés avec le logiciel Kleborate ; toutes les souches d'origine animale ont été regroupées.

En ce qui concerne KP1, les souches humaines et non-humaines étaient mélangées sur l'ensemble du deuxième arbre phylogénétique (alignement global de 10 371 et 4 054 gènes partagés par 100% des isolats ; **Figure 71**). De plus, l'analyse MLST associée a permis de mettre en évidence la même diversité entre prélèvements, avec 8 ST chez les animaux, 7 chez l'homme et 6 au sein des eaux usées. Comparativement à *E. coli*, les ST de ce phylogroupe étaient plus fréquement partagés entre les compartiments (5/11 ; **Figures 70 et 71**). L'analyse de la clonalité des souches de ST communs a souligné qu'il existait généralement peu de différences entre elles (**Tableau 19**). Le ST307 qui était majoritaire dans cette collection (n=15), a été retrouvé chez plusieurs patients hospitalisés pendant la période d'étude et dans différents secteurs d'activité. Il a également été retrouvé sur l'ensemble des sites de prélèvement des eaux usées, et chez des animaux des égouts du CHUG et de la STEP (**Tableau 20**).

Contrairement aux espèces considérées, une seule souche de KPNC a été retrouvée au sein du petit élevage informel. Celle-ci a été isolée fin 2018 d'une oie et correspondait au ST405 (GKP297 ; **Figure 71**). Ce ST n'a pas été retrouvé en amont. Cependant la présence du gène (*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$) et le ST retrouvé restent en adéquation avec les précédentes observations et une possible origine humaine. Le faible nombre de souches séquencées (n=58) a pu limiter la possibilité de retrouver ce ST dans les autres compartiments. Le risque de futures contaminations des animaux domestiques par les oiseaux sauvages reste possible comme il a été suggéré pour *Enterobacter* et *Escherichia*. En effet parmi les merles prélevés, 6 présentaient une souche BLSE dont certaines étaient aussi retrouvées chez l'homme et dans les effluents (GKP510/ST11, GKP389/ST17).

Tableau 20. Analyse du polymorphisme au sein des souches associées à *K. pneumoniae sensu stricto* ST307. La matrice indique le nombre de SNP entre les isolats (n=15) ; les couleurs de prélèvement indique le type de compartiment avec en rose l'homme, jaune les eaux usées du site A (effluents de l'hôpital) au site D (effluents de la STEP), et en vert la faune sauvage ; * ces cafards ont été capturés dans les égouts de l'hôpital ; le secteur d'activité pour l'hôpital correspond au regroupement fait pour la **Figure 45** avec en pourpre pour la chirurgie, le bleu pour la médecine, l'orange les soins critiques et le vert pour les urgences.

Prélèvement	Date d'isolement	Souche	GKP 004	GKP 044	GKP 055	GKP 101	GKP 110	GKP 178	GKP 194	GKP 307	GKP 347	GKP 393	GKP 396	GKP 407	GKP 451	GKP 452	GKP 464
Os	mai-18	**GKP004**		68	65	39	93	77	62	56	145	118	88	70	98	49	110
Urines	juin-18	**GKP044**	68		55	84	89	63	86	74	123	80	50	42	70	79	76
Site D	juin-18	**GKP055**	65	55		83	48	16	89	83	88	101	71	61	91	72	99
Cathéter	juil-18	**GKP101**	39	84	83		106	93	82	80	157	134	104	96	126	67	128
Site B	aoû-18	**GKP110**	93	89	48	106		54	123	111	116	131	87	87	121	108	125
Site C	oct-18	**GKP178**	77	63	16	93	54		95	89	92	105	81	75	97	80	109
Site D	oct-18	**GKP194**	62	86	89	82	123	95		66	143	131	116	100	121	63	133
Site A	jan-18	**GKP307**	56	74	83	80	111	89	66		151	124	96	84	112	63	118
Crapaud	jan-19	**GKP347**	145	123	88	157	116	92	143	151		122	139	137	124	146	110
Urines	fév-19	**GKP393**	118	80	101	134	131	105	131	124	122		96	88	60	121	60
Urines	fév-19	**GKP396**	88	50	71	104	87	81	116	96	139	96		26	70	99	68
Site A	fév-19	**GKP407**	70	42	61	96	87	75	100	84	137	88	26		54	85	64
Cafard*	mar-19	**GKP451**	98	70	91	126	121	97	121	112	124	60	70	54		115	28
Cafard*	mar-19	**GKP452**	49	79	72	67	108	80	63	63	146	121	99	85	115		121
Cafard*	mar-19	**GKP464**	110	76	99	128	125	109	133	118	110	60	68	64	28	121	

II. Focus sur la résistance aux antibiotiques

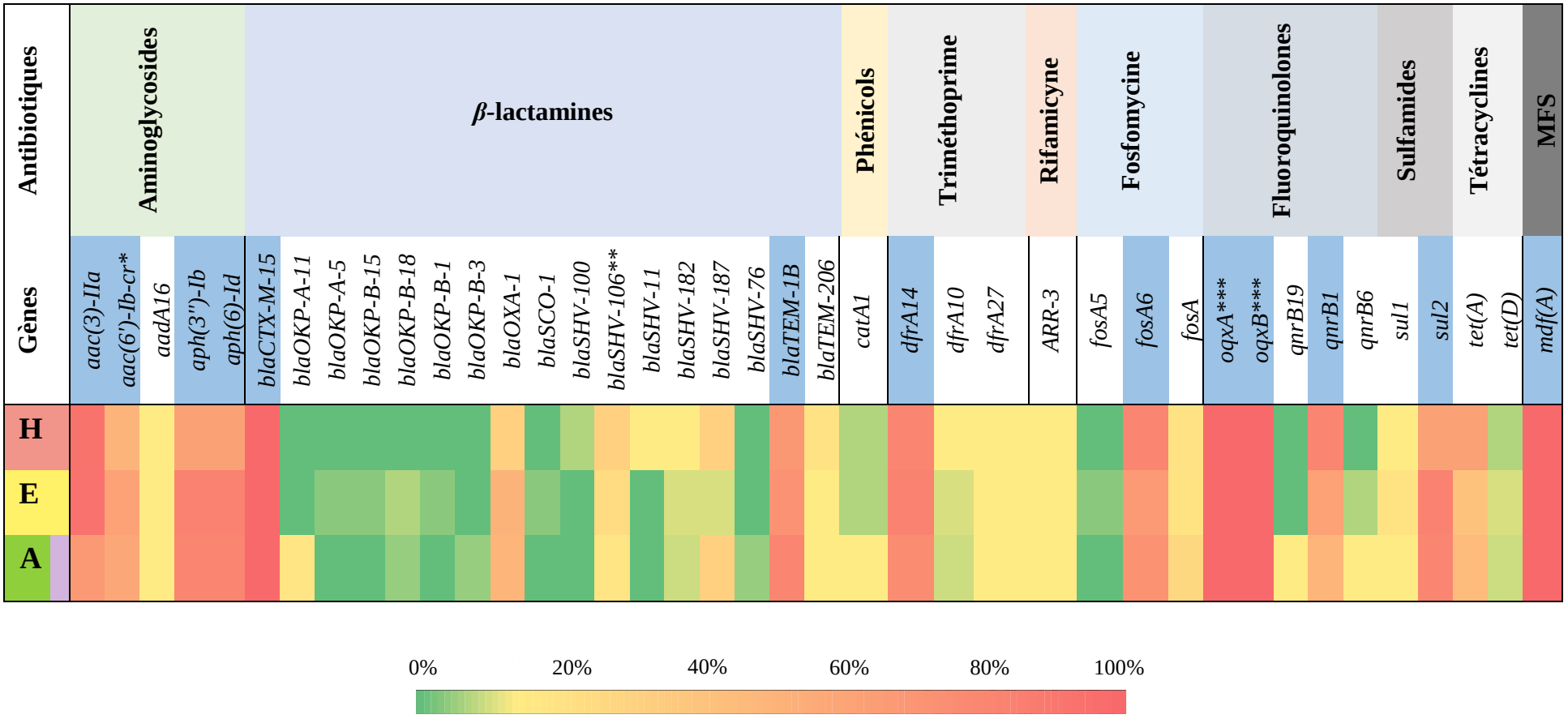
A) Gènes de résistance et compartiments associés

Pour l'ensemble des KPNC un total de 40 gènes codant pour une résistance aux antibiotiques a été détecté (**Tableau 21**). Ces gènes étaient associés à une résistance envers 9 familles d'antibiotiques différentes et distribués de manière homogène entre les compartiments à l'exception du type *bla*$_{SHV}$. Comme pour *E. coli*, une plus grande diversité a été retrouvée pour la famille des *β*-lactamines (n=17). Cependant, le seul gène CTX-M identifié était *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. Les souches ST307 étaient les seules à présenter deux gènes codant pour une BLSE (*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ et *bla*$_{SHV\text{-}106}$).

Seuls 2 isolats, GKP443 et GKP596, ne présentaient pas de gène de résistance aux aminoglycosides, soit 96,6% de positifs. Le gène *aac(3)-IIa* était le plus représenté (n=49), suivie de *aph(3'')-Ib* et *aph(6)-Id* (n=45 isolats chacun). De même, GKP443 et GKP596 ne présentaient pas non plus de gènes de résistances au triméthoprime en plus de GKP393. Le gène majoritaire associé pour cette molécule chez les autres *Klebsiella* était *dfrA14* (n=47). La majorité des souches présentaient un des gènes associés à une résistance aux sulfamides (84,5%) et notamment *sul2* (n=45). Toutes les souches affiliées au ST17 étaient dépourvues de ce type de gène (n=5). Trente-quatre isolats présentaient au moins un gène de résistance à la tétracycline (58,6%), avec majoritairement *tet* (A) (n=29) et seulement 6 *tet* (D*).* Enfin, toutes les souches présentaient un gène de type *fosA.* Contrairement à *E. coli* et ECC aucun gène codant pour une résistance aux macrolides n'a été détecté chez KPNC. Par ailleurs, un gène de résistance à la rifamicyne a été identifié dans 9 isolats et notamment chez toutes les souches du ST152 (*ARR-3*, n=6). Cette résistance avait été identifiée chez une seule souche d'ECC hospitalière (GENC084). Enfin, les isolats ST152 étaient aussi les seuls à présenter un gène *catA1* (n=6) associé à une résistance aux phénicols (**Figure 71**). Treize *Klebsiella* ne présentaient pas de gène *qnr*. Pour les autres, le gène *qnrB1* prédominait (n=37) suivie du gène *aac(6')-Ib-cr* (n=34), et seule la lignée ST152 présentait un gène de type *qnrB6* (n=6). L'évaluation des QRDR nous a permis de mettre en évidence la même prévalence que chez *E. coli* de souches de Klebsiella avec au moins une mutation sur cette région (*i.e.* 51,7% ; n=30). Ces mutations étaient ST spécifiques et présentes dans tous les compartiments. Le profil [ParC-80I, GyrA-83I] étaient le plus fréquent (n=23) et retrouvé chez toutes les souches ST11, ST307 et 1 isolats ST147. Le second isolat ST147 présentait un profil ParC-80I, GyrA-83Y, GyrA-87A et les 6 souches ST152 avaient le profil suivant : ParC-80I, GyrA-83F, GyrA-87A.

Enfin, la présence des principaux gènes de virulence a été recherchée en s'appuyant uniquement sur les données du logiciel Kleborate. Les gènes généralement portés par des plasmide et codant pour le phénotype hypermucoïde (*rmpA/rmpA2*) n'ont pas été retrouvés tout comme ceux associés à l'aérobactine, la colibactine, et la salmochelin. Une yersiniabactine a été identifiée sur des souches isolées des 3 compartiments pour KP1 seulement (n=28). Cette présence était ST spécifique comme l'illustre la **Figure 71**. En effet seuls les ST11, 14 17, 29, 35, 152 et 441 présentaient ce sidérophore. Le variant le plus important était ICE*Kp4* (19/28). Il a été retrouvé au sein des lignées ST11, 14, 17 et 152. L'ICE*Kp3* était spécifique du ST441 (n=7) tout comme l'ICE*Kp5* pour la souche du ST29 et l'ICE*Kp6* pour le ST35.

Tableau 21. Abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae* complex selon le compartiment. La prévalence est calculée en fonction de chacun des compartiments considérés avec H pour l'homme (n=16), E pour les eaux usées (n=20), A pour la faune sauvage (n=21) en plus d'une souche isolée chez une oie ; * le *gène aac(6')-Ib-cr* confère aussi une résistance aux fluoroquinolones ; ** variant présentant un phénotype BLSE **(169)** ; *** les gènes *oqxA/B* codent pour un système de pompe à efflux susceptible d'apporter une résistance à d'autres familles ; MFS : Major Facilitator Superfamily, gènes associés à un système de pompe à efflux (non-spécifique) ; les gènes encadrés en bleu sont présents dans plus de 25% des isolats (n=58).

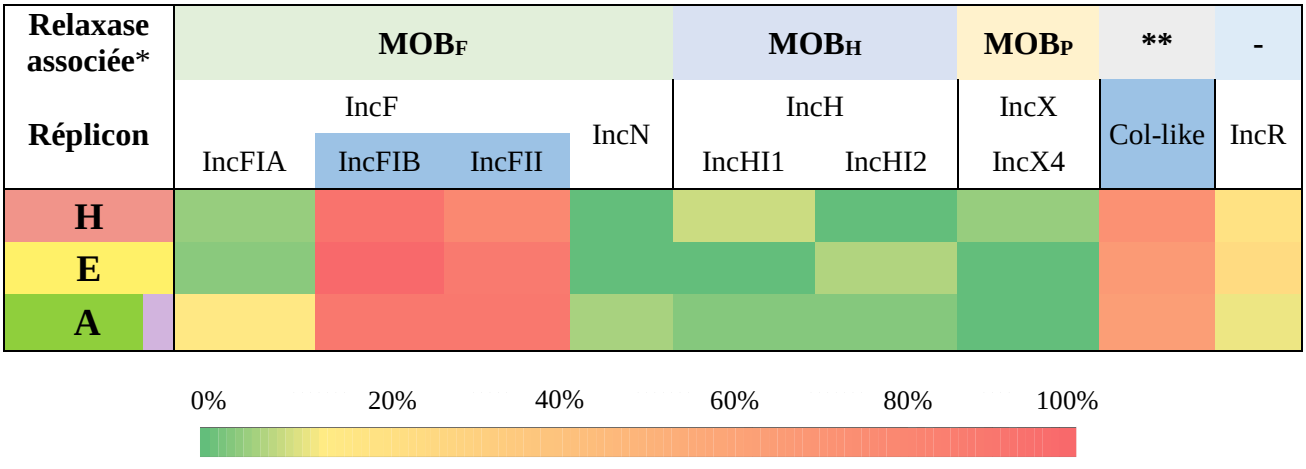


B) Contexte plasmidique

Comme l'illustre la **Figure 71** pour KP1, la plupart des ST était associée à un pattern de gènes de résistance et à la présence spécifique de réplicon. La majorité des souches de KPNC présentait au moins un plasmide considéré comme conjugatif (96,6 %). Les deux derniers isolats était classés dans « plasmide mobilisable » (GKP596) et dans « absence de plasmide ou non-mobilisable » (GKP165) **(261)**. Comme pour *E. coli*, ce sont principalement les plasmides de type IncF (n=57 ; 98,3%) et Col (n=31 ; 53,4%) qui étaient retrouvés chez l'homme, les animaux et dans les eaux usées (**Tableau 22**). La souche GKP165 était la seule dans ce set de données à ne pas présenter un réplicon IncF. Pour cette famille de plasmide, parmi les souches avec un schéma FAB typable, toutes présentaient un réplicon -FII_K (n=50 ; 86,2%). Le principal schéma complet était [K7:A-:B-] (n=32 ; 55,2%) suivi par [K1:A-:B-] (n=6 ; 10,3%). Le schéma [K7:A-:B-] était présent au sein de plusieurs ST : 11, 147, 17, 1921, 29, 307, 35, 405 et 899. Tandis que [K1:A-:B-] n'a été identité que chez ST152. Cette présence spécifique pourrait expliquer que seule les souches ST152 avaient les gènes *qnrB6* et *catA1* (**Figures 71 et 73**). Huit autres formules IncF ont été répertoriées mais n'étaient présentes que 1 à 2 fois dans le set de données. Enfin, 8 isolats avait un plasmide IncF non-typable.

Les rares plasmides de type IncHI1 (n=3) et IncN (n=2), étaient de séquence type inconnu **(268)**. Contrairement à *E. coli*, le groupe d'incompatibilité IncI n'a pas été identifié. En revanche 14 isolats présentaient un réplicon de type IncR (24,1%). Ce réplicon a été identifié chez l'homme, dans les eaux usées et chez les animaux. Il a notamment été retrouvé chez toutes les souches du ST11 (**Figure 71**). Enfin, contrairement aux deux précédentes entérobactéries, très peu de souches présentaient un plasmide de type IncHI2/ST1 (n=3). Ce réplicon n'a été identifié qu'au sein de 2 *Klebsiella* des eaux usées et chez un cafard. Elles appartenaient toutes à *K. quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* (KP4) et au ST3512. Le même pattern de gène de résistance a de nouveau été retrouvé pour ces souches, suggérant la possibilité d'une circulation d'un même plasmide entre les 3 espèces analysées (**Tableaux 17 et 23, Figure 69**).

Tableau 22. Abondance relative des réplicons associés aux groupes d'incompatibilité plasmidique au sein du complexe *K. pneumoniae* selon le compartiment (schéma PBRT). La prévalence est calculée en fonction de chacun des compartiments considérés avec H pour l'homme (n=16), E pour les eaux usées (n=20), A pour les animaux sauvages et domestiques (n=21+1) ; * La relaxase a été prédite selon les données de la littérature pour chaque type de réplicon et la **Figure 16** ; ** les plasmides de type MOB_P et MOB_Q ; IncR ne fait pas partie du schéma de typage DPMT pour les relaxases ; les réplicons encadrés en bleu sont présents dans plus de 25% des isolats de *Klebsiella.*



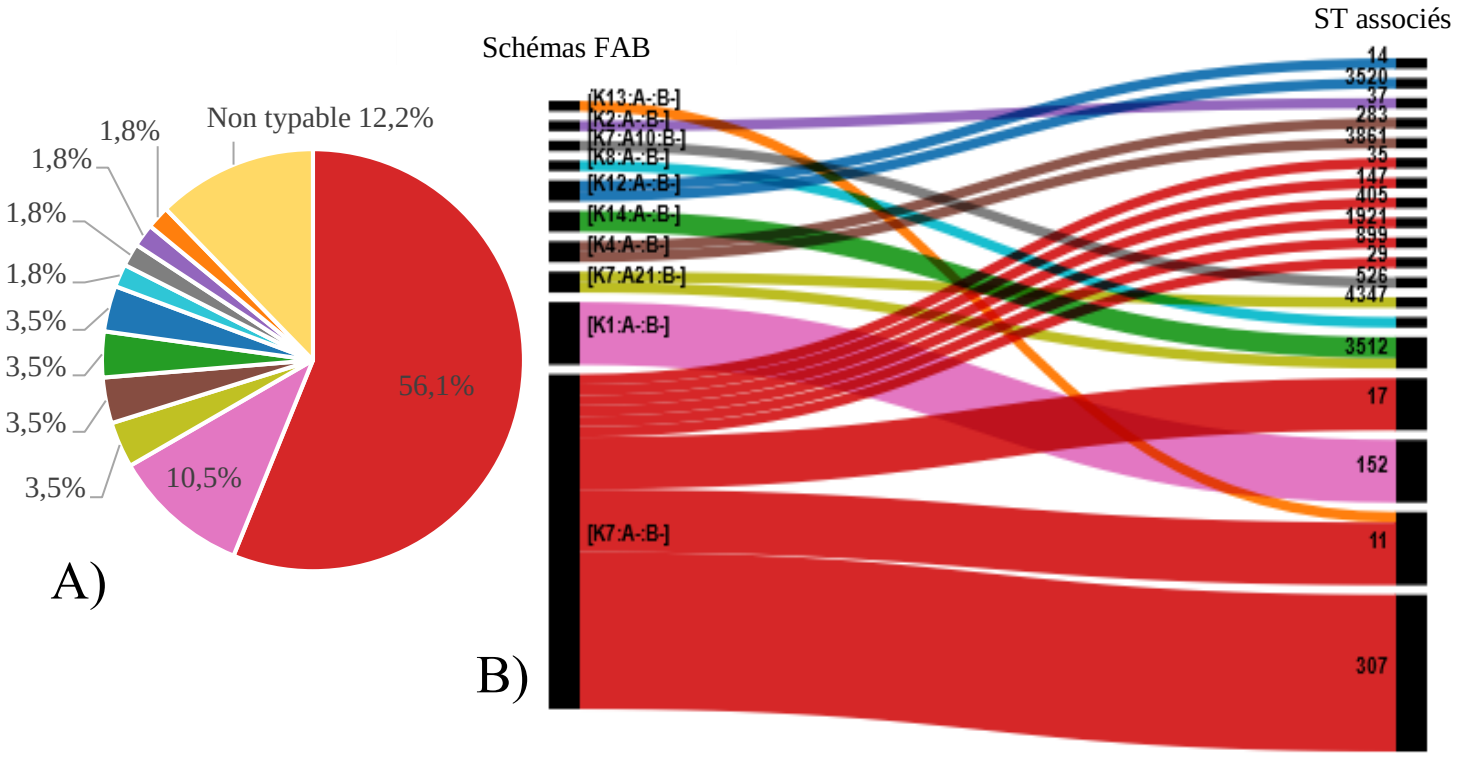


Figure 73. Distribution des schémas FAB du groupe d'incompatibilité IncF chez *Klebsiella*. La prévalence des formules est indiquée en **A)** et a été calculée à partir des 57 souches ayant un réplicon IncF La distribution des réplicons typables selon les ST est représentée dans le diagramme **B)** (fait avec rawgraphs).

Tableau 23. Caractéristiques génétiques des isolats de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KP4) présentant un réplicon de type IncHI2. Le cafard* a été capturé dans les égouts de l'hôpital (Site A) ; les gènes de résistances ont été identifiés avec ResFinder leur présence est indiquée par une case rouge, les gènes soulignés en orange étaient présents chez les *E. coli* portant un plasmide IncHI2 (**Tableau 17**) ; Am : aminoglycosides, Fq : fluoroquinolones, Te : tétracyclines, MFS : major facilitator superfamily ; ** le gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ a été prédit sur une structure plasmidique (**Figure 69**).

Détails et antibiotiques						**Am**				**β-lactamines**				**Triméthoprime**	**Fosfomycin**	**Fq**			**Sulfamides**	**Tétracyclines**	**MFS**
Origine	**Souche**	**Date**	**ST**	**Moyenne SNP**	**IncHI2 DLST**	*aac(3)-IIa*	*aac(6')-Ib-cr*	*aph(3'')-Ib*	*aph(6)-Id*	*blaCTX-M-15***	*blaOKP-B-18*	*blaOXA-1*	*blaTEM-1B*	*dfrA14*	*fosA*	*oqxA*	*oqxB*	*qnrB1*	*sul2*	*tet(A)*	*mdf(A)*
Site A	**GKP050**	juin-18			1																
Site A	**GKP160**	sep-18	3512	36,7	1																
Cafard*	**GKP458**	mar-19			1																

Points clés sur la phylogénie et les résistances retrouvées au sein de la collection de *K. pneumoniae* complex productrices de BLSE.

- ✓ Ces derniers résultats de phylogénie ont permis de mettre en évidence qu'à l'hôpital les infections à KPNC BLSE étaient dues à plusieurs lignées dont le ST307.

- ✓ Ils nous ont permis de confirmer à nouveau les observations faites pour ECC et *E. coli* avec une diffusion de multiples lignées de KPNC préoccupantes dans différents compartiments *via* le continuum des eaux usées. Certaines de ces lignées présentaient par ailleurs une yersiniabactine augmentant la virulence.

- ✓ Ces germes BLSE étaient présents chez les insectes, amphibiens, reptiles, rongeurs et les oiseaux. En d'autres termes, ces animaux sauvages se retrouvaient porteurs de souches de KPNC multirésistantes, d'importance clinique et clairement associées à l'homme et les effluents hospitaliers/urbains.

- ✓ Un seul animal domestique présentait une souche BLSE avec un ST non retrouvé en amont (ST405). Les oiseaux ou les autres animaux sauvages s'ils venaient à se déplacer pourraient jouer un rôle de « vecteur intermédiaire » pour d'autres lignées de *Klebsiella*.

- ✓ Les structures plasmidiques présentes au sein de ce complexe d'espèces étaient dans la majorité des cas des IncF associées spécifiquement à ce genre (FII_K), ce qui pourrait limiter une diffusion chez d'autres entérobactéries.

- ✓ Par ailleurs, comme pour le ST114 chez *Enterobacter*, ou encore le ST6475 chez *E. coli*, un plasmide de type IncHI2/ST1/$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ a été retrouvé dans le compartiment animal et dans les eaux usées pour quelques rares souches de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. Etant donné que ces *Klebsiella* présentaient un pattern de gènes de résistance similaires avec les précédents résultats, une analyse plus poussée par séquençage « long-reads » (MinION, nanopore) est requise pour comparer ces plasmides (**Chapitre 7**).

CHAPITRE 7

Apport du séquençage « long-reads » et analyse approfondie d'une collection de plasmides.

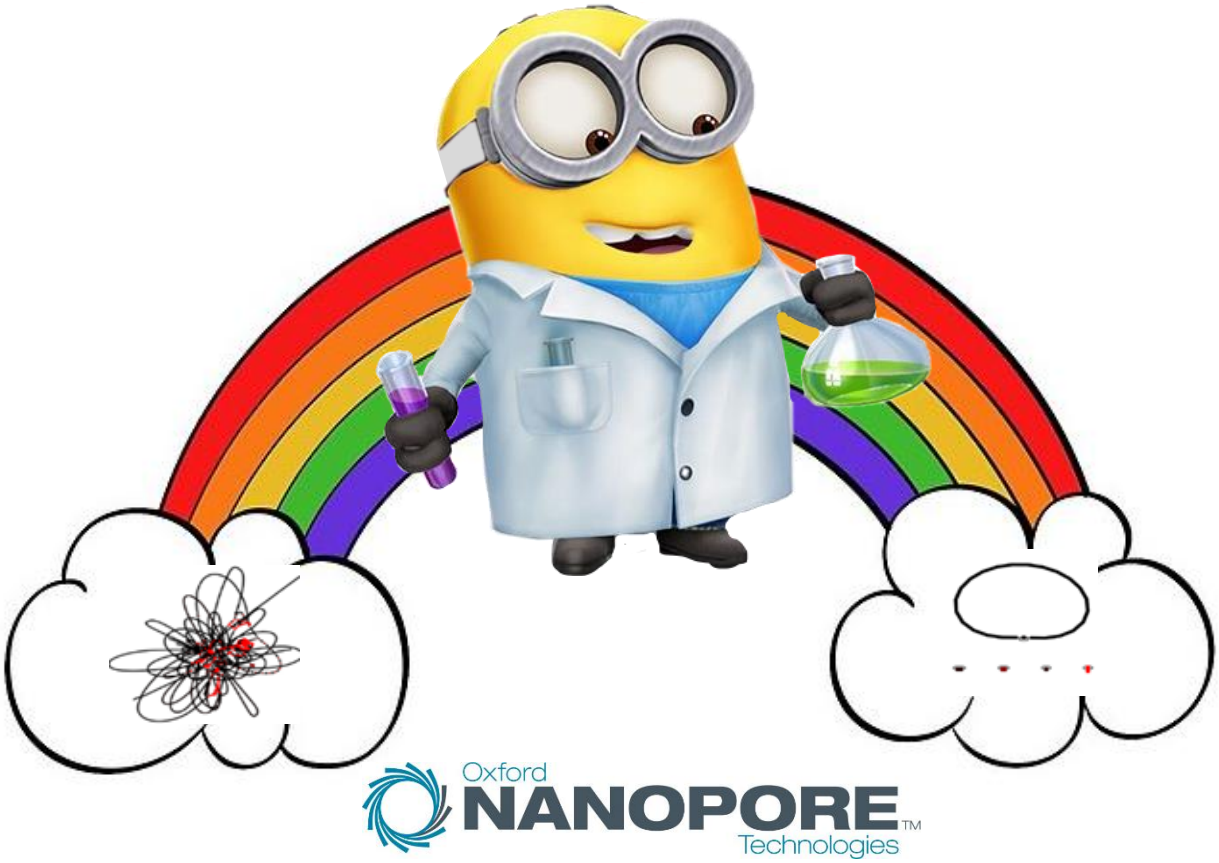


Image adaptée de : https://www.clipartmax.com et https://www.redbubble.com/

I. Focus sur le plasmide IncHI2/ST1/*bla*$_{CTXM-15}$

Au vu du nombre de souches et des limites techniques nous avons fait le choix de nous focaliser sur un plasmide du groupe d'incompatibilité IncHI2 pour le séquençage MinION. En effet le travail initial sur *Enterobacter* indiquait la présence de ce groupe dans les 3 compartiments (n=41 souches). Pour *E. coli* celui-ci était présent notamment chez les animaux et dans les eaux usées (n=22). Il a aussi été retrouvé chez KPNC en très faible proportion dans les eaux usées (KP4 n=3 ; **Tableaux 17 et 23**). Nous ne nous sommes pas attardés sur le séquençage hybride de plasmides du groupe IncF, même si ces derniers sont largement répandu notamment chez *E. coli* et *Klebsiella* **(268)**. Ce choix vient du fait de la grande diversité dans ce groupe avec la possibilité notamment de se trouver en présence de plasmides codant plusieurs réplicons rendant le choix pour le séquençage MinION encore plus complexe (**Figures 66 et 73**). De plus d'un point de vue hôte bactérien ce groupe reste lié aux entérobactéries contrairement à d'autre groupe comme IncH qui peuvent présenter une plus grande diversité d'espèces **(238)**.

Après un assemblage hybride par Unicycler et une analyse des données *via* Bandage, nous avons pu correctement distinguer les contigs chromosomiques et plasmidiques pour les isolats séquencés. La **Figure 74** illustre le résultat optimal obtenu pour une des souches d'*E. coli*. Au total, 16 plasmides IncHI2 ont été séquencés par l'approche MinION : 7 chez *E. coli*, 1 chez KPNC et 8 chez ECC présentés précédemment (**Chapitre 3 et 4**). Ces plasmides de taille variable (de 290 365 à 472 040 pb) ont été de nouveaux analysés avec PlasmidFinder, ResFinder et pMLST pour confirmer la présence de gènes et typer les structures. Ceci nous a permis de confirmer que nous étions bien en présence d'un plasmide IncHI2/ST1 pour chacun des isolats. Le pattern de gènes était similaire avec de 10 à 13 gènes retrouvés sur tous les plasmides (**Figure 77**). De plus, tous ces plasmides présentaient le gène *intI*1 identifié précédemment, ce qui souligne leur rôle primordial dans la capture et la diffusion de résistances. En dépit de la mise en place de tests de conjugaison en laboratoire, la mobilité des plasmides circularisés a été prédite selon les gènes codant pour le relaxosome et aux transferosome avec le logiciel MOB-suite **(261)**. Tous les plasmides ont été prédits comme conjugatifs. Ils présentaient une relaxase de type MOB_H et un système de sécrétion de type MPF_F. Le plasmide pGKP160 isolé chez une souche de KP4 avait une taille nettement supérieure à la moyenne des plasmides séquencés (472 040 contre 322 139 pb). Il présentait une structure hybride avec différents réplicons ($IncFII_K$ / IncR / IncHI2) et n'a pas été conservé pour la suite de l'analyse.

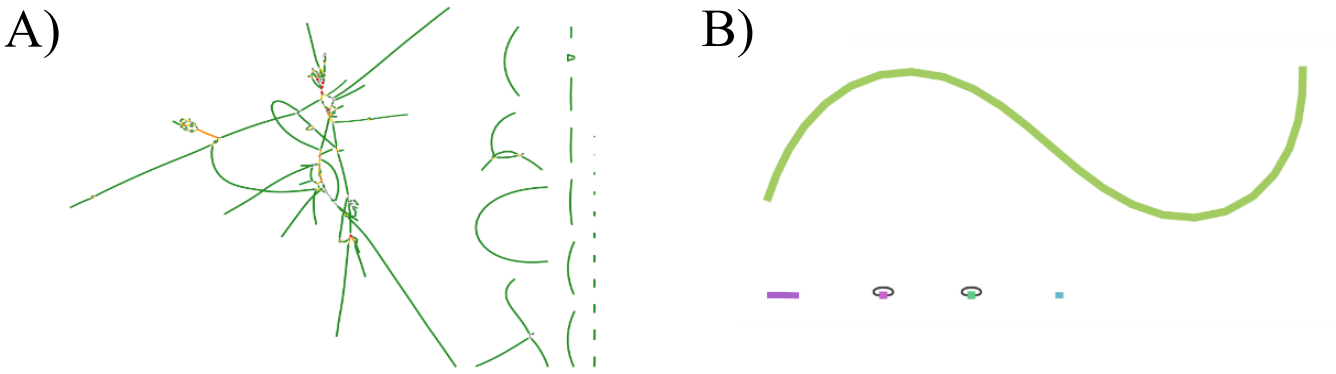


Figure 74. Comparaison des assemblages. Les assemblages sont visualisés *via* Bandage avec en **A)** la sortie initiale Illumina et en **B)** le même isolat après un séquençage hybride (Illumina + MinION nanopore).



Figure 75. Alignement Mauve des 15 séquences plasmidiques IncHI2/ST1/*bla*$_{CTXM-15}$. Les plasmides GENC en vert correspondent à des isolats d'*Enterobacter* et les plasmides GESC en bleu à des isolats d'*E. coli*.

Comme le souligne la **Figure 75** d'alignement ci-dessus, une zone variable de ces plasmides présentait différentes conformations et recombinaisons rendant un alignement complet de ces éléments génétiques difficile. Nous avons donc opté pour la même approche que la phylogénie des bactéries pour reconstruire un arbre et les comparer (Prokka / Roary / RaxML). D'autres approches par clustering avec Mashtree par exemple ont aussi été utilisées pour des plasmides **(191)**. Nous avons obtenu ici un alignement global de 541 pb et 255 gènes partagés par 100% des isolats. En utilisant le plus grand plasmide (pGENC414) comme référence la séquence couverte par ce dernier avec les autres plasmides représentait de 92,23% à 99,64% d'identité nucléotidique. La **Figure 76** a permis de visualiser les zones absentes chez les autres plasmides. Ces zones étaient les mêmes que celles observées au **Chapitre 4** et n'ont pas non plus été retrouvées parmi les plasmides d'*E. coli*.

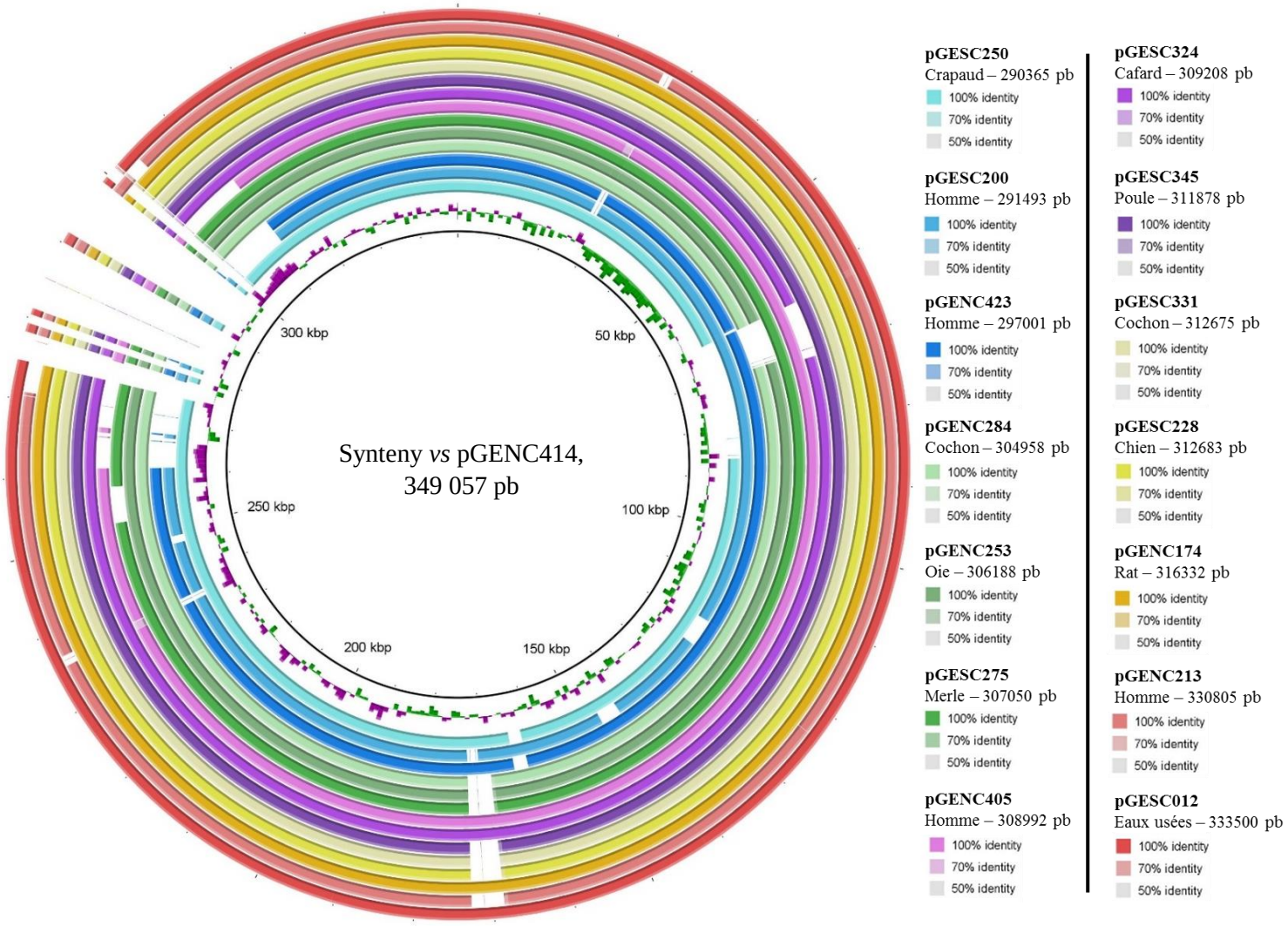


Figure 76. Comparaison BRIG des plasmides IncHI2/ST1/bla$_{CTX-M-15}$ avec pGENC414. Les plasmides comparés sont disposés par taille avec en premier au centre pGESC250 (290 365 pb) et en dernier pGESC012 (333 500 pb) ; GENC : *E. cloacae* complex, GESC : *E. coli* ; l'annotation est la même que celle du **Chapitre 4.**

Au vu des dates d'isolement et de la structure de l'arbre, il reste complexe d'identifier un plasmide « originel » dans ce set local (**Figure 77**). Par ailleurs la majorité des plasmides provenant de souches d'ECC à l'hôpital était regroupé, ce qui suggère un flux dans l'établissement comme évoqué au **Chapitre 4**. À l'opposé, les plasmides isolés chez les animaux domestiques dans le voisinage étaient séparés selon l'entérobactérie considérée. Ceci laisse supposer que ces structures plasmidiques ont été échangées bien avant l'introduction de ces isolats BLSE dans la ferme (évolution ST114, ST6745). Comme le suggérait le **Tableau 18** qui décrivait les souches d'*E. coli* avec un plasmide IncHI2, nous avons identifié cette structure dans les eaux usées de l'hôpital uniquement pour cette espèce (n=5 ; Site A).

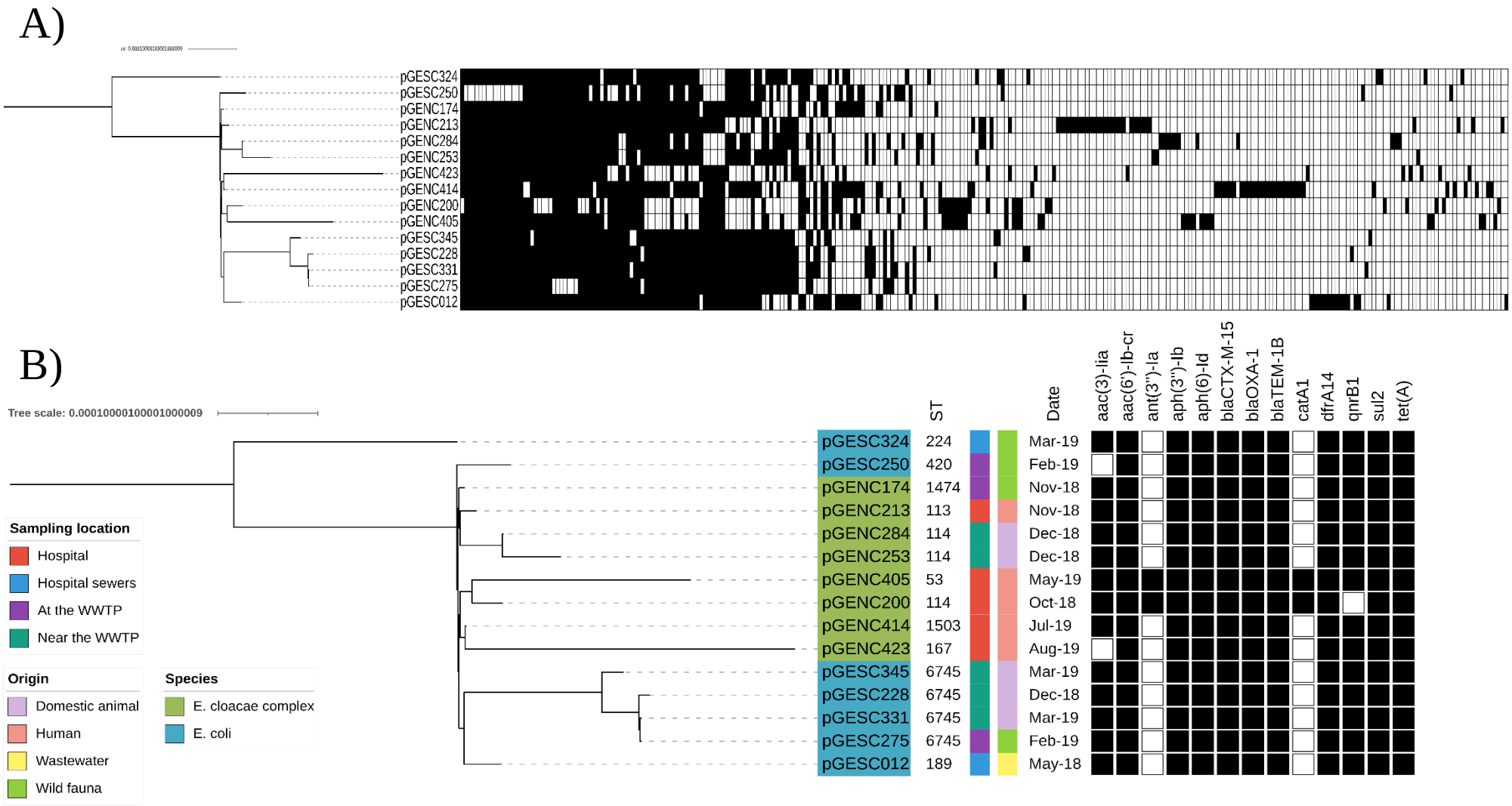


Figure 77. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance des plasmides IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ du projet ECHANGENE. L'arbre enraciné au point central a été réalisé *via* iTOL après des reconstructions avec le logiciel RAxML (1 000 bootstraps) basées sur des alignements de séquences multiples de 255 *loci* ; les 15 plasmides issus de l'assemblage hybride ont été isolés chez 2 espèces du projet, et sur l'ensemble des compartiments analysés de mai 2018 à août 2019 ; l'arbre en **A)** présente une matrice de présence/absence des gènes non partagés par l'ensemble des plasmides ; l'arbre en **B)** indique seulement les gènes de résistance identifiés.

II. Séquençage MinION et intégration chromosomique d'une CTX-M chez *E. coli : f*ocus sur *E. coli* ST3580 en Guadeloupe et à l'échelle mondiale

Lors des premiers séquençages Illumina des souches d'*E. coli* nous avions remarqué la présence d'un gène codant pour une BLSE et l'absence de réplicon plasmidique identifiable pour certaines souches. C'était notamment le cas pour le ST3580 qui regroupait des souches des eaux usées, des animaux sauvages et une souche identifiée chez l'homme. Les données obtenues par l'approche combinée de prédiction nous avaient permis de conclure à une insertion chromosomique pour une majorité de ces bactéries (9/10). Le dernier isolat présentait un résultat jugé « non-concordant » (GESC357 ; **Figure 65**). Peu de résistances associées étaient présentes et nous n'avions pas retrouvé d'intégron de classe 1 (*intI*1). Les gènes *qnrS1* et *mdf(A)* ont été retrouvés chez tous ces isolats. Enfin, à l'exception de GESC150, GESC168 et GESC182, ces souches présentaient aussi un gène de type *tet(A).*

Afin d'aller plus loin et pour mieux apprécier cette spécificité nous avons effectué un séquençage « long-reads » et un assemblage hybride pour deux des souches de ce ST (GESC150 et GESC168). Ceci nous a permis de confirmer les résultats de prédiction et l'intégration chromosomique du gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ sur la même région que le gène *qnrS1* (**Figure 79**). Une recherche spécifique de cette région sur les autres souches BLSE du ST3580 a confirmé cette structure avec en plus la présence du gène *tet(A)* en aval. Par ailleurs la souche clinique GESC150 présentait aussi un plasmide IncF [F77:A-:B-] de 73 256 pb portant les gènes de résistances suivants : *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *sul2*, *tet(B)*, $bla_{\text{TEM-1B}}$ et *dfrA8*.

Grâce à la base de données EnteroBase, nous avons pu récupérer les données de séquençage de 113 souches d'*E. coli* présentant le même ST. Seuls les isolats avec des métadonnées complètes aux 4 octobre 2020 et une bonne qualité d'assemblage ont été conservés (https://enterobase.warwick.ac.uk/). Tous ces assemblages ST3580 (ECHANGENE + international) présentaient une moyenne du score BUSCO de 99,2% (*single copy completness*) **(388)**. La sortie QUAST a indiqué une moyenne de N50 de 13 267 pour un minimum de 29 940 et un maximum de 225 604 **(387)**. Un arbre phylogénétique spécifique a été construit afin d'apprécier la diversité de ce ST et le positionnement des souches guadeloupéennes par rapport aux autres souches de la base de données (alignement global de 14 295 et 3 687 gènes partagés par 100% des isolats). La première souche de cette collection a été isolée en 2003 aux Etats-Unis, et la majorité des prélèvements ont été fait entre 2017 et 2019 (94/113). Ce ST a été retrouvé sur la plupart des continents et en majorité en Amérique du Nord chez des animaux de rente (volaille n=97).

Une moyenne de 5 gènes de résistance par souche a été observée. Le plus représenté était *mdf(A)* (n=113). Les gènes *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul2* et *tet(B)* étaient présents dans environ 45% de la collection. Par ailleurs, seules 12,4% (14/113) des souches ont été caractérisées comme productrices de BLSE, dont 10 provenaient de Guadeloupe (**Figure 78**). Ces isolats C3G-R portaient dans la majeure partie des cas un gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (13/14). La dernière souche avait un gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (SAMN12575968). Deux isolats présentaient une

céphalosporinase de type *bla*$_{\text{CMY-2}}$ (SAMN10261148 et SAMN12359925). Parmi les rares souches avec un gène *bla*$_{\text{CTX-M}}$ en dehors du territoire guadeloupéen nous avons pu remarquer la même intégration chromosomique pour un isolat clinique provenant de Singapour (2017 ; **Figure 78**). Les trois autres gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$ ont été prédits sur un contig plasmidique selon la même approche qu'utilisée dans les chapitres précédents (**Figure 78**). De plus, le seul isolat avec l'intégration chromosomique (SAMN09460108) présentait seulement 23 SNP de différence avec les souches GESC298, GESC302, GESC315 et GESC362 récupérées en 2019 en Guadeloupe.

Comme le décrit la **Figure 79**, l'insertion chromosomique du gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ était étroitement associée à ISE*cp1*, situé 256 pb en amont. Le gène de résistance *qnrS1* était aussi présent au niveau de cette région, à 4641 pb en aval. La localisation dans ces chromosomes hybrides était la même pour les deux souches, à savoir près d'un gène *molR* impliqué dans le métabolisme du molybdate. Nous avons par la suite procédé à une analyse BLASTn de cette région (hybride GESC168, 11 153 pb) sur l'ensemble de la collection d'entérobactéries BLSE. Ceci ne nous a pas permis de la retrouver chez KPNC ni chez les souches d'ECC. À noter qu'une seule souche parmi ces deux autres genres présentait un gène *qnrS1* identifiable. À l'inverse, 5 autres isolats d'*E. coli* présentaient une région similaire et intacte (de 99,98 à 100% d'identité nucléotidique) en plus de 8 des 10 souches ST3580. Pour les deux derniers ST3580 (GESC298 et GESC357) la région était tronquée. Les autres isolats étaient : GESC083 (ST1722), GESC094 et GESC123 (ST69), GESC156 et GESC209 (ST3268). Pour ces 5 autres souches cette région a été prédite sur un chromosome pour les ST1722 et ST3268. Tandis que pour les deux souches du ST69 cette région a été identifiée sur une structure plasmidique (**Figures 65 et 79**). Enfin, cette région a également été retrouvée au sein d'une seconde souche du ST3580 à l'international (SAMEA1061935 – Cambodge) mais non conservée pour l'analyse phylogénétique (qualité de d'assemblage faible ; **Figure 79**) **(6)**.

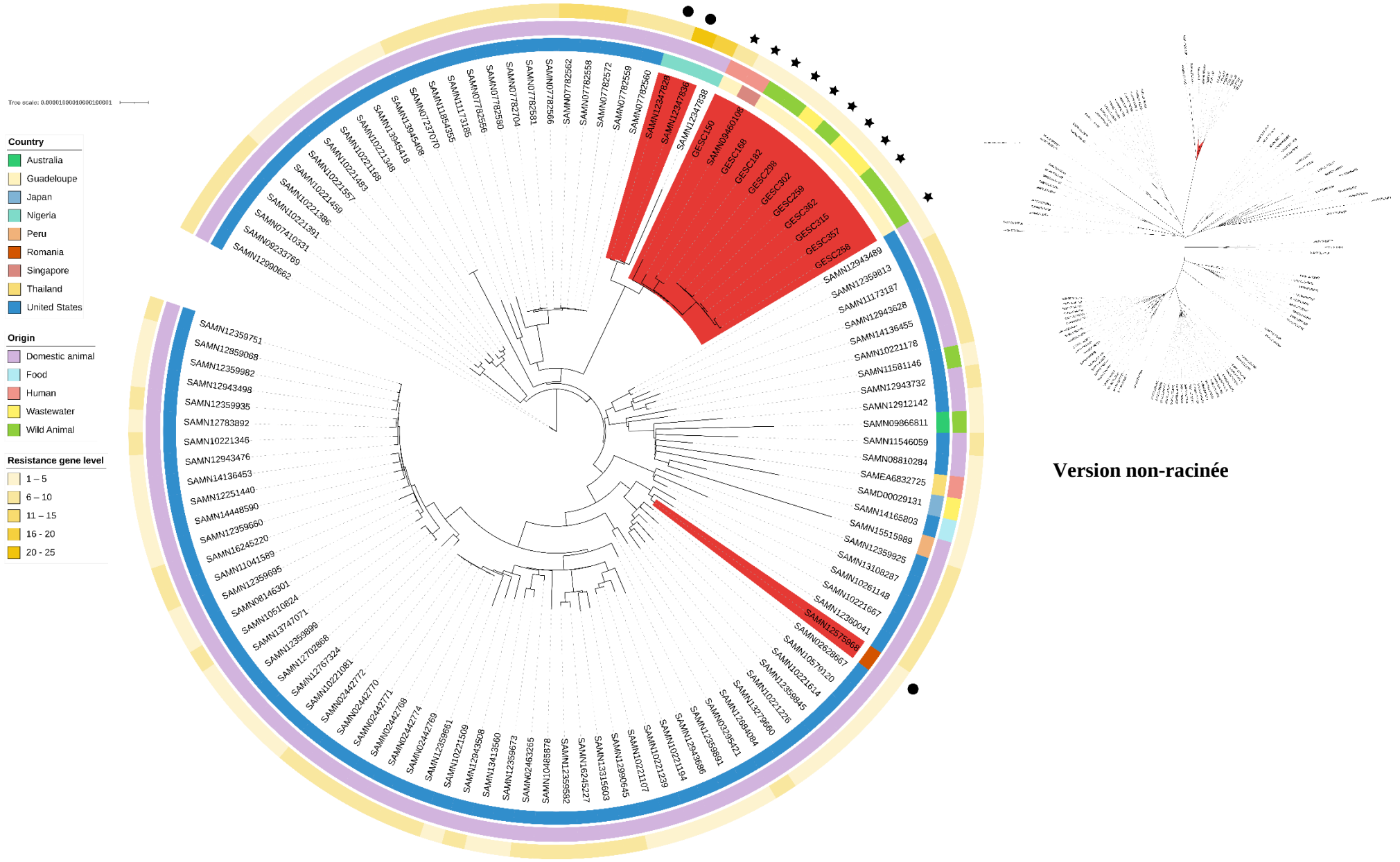


Figure 78. Arbre phylogénétique à maximum de vraisemblance d'*E. coli* ST3580 à l'international. L'arbre a été réalisé *via* iTOL après des reconstructions avec le logiciel RAxML (1 000 bootstraps) basées sur des alignements de séquences multiples de 3 687 *loci* du génome central après suppression des recombinaisons ; les 113 isolats ont été récupérés *via* l'interface Entérobase sur la période 2003-2020 (BioSamples) ; les isolats en rouge présentent une BLSE, le gène associé a été prédit sur un contig plasmidique (rond noir) ou chromosomique (étoile noire ; méthode p136), les données de prédiction étaient non concordantes seulement pour GESC357 ; les souches ont été regroupées en 5 classes selon le nombre de gènes de résistance qu'elles portaient (ResFinder).

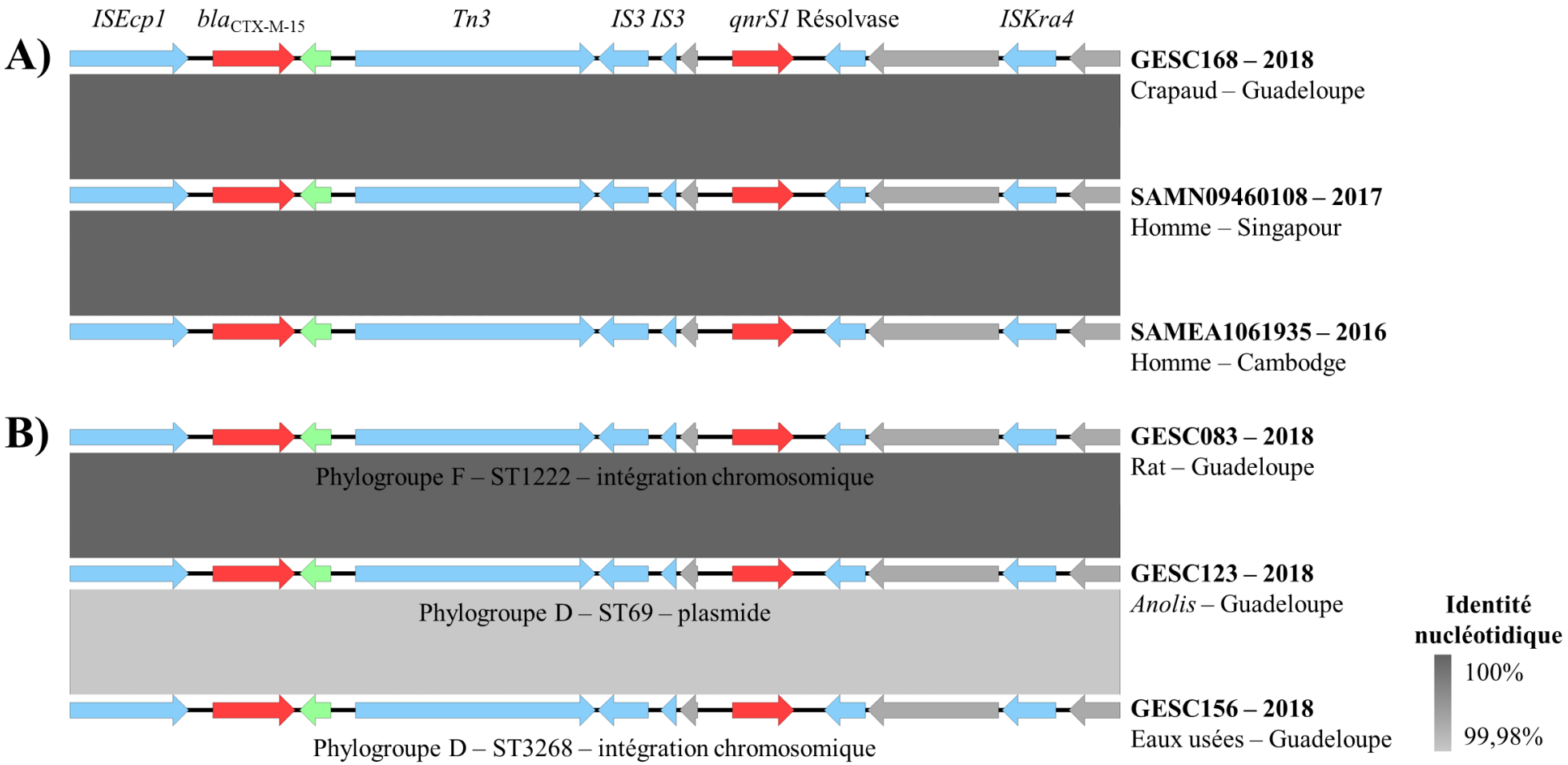


Figure 79. Comparaison de l'environnement génétique autour du gène codant pour la BLSE. Les trois séquences en **A)** correspondent au phylogroupe B1 ST3580 isolés en Guadeloupe et à l'international ; la comparaison en **B)** représente une sélection de séquences similaires retrouvées dans d'autres lignées d'*E. coli* ; la figure a été construite avec Easyfig et l'annotation a été effectuée avec RAST+Uniprot et ISfinder ; les séquences en rouge correspondent aux gènes de résistance, le bleu aux éléments mobiles, le gris aux séquences codant pour des protéines hypothétiques et la flèche verte à la tryptophane synthase.

Points clés sur les résultats obtenus grâce au séquençage MinION, nanopore.

- ✓ L'approche par « long-reads » s'est avérée très utile pour séparer les contigs plasmidiques et chromosomiques et reconstruire « proprement » ces réplicons.

- ✓ Les résultats obtenus ont permis de mettre en parallèle des plasmides IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ isolé chez les trois espèces productrices de BLSE, et de mettre en évidence une similarité de structure entre les isolats d'ECC et d'*E. coli* suggérant un échange entre ces espèces.

- ✓ La création d'un arbre phylogénétique uniquement fondé sur ces séquences plasmidiques et l'ensemble des données obtenues laissent entrevoir un scénario de diffusion plasmidique de l'hôpital par les *Enterobacter* puis vers les autres espèces dans les eaux usées jusqu'au animaux qui vivent près de la STEP.

- ✓ Enfin en reprenant l'exemple du ST3580 nous avons pu confirmer que cette lignée présentait bien une intégration chromosomique du gène codant pour la CTX-M. Bien que relativement spécifique à l'archipel, l'expansion de ces souches est possible avec une nouvelle problématique de diffusion d'entérobactéries multirésistantes et stables.

DISCUSSION

INSTITUT PASTEUR

I. Un contexte hospitalier original

A) Des taux d'incidence de bactéries mulirésistantes non représentatifs des données de l'hexagone

Les données hospitalières recueillies lors de cette thèse confortent les précédentes observations faites pour le territoire guadeloupéen **(39)**. Les espèces KPNC, ECC et *E. coli* représentaient plus de 96% de tous les prélèvements infectieux liés à une entérobactérie BLSE chez les patients hospitalisés. Elles étaient principalement associées à des infections urinaires. Cette prévalence était plus faible pour les données obtenues sur plus de 400 établissements de soins du territoire français en 2018 (mission Spares : 90%) **(341)**. Il faut cependant noter que les taux d'incidence estimés pendant la période d'analyse étaient aussi supérieurs aux données publiques rendues pour la région, avec 1,05 pour 1 000 journées d'hospitalisation pour KPNC contre 0,86. La même constatation a été faite pour l'indicateur *E. coli* avec 0,13 contre 0,09 (GEODES ; année 2018) **(39)**. En ce qui concerne les résistances associées, le pourcentage de souches productrices de BLSE résistantes aux quinolones était légèrement supérieur en Guadeloupe pour ECC (93% contre 90%) et *E. coli* (84% contre 74%), lorsque l'on compare avec les données de la mission Spares (année 2018) **(341)**.

K. pneumoniae complex reste l'un des principaux germes BLSE retrouvés dans les infections à l'hôpital **(39,420)**. Ce complexe d'espèces était largement prédominant parmi les entérobactéries BLSE en Guadeloupe, quel que soit le type de prélèvement mais aussi le type de service. Il représentait 66,1% de la collection hospitalière contre 33,7% pour les données nationales en 2018 **(341)**. De plus, nous avons estimé que 5 prélèvements sur 10 positifs à KPNC multirésistantes provenaient de patients hospitalisés en soins critiques (116/218), ce qui est bien supérieur aux autres indications des hôpitaux français (1/10) **(341)**. Cette forte prévalence avait déjà été signalée en soins critiques entre janvier 2014 et décembre 2015 au CHUG. En effet, KPNC représentait 86,1% des entérobactéries BLSE chez des patients hospitalisés dans ce type de service **(176)**. En comparaison avec *E. coli*, il a été démontré que cette entérobactérie présente un plus haut risque de transmission lors des interactions avec le personnel médical ou d'autres patients. Cette caractéristique pourrait expliquer sa large implication dans les infections nosocomiales locales **(420)**. Une autre étude a confirmé que la principale voie de transmission à l'hôpital était bien associée aux autres patients **(91)**. La circulation de lignées spécifiques n'est cependant vérifiable que par du séquençage. Il est important de noter que parmi les indicateurs qualité du CHUG, même si ce dernier est classé B pour la partie gestion du risque infectieux, il fait partie des établissements les plus impliqués dans la promotion et l'utilisation des produits hydro-alcoolique pour l'hygiène des mains (**Annexe 3**). Par ailleurs, un portage initial au sein de la communauté serait aussi à prendre en considération mais n'a pas pu être évalué lors de ce projet **(88,90,91)**. Enfin, il a été suggéré que certains facteurs de comorbidité comme le diabète dans la population guadeloupéenne pourraient avoir un rôle dans la fréquence des infections plus ou moins graves à KPNC **(13,119)**. Dans une étude récente en réanimation 28% des patients étaient considérés comme diabétiques, et l'indicateur de prévalence GEODES pour cette région reste bien plus important que la moyenne française (prévalence 9,07% contre 5,03% en 2018) **(39,176)**.

Pour toutes les souches du projet, la résistance à l'ertapénème n'était pas liée à la production d'une carbapénèmase (sauf GENC133) **(385)**. Ces données sont en accord avec une étude effectuée en France entre 2012 et 2014 qui suggérait l'implication des mécanismes de pompes à efflux couplés à une BLSE ou une cephalosporinase hyperproduite dans l'augmentation de la CMI pour ces molécules. Dans cette même étude, lorsqu'une carbapénémase était mise en évidence chez les entérobactéries, celle-ci était liée au gène de type *bla*$_{\text{OXA-48}}$ dans 85,6% des cas **(193)**. Le taux d'incidence au niveau national pour cette résistance, même si très faible, semble augmenter chaque année. En 2018, une densité d'incidence de 0,006 pour 1 000 journées d'hospitalisation a été recueillie, avec principalement des souches de KPNC (85/165 ; 51,5%) **(341)**. Par ailleurs, comme mentioné dans la **Partie I** des résultats, une souche d'ECC ST114 avec une enzyme OXA-48 a été identifiée chez un patient en 2018. *E. cloacae* complex est reconnue comme étant le 3$^{\text{ème}}$ germe de cette famille pouvant présenter une résistance à ces molécules **(2,341)**. Etant donné l'importance de ce complexe d'espèces associé à une BLSE et notamment du clone ST114 en Guadeloupe (0,13 contre 0,05 ; année 2018), une vigilance spécifique concernant cette lignée serait à prévoir au niveau nosocomial notamment **(341,385)**.

Comme dans l'hexagone, les principaux cas documentés de souches productrices de carbapénémase sur le territoire provenaient de patients ayant transité dans d'autre pays (Caraïbes) **(110,111,194,216)**. Si l'on prend « l'indicateur » KPNC, les îles de cette région du monde restent pour le moment peu sujettes à ce type de résistance **(110,421)**. La Guadeloupe étant une destination touristique prisée, il est possible que l'arrivée de nombreux avions tout au long de l'année, en plus des déplacements de la diaspora antillaise, hors contexte pandémique actuel, jouent un rôle dans l'introduction silencieuse et la diffusion de résistances « critiques » au niveau communautaire et dans les effluents. Un nouveau projet initié par les Universités de Limoges et de Dresde est en cours à l'Institut Pasteur afin de mesurer l'impact du tourisme et des flux humains en Guadeloupe sur la diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques et de clones internationaux.

B) Infections à ECC BLSE : des clones bien implantés au niveau nosocomial

L'article présenté au **Chapitre 4** a permis de souligner l'importance d'*E. hormaechei* BLSE (*i.e.* ST114) dans les infections humaines. Il a aussi mis en évidence la circulation d'un plasmide IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ entre les différentes espèces du complexe. Ce dernier aurait facilité l'émergence locale d'une lignée rarement retrouvée au niveau mondial (ECC clade L). Parmi les 2 autres entérobactéries analysées chez l'homme, aucune souche ne présentait ce groupe d'incompatibilité. Ceci suggère que le principal véhicule de ce plasmide en Guadeloupe est *Enterobacter*. En complément, l'**Annexe 1** présente un arbre phylogénétique avec une collection de souches humaines d'ECC du C-VIII provenant des CHU de Caen et de Guadeloupe. Cette comparaison a aussi permis de souligner un cloisonnement entre ces deux collections et des lignées spécifiques comme pour le clade L.

Un autre clone associé au C-IX (*E. bugandensis*, Clade R) pourrait devenir problématique au niveau nosocomial sur l'île. Comme mentionné en introduction, ce cluster

serait le plus virulent et a notamment été associé à de graves infections en néonatalogie en Tanzanie et très récemment en France métropolitaine **(76,81)**. Sa présence chez l'homme reste pour le moment anecdotique en comparaison avec *E. hormaechei*. L'avènement du séquençage complet a permis de palier aux difficultés d'identification de ce cluster et de le mettre rétrospectivement en évidence dans plus de 40 isolats cliniques en Allemagne, Chine, Etats-Unis, Norvège et au Royaume-Uni **(70)**. En Guadeloupe, il a été identifié dans 12 isolats infectieux (nosocomiaux) entre 2018 et 2019. Ces souches étaient notamment associées aux services de soins critiques (6/12) et ont aussi été retrouvées chez deux enfants âgés de 2 ans. Seuls deux isolats C-IX producteurs de BLSE ont été séquencés (ST1537 – $bla_{\text{CTX-M-15}}$). L'analyse prédictive a indiqué que ce gène de résistance était inséré au niveau du chromosome, ce qui pourrait limiter les options de traitement si sa virulence est avérée. Selon les derniers travaux de remaniements taxonomiques pour ce genre, la plus ancienne souche C-IX identifiée a été retrouvé dans l'environnent en Inde (1999) **(70,422)**. Dans la **Partie I** nous avons aussi pu identifier 22 isolats associés au C-IX dans des prélèvements non-humains (animaux de ferme, *Anolis*, eau de captage, légumes). L'étude approfondie de ces isolats cliniques et non-cliniques pourrait permettre de mieux comprendre la structure de cette population locale émergente, et de clairement identifier les principaux réservoirs des lignées les plus virulentes pour l'homme comme effectué pour les clusters VI et VIII **(76,408)**.

Enfin, en ce qui concerne les résistances nous avons pu observer la présence de souches avec un gène de résistance à la colistine uniquement chez les *Enterobacter*. Au total 6 souches isolées en 2018 présentaient un gène *mcr-9* : 2 BLSE (**Partie II** ; ST171) et 4 non-BLSE (**Partie I** ; ST113). Cette molécule fait partie des antibiotiques de dernier recours contre les entérobactéries multirésistantes, mais reste aussi très utilisée en production animale **(126,130)**. D'après nos connaissances et la littérature, c'est la première fois que ce type de gène est mentionné aux Antilles françaises. Par ailleurs, les hauts niveaux de résistance à la colistine chez les entérobactéries ne sont généralement pas associés à l'acquisition de gènes de type *mcr*. En effet une seconde voie est possible et correspond à des mutations spécifiques au niveau chromosomique (MgrB, PmrB). Ces mutations sont retrouvées chez *Klebsiella* notamment **(94,115)**. Les diamètres d'inhibition de la colistine qui ont été rapportés par le laboratoire du CHUG pour ces 6 souches étaient compris entre 18 et 20 mm. Comme le mentionne le référentiel EUCAST, ils ne « permettent pas de détecter toutes les résistances acquises » contre cette molécule. Par ailleurs, aucune mesure de CMI n'a été réalisée (http://www.sfm-microbiologie.org). Depuis sa description en 2019 ce gène de résistance « silencieux » a été identifié chez l'homme et l'animal dans différents pays **(46,85,137,191)**. Il n'a cependant pas la même prévalence chez les entérobactéries que d'autres variants comme *mcr-1* **(126,281)**. Son expression est faible en temps normal et sera induite par des concentrations sub-inhibitrices de colistine, surtout quand le gène est associé à un système de régulation (*qseC*/*qseB*) **(137)**. Une recherche de cette structure (*mcr-9*/*qseC*/*qseB*) a été réalisée à partir d'une séquence de référence d'ECC identifiée par l'équipe de Poirel L. (CP031575.1) **(137)**. Le système de régulation n'était pas présent dans les isolats guadeloupéens, suggérant qu'ils n'ont pas un fort potentiel de résistance pour le moment.

C) E. coli ST131 et ST1193 : deux lignées incontournables

En dépit d'une incidence faible en comparaison avec l'hexagone, ces travaux nous ont permis de souligner la prédominance de lignées pathogènes multirésistantes chez cette seconde espèce. Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé les principaux sérotypes à risque identifiés chez les EHEC par Karmali M. *et al*. **(20)**. Le phylogroupe B2 était largement représenté, ce qui reste en accord avec la littérature puisqu'il comporte les lignées les plus virulentes et généralement à l'origine d'infections extra-intestinales (65,9%) **(4,30)**. À l'inverse, comme de précédentes analyses, les phylogroupes C, E et F restent peu représentés **(26)**. Parmi le phylogroupe B2, le ST131 avait déjà été mentionné comme prédominant en Guadeloupe dans des isolats multirésistants d'hémoculture entre 2013 et 2014 (11/20) **(43)**. Nous avons pu confirmer par l'analyse des sérotypes et le typage *fimH* la présence de plusieurs clades pour ce ST, avec une prédominance du clade C (11/14). Comme dans la littérature le clade B n'est pas ou peu représenté au sein des souches BLSE **(37)**. Une large domination des gènes de type *bla*$_{\text{CTX-M}}$ dans la production de BLSE chez cette entérobactérie a aussi été précédemment soulignée chez l'homme et dans les eaux usées urbaines **(13,28,43)**. À l'image des résultats observés en Europe et dans le reste du monde, les infections à ST131 multirésistants sont surtout associées à un gène de type *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ **(36)**. Pour 3 des souches cliniques une localisation chromosomique de ces gènes a été identifiée. Ce type d'insertion au sein de cette lignée a été décrit auparavant au Royaume-Uni, au Rwanda ou encore en Zambie **(36,46,423)**. Dans une récente étude parue aux Etats-Unis, les auteurs ont souligné que 15/22 des isolats de ce ST avaient une intégration chromosomique du gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ **(227)**. Cette intégration implique une possible expansion clonale des bactéries porteuses de cette spécificité comme observé pour les mutations au niveau de la région QRDR **(34)**.

Le second ST le plus représenté chez les patients en Guadeloupe était le ST1193. Il provient du complexe clonal ST14. Les lignées associées à ce complexe sont largement présentes en milieu hospitaliers à travers le monde. C'est notamment le cas aux Etats-Unis, où dans une étude multicentrique sur des prélèvements infectieux entre 2016 et 2017, ce ST était le plus représenté après le ST131-*H30* **(424)**. Comme dans cette étude nous avons aussi mis en exergue que tous les isolats associés étaient de type *fimH64* et présentaient une résistance chromosomique aux quinolones (*gyrA* : D87N, S83L). Ces types de mutation et de résistance sont associés à l'expansion rapide du ST131 **(34)**. Une autre analyse génomique plus complète sur 355 souches ST1193 a mis en évidence qu'une majorité des isolats de cette lignée présentait des mutations supplémentaires au niveau des régions QRDR (*parC :* S80I et *parE* : L416F), et une capsule de type K1. De plus, comme pour le ST131 une coévolution avec des plasmides IncF est observable avec notamment un type [F-:A1:B10] retrouvé dans la majeure partie des isolats locaux (5/8), et pour la plupart prédits comme non-conjugatifs (7/8) **(261,275,288)**. Cette lignée ExPEC est notamment associée à des infections urinaires et porte un set de gènes de virulence spécifique. Une récente étude comparative entre des souches ST131 et ST1193 a souligné qu'ils présentaient les mêmes caractéristiques de pathogénicité et de survie (invasion de cellules T24, résistances sérum / phagocytose / hydrogène peroxyde) **(425)**. Ceci en fait une nouvelle lignée à surveiller en Guadeloupe, d'autant qu'elle a déjà été identifiée dans un isolat issu d'une bactériémie dès 2013 (*bla*$_{\text{CTX-M-27}}$) **(43)**.

La présence de différents gènes *bla*$_{\text{CTX-M}}$ au sein de la population d'*E. coli* et l'avantage d'un gène par rapport à un autre ne sont pas encore bien élucidés. Les enzymes BLSE n'ont pas toutes la même efficacité de réponse face à un traitement antibiotique. En effet, comme indiqué dans les recommandations de l'EUCAST, les BLSE de type CTX-M-1 et -14 n'hydrolysent que très faiblement certaines C3G dont la ceftazidime (http://www.sfm-microbiologie.org). En ce qui concerne les gènes les plus représentés dans ce set de données cliniques, leur distribution reste à l'image de nombreuses régions du monde avec une forte représentation de *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ et l'émergence de *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ **(14)**. Les données de la littérature indiquent que les enzymes associées au gène *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ auraient une plus grande activité hydrolytique face à la ceftazidime en comparaison avec des souches portant un gène *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ dont il dérive (substitution D240G) **(426)**. Il en est de même pour *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ qui dérive du gène *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$ et qui présente les mêmes caractéristiques **(427)**. Les pratiques hospitalières pourraient donc sélectionner les enzymes les plus efficaces chez *E. coli* en amont d'une excrétion dans l'environnement.

D) Une présence de nombreuses lignées de K. pneumoniae complex BLSE à haut risque en Guadeloupe

Tout d'abord, les résultats confortent la distribution inégale des membres de ce complexe, avec comme principal représentant Kp1 (*K. pneumoniae sensu stricto*). Ce phylogroupe reste le plus fréquent dans les infections humaines mais aussi en portage à travers le monde **(90,92,110,112)**. Contrairement au présent projet, une récente étude dans les territoires des Caraïbes a aussi mis en évidence la présence de *K. quasipneumoniae* et *K. variicola* dans une minorité d'échantillons cliniques **(110)**. Cette différence est très probablement due au faible nombre de souches BLSE séquencées chez l'homme actuellement pour ce genre (n=16). Au vu de l'analyse phylogénétique sur le core-génome, nous avons pu identifier une possible transmission indirecte de germes BLSE entre patients, comme évoqué en début de discussion **(91,420)**. C'est notamment le cas pour les souches du ST17 (≤ 13 SNP), ou du ST441 (26 SNP). Les prélèvements provenaient de patients hospitalisés sur différentes périodes et dans plusieurs services suggérant un possible réservoir dans l'environnement de l'hôpital comme pour *Enterobacter* **(76)**.

Étonnamment, le sérotype O1 était peu représenté (1/16). Ce dernier reste majoritaire avec O2 dans d'autres études chez l'homme **(94,98)**. Ceci pourrait s'expliquer par le biais de sélection exercé puisque nous ne nous sommes concentrés que sur les isolats multirésistants **(3)**. À l'exception du ST441, les 6 autres ST retrouvés chez l'homme sont considérés comme des lignées multirésistantes à haut risque **(90)**. Le ST11 qui a été retrouvé chez deux patients est par exemple l'une des principales lignées associées à la production de carbapénémases en Asie **(116)**. On comptabilise plus de 236 publications faisant référence à cette lignée dans la littérature **(90)**. C'est le ST307 qui reste majoritaire chez l'homme en Guadeloupe (5/16 ; 31,3%). Il a été isolé et séquencé pour la première fois en 2009 chez un patient en Iran mais sa première identification daterait de 2008 aux Pays-Bas **(94,428)**. Il a ensuite largement diffusé dans tout le monde pour devenir endémique en Italie, et majoritaire chez l'homme en Angleterre, en Corée ou encore aux Etats-Unis **(3,91,92,241,428)**. Comme le ST258, le ST307 a été à l'origine de nombreuses épidémies nosocomiales même si son score de virulence reste

faible **(94)**. Contrairement aux isolats guadeloupéens la production de yersiniabactine a déjà été mentionnée pour ce ST **(94,428)**. Une très récente revue de la littérature centrée sur cette lignée a souligné la présence de plusieurs clades (I-VI), dont celui qui est le plus à succès est associé aux mutations QRDR ParC-80I et GyrA-83I, comme pour tous les échantillons de la Guadeloupe (clade V) **(428)**. Cette lignée de *Klebsiella* porte le gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ contrairement au clade VI spécifique de l'Afrique du Sud et qui présente en plus le gène $bla_{\text{OXA-181}}$ codant pour une carbapénémase **(197,428)**. Dans le reste du monde et notamment aux Etats-Unis, la production de carbapénémase chez ce ST reste associée au gène bla_{KPC}. Son incidence est cependant bien moins élevée celle du ST258 pour le moment **(3,104,428)**. Au sein des territoires caribéens, un premier « case report » a souligné la possible expansion d'un germe ST307 $bla_{\text{KPC-2}}$ entre des patients hospitalisés à Porto-Rico suivi par une seconde hospitalisation pour un de ces patients en République Dominicaine **(421)**. Cette lignée a aussi été retrouvé avec une CTX-M-15 dans des végétaux dominicains destinés à la consommation humaine **(48)**. Toutes ces caractéristiques en font une lignée à surveiller de près sur le territoire.

Les structures plasmidiques présentes dans ces souches hospitalières sont en corrélation avec la littérature. En effet, on retrouve principalement les groupes d'incompatibilité IncFIB et IncFII_{K} avec différents gènes de résistance **(3)**. Chaque lignée semble par ailleurs présenter un plasmide spécifique avec un pattern de résistance associé. Contrairement à d'autres projets sur ce genre, nous avons identifié uniquement l'enzyme CTX-M-15 comme principale BLSE **(90,241)**. Plusieurs souches présentaient deux gènes codant pour une BLSE en même temps (ResFinder) **(293)**. Cette particularité n'a été retrouvée que chez les KPNC dans la collection ECHANGENE. C'est le cas de l'ensemble des isolats ST307 ($bla_{\text{CTX-M-15}}$ et $bla_{\text{SHV-106}}$). Cette enzyme –SHV a initialement été identifiée au Portugal chez des KPNC cliniques en association ou non avec un gène $bla_{\text{CTX-M-32}}$ **(159,169)**. L'article initial avait par ailleurs souligné que le gène codant pour cette enzyme 2be n'était pas transférable par conjugaison, suggérant une présence chromosomique, ce que nos résultats de prédiction indiquent également sur nos souches **(169)**. Un récent rapport a identifié ce rare variant enzymatique chez des souches de KPNC isolées de patients et dans des effluents en Roumanie **(348)**. Les KPNC sont connues pour présenter la –SHV au niveau du chromosome et dans certaines conditions développer des variants à large spectre **(157,160)**. L'absence de –SHV de type 2be chez les autres genres étudiés souligne bien l'exceptionnelle diffusion des CTX-M par rapport à ce type d'enzyme chez les entérobactéries C3G-R. Par ailleurs, l'approche d'identification des résistances proposées par le logiciel Kleborate a identifié un autre variant pour les souches ST307 ($bla_{\text{HV-28}}$; 2b). Cette différence majeure entre les logiciels rend d'autant plus difficile l'appréciation de la diffusion des enzymes et des mutations « critiques » **(94,293)**. De même, certaines erreurs ont aussi été retrouvées dans la littérature, comme $bla_{\text{SHV-100}}$ notifié 2be alors que ce gène ne confère pas de phénotype BLSE dans la publication d'origine **(159,429)**. Enfin, contrairement aux deux autres genres analysés dans ce projet, et aux récents travaux de Yoon E-J. *et al.*, aucune souche de KPNC hospitalières ne semblait présenter une insertion chromosomique du gène codant pour la CTX-M **(241)**. Dans cette étude coréenne, les auteurs ont notamment souligné la grande « plasticité » de la lignée ST307 avec plus d'un quart des souches porteuses d'une intégration chromosomique à différentes localisations **(241)**.

E) Un environnement nosocomial favorisant probablement le maintien et la diffusion de clones multirésistants

En se fondant sur les données phylogénétiques et l'étude des 3 entérobactéries ciblées au sein du CHUG nous avons aussi pu mettre en évidence un maintien et une probable diffusion de lignées multirésistantes avec leurs plasmides au cours du temps. Une persistance environnementale sur différentes surfaces (évier, matelas, linge de lit, table de chevet, matériel médical…) pourrait expliquer en partie l'incidence des *Klebsiella* et le nombre important d'isolats retrouvés chez les patients et dans des services spécifiques comme les réanimations **(91,92,116)**. Des études plus poussées au niveau nosocomial avec une recherche des possibles réservoirs physiques en relation avec du séquençage ADN permettraient de mieux prendre en compte cette problématique et d'apporter des mesures d'hygiène spécifiques afin de limiter une probable persistance et une diffusion secondaire dans le continuum des eaux usées **(210,416)**. De plus, des lignées avec un haut potentiel de virulence ont déjà été identifiées dans l'environnement hospitalier (*Klebsiella* ST23 ; *ybt, iuc*, K1) **(92)**. Par ailleurs, comme il a été constaté dans la littérature, la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques ne touche pas que le compartiment humain au sein même d'un hôpital. Les insectes sont en effet des niches écologiques d'entérobactéries **(8)**. Il serait donc intéressant de mesurer la prévalence du portage chez les espèces péri-domestiques pouvant théoriquement être présentes dans ces locaux comme les cafards ou les mouches. Ces insectes pourraient être porteurs et diffuseurs de ces germes comme nous l'avons mis en évidence en aval dans les égouts de cet établissement avec les cafards **(46,113,317)**. Enfin, à l'échelle du territoire et des Caraïbes il pourrait aussi être intéressant d'effectuer des études phylogénétiques plus poussées pour mieux évaluer la possible circulation de clones multirésistants entre ces îles **(110,343,413)**.

II. Des eaux usées hospitalières et urbaines associées à la diffusion des résistances.

Les résultats obtenus dans ce projet présentaient des similitudes avec les données précédentes sur les eaux usées guadeloupéennes notamment concernant les espèces BLSE analysées et les co-résistances retrouvées **(28,343)**. Dans le cadre d'ECHANGENE nous avons remarqué une forte prévalence des résistances associées au triméthoprime-sulfaméthoxazole, à la gentamicine ou encore à la ciprofloxacine. Ces différentes molécules antibiotiques restent stables après excrétion et sont détectables dans des environnements comme les eaux usées, ce qui pourrait favoriser le maintien des isolats multirésistants **(258,328)**. Les profils de résistance associés résultent de l'acquisition de gènes de résistances. Les familles d'antibiotiques concernées représentent environ 16,8% de la consommation d'antibiotiques nationale en 2018 dans les hôpitaux (fluoroquinolones : 11,2% ; sulfamides : 2,9% ; aminosides : 2,7%) **(190)**. Dans les secteurs de soins, les aminoglycosides peuvent par exemple être utilisés avec des céphalosporines en traitement empirique dans le cas d'infections communautaires **(176)**. Les fluoroquinolones qui étaient largement utilisées auparavant ont vu leur consommation diminuer de 27% dans les hôpitaux entre 2012 et 2018 suite aux indications de l'ANSM **(130,190)**. Les profils de résistance des isolats dans les eaux usées semblent donc en adéquation avec les

antibiotiques qui sont couramment utilisés en médecine humaine. Par ailleurs, cette consommation reste bien inférieure aux 64% de β-lactamines dans les secteurs de soins **(190)**.

A) *Une expansion dans le continuum des eaux usées : focus sur Enterobacter*

L'article présenté au **Chapitre 3** résume l'ensemble des données associées à ECC au sein du continuum des eaux usées **(385)**. Seules 7 souches sur les 63 (11,1%) ont été séquencées pour ce compartiment. Ces isolats BLSE étaient dans la majorité des cas proches de souches humaines comme souligné pour les souches ST114 (n=3) qui présentaient un minimum de 17 SNP pour un maximum de 262 SNP de différence avec des isolats cliniques **(385)**. En dépit des difficultés d'identification pour ce complexe d'espèces, *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* a déjà été retrouvé dans cette matrice (SAMN09229069) tout comme un plasmide de résistance semblable (IncHI2/ST1/$bla_{\text{CTX-M-15}}$) **(70,418)**. De plus, ce projet a permis d'isoler pour la première fois des souches du clade L dans les eaux usées (ST598 ; n=3) **(69)**. Elles étaient également phylogénétiquement très proches des souches humaines retrouvées en amont, avec un minimum de 19 SNP, pour un maximum de 38 SNP entre ces deux compartiments **(385)**. L'origine humaine de ce pathogène émergent sur l'île est ici clairement démontrée tout comme dans la littérature **(70)**. Ce ST avait en effet été retrouvé en amont chez 3 patients entre mai 2018 et mars 2019 et dans aucun autre compartiment de ce projet de thèse **(408)**.

B) *E. coli : un marqueur des BLSE retrouvées chez l'homme*

Les infections à *E. coli* multirésistantes au niveau de l'hôpital restaient très minoritaires comme le sous-entend le nombre de souches dans notre collection et l'incidence régionale (43/243) **(39)**. La méthode utilisée par milieu chromogène sélectif nous a permis cependant d'isoler des souches dans la plupart des échantillons des eaux usées. En effet le milieu CCA est un milieu chromogène qui permet de facilement distinguer les colonies associées à cette espèce (couleur bleue) des autres coliformes (couleur rose ; **Figure 80**). En revanche, les genres *Enterobacter* et *Klebsiella* qui présentaient un aspect très similaire sur gélose, nous ont contraints à repiquer sur un second type de milieu où les aspects des colonies étaient plus facilement distinguables (*i.e.* BCP). Il pourrait donc y avoir une sous-estimation des ces deux autres genres dans nos prélèvelements.

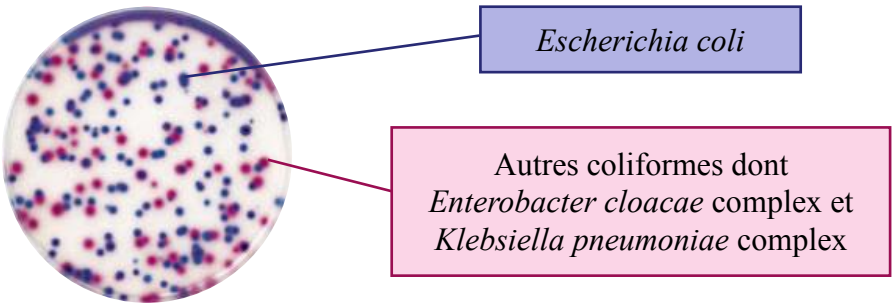


Figure 80. Aspect des bactéries recherchées sur le milieu chromogénique CCA.

Les précédents travaux ont souligné une prédominance du phylogroupe A dans la collection de souches d'*E. coli* non-BLSE provenant des eaux usées et des cours d'eau associés (39,6 %). À l'inverse, les souches BLSE avaient une distribution plus homogène (phylogroupe A, n=8 ; B2, n=6 ; B1 n=5 et D, n=2) **(28,343)**. Dans notre sélection de souches résistantes, les lignées étaient très diverses, avec une majorité d'isolats des phylogroupes D et B2 (31,4% et 29,4%). En nous fondant sur les différences de SNP entre collections nous avons observé une forte similarité entre des isolats humains et d'eaux usées pour certains ST (ST38, ST131, ST1193 et ST2599). Le *ratio* nombre de ST sur nombre de souches séquencées pour cette espèce était de 0,46 en entrée de la STEP (6/13), contre 0,61 (8/13) en sortie, avec une majorité de ST38 et de ST131 dans les deux cas. Ces deux ST faisaient aussi partie des principales lignées observées au Royaume-Uni dans des prélèvements semblables **(15)**. Ils ont aussi été retrouvés au point intermédiaire de Bergevin mais pas au CHUG. En effet, le ST3580 était majoritaire en sortie de l'hôpital (3/10), ce qui suggère que les effluents de l'établissement analysé ne sont pas les seuls pourvoyeurs d'*E. coli* BLSE, et qu'une part importante des ST d'intérêt pourrait provenir de la communauté.

En ce qui concerne les enzymes CTX-M retrouvées, les *E. coli* des eaux usées présentaient en majorité le type CTX-M-15 (68,2%) suivi par une CTX-M-27 (21,6%). Il s'agissait aussi des deux principales enzymes retrouvées chez des *E. coli* dans les eaux usées au Royaume-Uni entre 2014 et 2015. À l'inverse, elles étaient minoritaires en Thaïlande dans une analyse semblable à la même période. Elles représentaient moins de 12% de la collection et les enzymes CTX-M-14 (49,2%) et CTX-M-55 (40,0%) étaient majoritaires **(42)**. Ce clivage pour les *E. coli* des effluents entre ces différentes parties du monde reste en accord avec les tendances de la distribution des CTX-M chez l'homme en l'Europe et dans cette région d'Asie **(14)**. Ces résultats suggèrent que la Guadeloupe présente une diversité enzymatique pour les BLSE plus proche du continent Européen. Cette observation pourrait être corrélée avec les flux majoritaires de passagers entre l'hexagone et la Guadeloupe.

C) Une expansion de clones de K. pneumoniae complex peu décrite à l'international

La forte proportion de prélèvements d'eaux usées positifs à KPNC (84,6%) est probablement corrélée avec sa prédominance parmi les souches cliniques **(88)**. Ce petit set de souches séquencées a permis de souligner un lien fort entre le compartiment eaux usées et les prélèvements de l'hôpital tous ST confondus. Ce lien n'était pas aussi important dans deux autres collections provenant d'Angleterre et de Thaïlande. En effet, même si des isolats de *Klebsiella* étaient présents sur une même clade dans les arbres respectifs, très peu partageaient une relation phylogénétique **(92,112)**. Parmi les ST producteurs de BLSE précédemment retrouvés dans les eaux usées il y a notamment les ST17, ST35 et ST307, identifiés en Thaïlande et en Roumanie **(94,112,348)**. Retrouver autant de souches de *Klebsiella* semblables sur une aussi longue distance et jusqu'à la sortie de la station reste préoccupant et souligne encore une fois le rôle central des eaux usées comme « véhicule ». En Roumanie, une équipe de recherche a aussi clairement mis en évidence la circulation d'un clone producteur de BLSE entre patients et effluents de l'hôpital avant et après traitement par chloration (ST101 ; < 18 SNP) **(348)**.

Par ailleurs, contrairement à la précédente analyse des eaux usées menée en Thaïlande nous avons aussi identifié des mutations *gyrA* et *parC* chez les KPNC non-cliniques **(112)**. Ces mutations étaient exclusivement retrouvées chez Kp1, ce qui est en accord avec les données globales puisqu'elles sont rares pour les autres phylogroupes **(94)**. Un profil [ParC-80I, GyrA-83F, GyrA-87A] a été précédemment retrouvé dans des échantillons cliniques appartenant au ST152 dans différents territoires caribéens. La même observation a été faite pour les lignées ST11 et ST307 avec le profil [ParC-80I, GyrA-83I] **(110)**. Selon les stations du territoire cette diffusion dans l'environnement pourrait être problématique. En effet, au vu des profils de résistance et de typage pMLST les souches humaines et environnementales de KPNC semblent aussi présenter les mêmes structures plasmidiques. En l'absence de séquençage « long-reads » nanopore pour ces isolats, une première analyse de la collection de ST307 a été réalisée par mapping. En utilisant la base de données PLSDB nous avons pu identifier un possible plasmide de référence de *Klebsiella* retrouvé en Australie et proche des isolats guadeloupéens (CP024500.1 ; 243 620 pb ; moyenne Mash screen : 0,998) **(177,273)**. Par cette première approche de mapping les plasmides hypothétiques de la collection ST307 présentaient un pourcentage d'identité avec la référence allant de 86,2% à 94,2% (taille : 243 720 – 250 379 pb). Cette similarité a aussi été observée pour d'autres ST de la collection (données non-présentées), suggérant une co-évolution entre un plasmide de résistance donné et une lignée de KPNC, et la cirulation des mêmes éléments dans les effluents.

III. Des bactéries multirésistantes au sein de la faune sauvage évoluant près des STEP

A) Un portage important chez les animaux de cet écosystème

Au sein de la faune sauvage guadeloupéenne, seules des souches d'*E. coli* productrices de BLSE ont été isolées précédemment **(43)**. Dans le présent projet, la prévalence d'animaux sauvages positifs à une *E. coli* BLSE était de 47,1% (41/87), indépendamment de la classe et de l'espèce considérée. Si l'on compare les espèces et genres communs aux deux études (*i.e. Anolis*, *Rattus* et *Quiscalus lugubris*), la prévalence d'échantillons positifs à *E. coli* BLSE était significativement bien plus importante chez les animaux vivant au sein de la STEP que dans le reste de l'archipel ($p=1\times10^{-8}$; **Tableau 24**) **(43)**. Cette prévalence peut également varier selon la STEP considérée. Ainsi, dans une étude menée au Royaume Uni en 2016 la prévalence de souches d'*E. coli* BLSE chez des mammifères et des oiseaux sauvages vivant près d'une STEP était de 5,6% (7/125) contre 42,1% (8/19) en Guadeloupe. Cette différence de résultats avec l'équipe anglaise pourrait aussi s'expliquer par la méthodologie adoptée pour l'isolement des souches résistantes (milieux, absence de sélection avec C3G), et appuie l'importance d'homogénéiser les pratiques entre laboratoires de recherche **(308)**. Les précédents profils de résistance au sein de la faune sauvage en Guadeloupe présentaient une résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole pour la majorité des souches analysées chez les animaux (6/7), en plus de la synergie typique d'une BLSE **(43)**. Une seule souche était résistante aux fluoroquinolones, et aucune ne présentait un phénotype résistant à la gentamicine contrairement à la majeure partie des isolats de la faune autour de la STEP. Ces résultats sont en faveur d'une

possible co-sélection dans cet environnement et de circulations plus importante de plasmides du compartiment humain *via* les eaux usées.

Tableau 24. Comparaison des prévalences d'animaux porteurs d'*E. coli* BLSE entre deux projets guadeloupéens (2013 – 2014 et 2018 – 2019) (43). Seuls les échantillons similaires entre les deux études ont été conservés dans ce tableau, ils correspondent à l'espèce *Quiscalus lugubris* et aux genres *Anolis* et *Rattus* ; A noter que même si le milieu de culture initial était différent (*i.e.* gélose lactosée au TTC/Tergitol 7), un pré-enrichissement a aussi été effectué dans de l'eau peptonée, et des antibiotiques ont été additionnés à la gélose, dont 2 mg/L de cefotaxime.

Site de prélèvement	**Nombre d'échantillons similaires** ***(N=681)***	***E. coli*** **BLSE+** ***N (%)***	***p-value***
Station d'épuration	39	9 (23,1)	1×10^{-8}
Urbain / non-urbain	642	6 (0,93)	

B) Une dichotomie dans la diversité des gènes de résistance retrouvés

La recherche BLASTn d'une séquence *intI*1 typique a permis de souligner la présence de cette structure de capture de gènes pour 66,1% des souches de la faune sauvage (39/59). Aucune des souches d'*Enterobacter* non-cliniques de la **Partie I** (*Anolis*, fruits, légumes, eau, animaux de ferme) ne présentait cette intégrase **(251,254,408)**. Ensuite, si l'on s'attarde uniquement sur les animaux semblables retrouvés dans ce projet et le précédent article pour la collection de souches d'*E. coli* BLSE séquencées (*i.e. Rattus* et *Quiscalus lugubris*), le nombre de gènes de résistance communs entre les échantillons humains et ces 14 souches d'animaux était aussi bien plus important pour la faune de la STEP (n=17) que pour les précédents prélèvements (n=9 ; **Figure 81**). Cette dichotomie se retrouve notamment pour les gènes $bla_{\text{CTX-M}}$ puisque les précédents gènes identifiés dans ce compartiment ne reflétaient pas l'incidence clinique locale **(43)**. En effet, le gène $bla_{\text{CTX-M-15}}$ majoritaire dans l'ensemble de la sélection en **Figure 81** (78/126 ; 61,9%), a été identifié pour 6 des 7 souches sélectionnées des animaux de la STEP mais n'avait pas été mis en évidence dans les souches du compartiment animal de l'étude précédente. En comparaison, le gène $bla_{\text{CTX-M-1}}$ n'a été retrouvé que dans 9 isolats, dont seulement 3 provenaient d'échantillons humains et 4 des animaux prélevés entre 2013 et 2014. Les autres gènes partagés entre la faune sauvage et l'homme lors du précédent projet étaient associés à la résistance aux aminoglycosides, *β*-lactamines, tétracyclines, sulfamides et au triméthoprime. Pour les animaux de la STEP, des gènes associés à la résistance aux phénicols et aux fluoroquinolones étaient également communs avec les souches humaines (**Figure 81**). Cependant, les souches séquencées chez les animaux pour le projet ECHANGENE ayant été sélectionnées selon un profil semblable à celui des autres compartiments (homme / eaux usées) cela a pu entrainer un biais dans l'identification de patterns de gènes de résistance similaires.

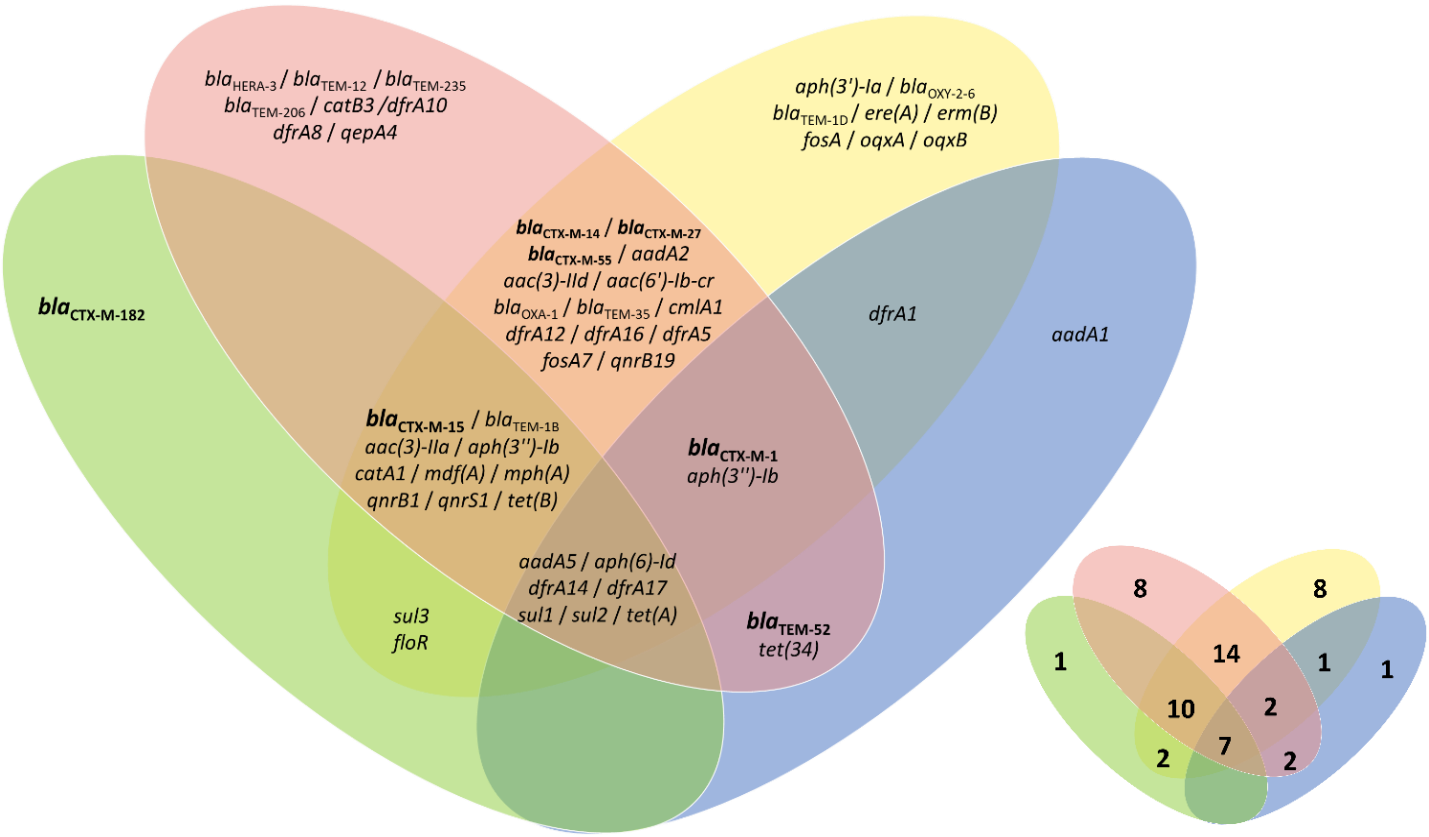


Figure 81. Diagramme de Venn représentant les gènes de résistance aux antibiotiques identifiés parmi les souches *E. coli* BLSE du projet ECHANGENE (n=99), et d'une précédente étude sur la faune sauvage en Guadeloupe (n=27) (43). Concernant la collection animale seules les souches séquencées issues d'échantillons similaires entre les deux études ont été conservées dans cette figure ; ces échantillons appartiennent au genre *Rattus* (n=7 souches) et à l'espèce *Quiscalus lugubris* (n=6) ; les données des souches humaines des deux projets ont été fusionnées ensemble soit 51 souches, car elles proviennent toutes du même hôpital (20+41) ; les couleurs correspondent aux différentes origines : homme en rouge, eaux usées en jaune (n=51), animaux sauvages de la station en vert (n=7), et animaux sauvages du précédent projet en bleu (n=7) ; les gènes conférant un profil BLSE sont indiqués en gras ; se référer à la **Figure 33** pour plus de détails sur le précédent travail.

Au niveau des plasmides de résistance, la précédente étude guadeloupéene avait souligné la présence d'une structure de type IncI1/ST3/*bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ circulant chez *E. coli* entre l'homme (n=2) et les animaux sauvages (n=4) **(43)**. Le groupe d'incompatibilité IncI1/ST3 a été identifié pour seulement 4 souches d'*E. coli* (2,9%) dans le projet ECHANGENE. Ces isolats ont été retrouvés dans chacun des compartiments analysés (homme=1 ; eaux usées n=2 et crapaud n=1). Les autres plasmides de type IncI1 (n=17) étaient majoritairement associés à un profils pMLST non déterminé (n=9) ou au ST26 (n=4). De plus, 5 souches d'*E. coli* étaient porteuses d'une CTX-M-1 plasmidique (3,6%), dont 4 étaient corrélées avec une signature IncI1/ST3, suggérant une possible structure plasmidique semblable entre les deux projets. L'analyse de 3 de ces nouveaux plasmides par un assemblage hybride a permis de souligner une forte homologie entre ces isolats de différentes lignées (pGESC055, pGESC099, pGESC288). En effet, ils présentaient une taille comprise entre 105 090 et 110 955 pb, et la structure la plus simple (pGESC099 ; eaux usées – point B) avait un pourcentage d'identité nucléotidique de 93,9% avec pGESC288 (crapaud) et de 99,2% avec pGESC055 (eaux usées – point C). La même structure présentait entre 95,3% et 99,3% d'identité nucléotidique avec les précédents plasmides IncI1/ST3/*bla*$_{\text{CTXM-1}}$ retrouvés sur le territoire (non présenté dans la partie résultats) **(43)**. Il y a donc une petite persistance du gène *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ dans l'environnement grâce à ce groupe d'incompatibilité.

C) E. coli : une importante diversité chez les animaux

Comme mentionné précédemment, les données de séquençage de phénotype BLSE concernant *E. coli* restent très limitées pour le compartiment animal en Guadeloupe (sauvage ou domestique) **(43,185)**. Nos résultats axés sur un environnement fortement anthropisé ont indiqué une présence très importante de souches d'*E. coli* productrices de BLSE chez les animaux sauvages qui vivent et se nourrissent au sein de la STEP et le long du continuum des eaux usées (41/87 ; 47,1%). Dans le précédent projet et en accord avec la littérature, le phylogroupe B1 était prédominant (6/8 ; 75%) **(32)**. Les deux derniers isolats étaient associés aux phylogroupes A et D respectivement **(43)**. Si l'on prend en compte uniquement les souches d'*E. coli* de la faune sauvage du projet ECHANGENE (n=32). Le phylogroupe majoritaire était aussi le B1 (10/32 ; 31,3%). Les phylogroupes A et D étaient les suivants avec 6 souches chacun (18,8%). De manière surprenante nous n'avons pas identifié d'isolat du phylogroupe B2 au sein de cette faune alors qu'il était majoritaire dans les eaux usées avec le D (29,4% et 31,4%). Cette compartimentation des lignées et des phylogroupes a déjà été évoquée dans des collections de souches BLSE humaines et d'animaux de rente **(31)**. Par ailleurs, un récent projet de screening mené sur la faune sauvage au Mexique a aussi rapporté l'importance du phylogroupe B1 dans ce compartiment. Celui-ci représentait 47% de leur collection mais il était suivi par le B2 (18%), puis par les phylogroupes A (14%) et D (13%) **(430)**.

En ce qui concerne les sérotypes complets au sein de la faune sauvage, le sérotype O9:H9 a été identifié au Nigéria où il était prédominant dans une collection de souches BLSE isolées d'aigrettes, et dans des isolats multirésistants de viandes de porc et de bœuf au Portugal **(314,431)**. Ce sérotype est fréquemment retrouvé chez l'homme pour des souches à l'origine d'infections extra-intestinales **(4)**. Le sérotype O46:H31 a été caractérisé pour des souches du pathovar AIEC chez l'homme, et le O21:H21 dans une importante collection de STEC isolées de viandes de gibier en Allemagne **(24,432)**. Enfin, le sérotype O86:H18 qui est généralement associé au ST38 a été mentionné dans des isolats BLSE de la faune sauvage au Brésil **(352,433)**. Chez l'homme ce sérotype était prédominant au Japon dans une étude clinique au début des années 2000. Il a été associé à différentes épidémies dans plusieurs provinces du pays. Il correspondait de nouveau au ST38 et présentait un gène $bla_{\text{CTX-M-9}}$ **(434)**.

En comparant les données obtenues chez *E. coli* pour les animaux semblables retrouvés dans ce projet et le précédent article (*i.e. Rattus* et *Quiscalus lugubris*), le *ratio* nombre de ST sur nombre de souches séquencées pour cette bactérie était de 1 pour ECHANGENE (7/7), contre 0,71 (5/7) en dehors de la STEP **(43)**. Il y aurait donc une plus grande diversité chez les *E. coli* portées par les animaux de la station. En observant l'ensemble de ces précédentes données de séquençage, aucune souche ne présentait un ST commun avec la collection d'isolats cliniques en Guadeloupe. Même si ces animaux vivaient dans des zones plus ou moins anthropisées, leurs souches ne semblaient pas directement apparentées à l'homme **(43)**. Pour ECHANGENE, parmi les 19 ST retrouvés au sein de l'ensemble de cette faune, 3 ont aussi été identifiés en amont en clinique pour la même période, soit 15,8% (ST38, ST69, ST3580). Le ST410 identifié chez un rat avait déjà été retrouvé chez l'homme en Guadeloupe entre 2013 et 2014 avec le même pattern de gènes de résistance **(43)**. Il reste aussi l'un des principaux ST producteurs de BLSE chez l'homme en général et il a déjà été mentionné au sein de la faune

sauvage **(40,52)**. Cependant, une mesure des SNP entre ces 3 isolats a souligné une forte distance entre ces souches humaines et celle du rat probablement imputable aux années d'isolement (min 18 226 SNP).

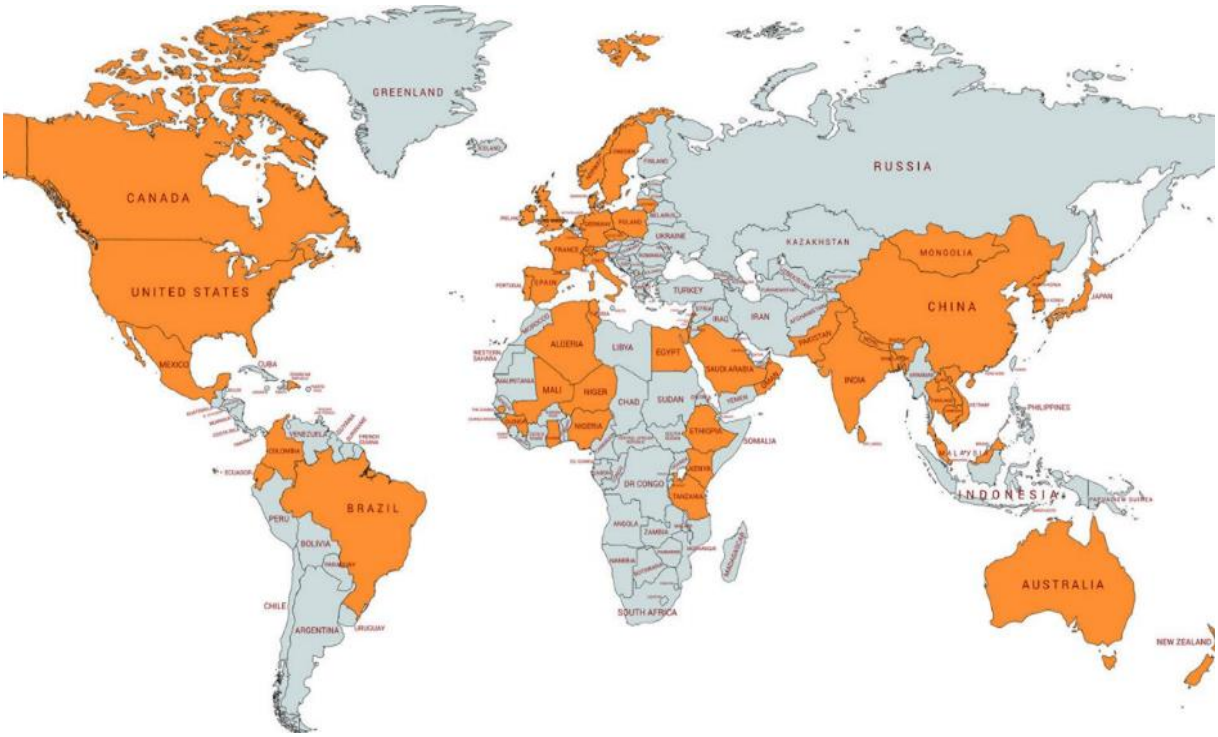


Figure 82. Distribution mondiale de la lignée *E. coli* ST38 (433). Les pays où ce ST a été identifié sont colorés en orange (année 2020).

Le comportement synanthropique était clairement plus important pour la faune échantillonnée dans ce projet, avec un contact direct avec les matières fécales humaines pouvant expliquer la forte prévalence de souches d'*E. coli* BLSE et l'importance du nombre de gènes et de ST partagés avec l'homme **(385)**. Ces observations confirment le rôle des eaux usées et de l'environnement de la STEP comme réservoir et points chauds pour les clones résistants d'*E. coli*, et leur intérêt pour l'étude de la circulation plasmidique **(15,42)**. Nous nous sommes attardés sur 3 ST, ST38, ST3580 et ST6745, de la collection *E. coli* de la faune sauvage ECHANGENE, appartenant respectivement aux phylogroupes D, B1 et E. Tout d'abord, *E. coli* ST38 fait partie des lignées largement rapportées dans des infections chez l'homme à travers le monde, avec aussi un isolement dans les eaux usées urbaines (**Figure 82**) **(40,42,45,46,227,433,434)**. Ce continuum serait à l'origine de sa présence chez un bivalve (*Perna perna*) près d'une zone portuaire au Brésil **(352)**. Son expansion au sein de la faune sauvage terrestre et l'environnement est aussi mentionnée à plusieurs reprises à travers le globe, notamment dans un contexte urbain ou péri-urbain chez des rats, des ratons-laveurs, des vautours ou encore des mouches (*i.e.* ferme et hôpital) **(12,46,48,310,313,433)**. L'isolement chez les charognards pourrait s'expliquer par la consommation de carcasses d'animaux domestiques ou péri-domestiques **(309)**. Dans des lieux plus reculés (désert de Gobi en Mongolie) et donc indépendamment d'une forte pression anthropique, ce ST a aussi été retrouvé chez des oiseaux de proies avec une intégration chromosomique du gène codant pour l'enzyme

CTX-M **(183)**. La présence de gènes BLSE sur le chromosome de certaines souches de notre collection a été aussi été soulignée (exemple : ST38, ST3580). Cette localisation pourrait permettre à ces gènes de perdurer plus longtemps au sein de la faune sauvage même en l'absence de pression de sélection **(183,241)**. En ce qui concerne le ST3580, cette localisation serait pour le moment peu fréquente dans le monde et son expansion environnementale pourrait être une spécificité guadeloupéenne. Par ailleurs, à la suite de notre première analyse phylogénétique pour cette lignée, de nouveaux isolats de ce ST provenant d'un voyageur européen de retour du Zanzibar et d'un patient hospitalisé en Zambie présentaient aussi cette intégration chromosomique **(180,423)**. De plus les auteurs et d'autres travaux ont souligné que cette structure *ISEcp1-bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ + *qnrS1* était déjà présente chez d'autres ST d'*E. coli* au niveau chromosomique, et au sein du genre *Salmonella* **(183,423)**. Ce gène *qnr* apporte cependant une faible résistance aux fluoroquinolones, et d'autres transposons avec ces résistances ont fait l'objet de récents travaux **(7)**. L'association IS et gène de résistance « *ISEcp1-bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ » a aussi été soulignée dans une intégration chromosomique en dehors des *Enterobacteriaceae* chez *Acinetobacter* **(171)**. En ce qui concerne le ST6745 une analyse des autres souches affiliées à ce ST sur la base de données EnteroBase (01/07/2021 ; http://enterobase.warwick.ac.uk/) a mis en évidence qu'il était très rare avec seulement 8 souches séquencées, et toutes non-BLSE. Parmi les origines identifiables, 3 étaient issues d'animaux et 2 d'un lac. Ces souches ont principalement été isolées sur le continent asiatique (n=5). Aucun de ces isolats ne présentait un réplicon IncHI2. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'une diffusion du plasmide IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ qui semble avoir récemment eu lieu sur le territoire guadeloupéen pour cette lignée.

D) Une circulation de lignées clinique de K. pneumoniae complex

La collection de KPNC isolées chez les animaux sauvages pose une problématique importante. En effet, grâce au séquençage complet et l'approche MLST nous avons pu mettre en évidence une forte circulation de souches d'intérêt clinique et de clones multirésistants considérés comme à haut risque **(90,428)**. Ces souches à l'origine d'infections au sein du CHUG circulent avec leurs propres éléments génétiques mobiles, et il semble qu'au sein de cette espèce les plasmides soient inféodés à un fond génétique spécifique même chez les animaux sauvages. C'était notamment le cas pour les souches du ST307 comme mentionné précédement. Ces isolats multirésistants avec un « passif infectieux » étaient aussi majoritaires chez l'homme dans le reste des Caraïbes (ex : ST11, ST152 et ST307) **(110)**. Par ailleurs, leur identification au sein de la faune sauvage reste très sporadique dans le monde. Le ST307 a par exemple été retrouvé chez un rat (*R. rattus*) en Guinée en 2015. Cet isolat présentait aussi un gène *bla*$_{\text{CTX–M–15,}}$ un plasmide de type IncF [K7:A-:B-] et un panel de gènes de résistance semblable à celui retrouvé pour ce ST dans notre projet **(94,310)**. De plus, selon l'importante collection du NCBI analysée par Lam M. M. C. *et al.*, ce serait la première fois que les ST152 et ST441 sont retrouvés chez des animaux sauvages **(94)**. La diversité reste cependant bien moindre en comparaison des souches d'*E. coli*. Fait important, dans les précédentes analyses au sein de la faune sauvage du territoire aucune souche de KPNC BLSE n'avait été identifiée. La prévalence pour ECHANGENE pour ces animaux était de 54% (47/87) **(343)**.

E) Un écosystème spécifique au détriment de la santé des animaux

Au vu du manque de connaissances zoologiques, le caractère asymptomatique du portage (ou passage) des germes sélectionnés reste difficile à apprécier. De plus, les résistances observées (antibiotiques, métaux lourds) reflètent très probablement une partie de l'exposome auquel l'animal et son microbiote sont associés. L'isolement de germes producteurs de BLSE dans leurs fèces qu'un indicateur parmi d'autres de l'impact de la pollution anthropique. La santé de ces animaux est probablement mise en jeu avec d'autres risques microbiologiques mais aussi chimiques. Or, les îles des Caraïbes, « hot-spot » de la biodiversité, malgré les petites surfaces terrestres, présentent plus de 779 espèces endémiques directement menacées par les activités humaines (seulement vertébrées sans la faune marine). L'assainissement serait à mieux considérer dans cette problématique écologique **(368,369)**. Si l'on se concentre sur les populations d'oiseaux et les germes qui circulent, des cas d'épidémies de botulisme aviaire dans des zones humides directement reliées aux effluents de stations, et un portage de bactéries pathogènes comme *Salmonella* spp. ont été décrits dans la littérature **(326)**. Dans notre collection, cette circulation de pathogènes est illustrée par *E. coli* ST3580 par exemple. En effet, cette lignée est très fréquemment isolée dans les fermes de dindes aux Etats-Unis (*i.e. E. coli* pathogène aviaire, APEC ; https://enterobase.warwick.ac.uk/). Une analyse plus poussée des gènes de virulence en présence pour les espèces isolées pourrait faciliter la compréhension de cette expansion au sein de ce réservoir et permettrait une meilleure appréciation des risques pour ces animaux. Ce risque a déjà été observé pour des lignées de *K. pneumoniae* hypervirulentes **(435)**. Par ailleurs, dans les travaux de Marcelino V. R. *et al.* sur les oiseaux évoluant près de STEP et porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques, des individus malades ou porteurs de différents virus aviaires (symptômes de la maladie de Newcastle, virus de la grippe aviaire) ont aussi été identifiés. L'une des hypothèses émise par les chercheurs est qu'une charge importante de bactéries résistantes pourrait aussi avoir un impact sur l'immunité et la sensibilité des individus aux maladies virales **(311)**.

En plus des bactéries, les eaux usées renferment des concentrations en métaux lourds et autres molécules chimiques. Cette concentration pourrait être conséquente en raison de phénomène d'accumulation **(258,325,328,342,436)**. Par exemple, les crapauds buffles (*Rhinella marina*) observés notamment dans les clarificateurs et en amont près des dégrilleurs sont très probablement exposés à des concentrations relativement importantes de molécules chimiques tout au long de leur vie. Une étude menée dans l'archipel des Bermudes a suggéré que ces polluants seraient à l'origine de malformations, d'une diminution de l'immunité et d'une plus forte vulnérabilité aux infections parasitaires chez ces batraciens **(437)**. Au niveau aviaire, il a aussi été démontré une influence négative sur le développement des oisillons d'hirondelles bicolores (*Tachycineta bicolor*) issus de couvées à proximité de STEP en comparaison d'animaux nés dans un site non exposé aux eaux usées urbaines. Le régime alimentaire de ces oiseaux était en effet composé d'insectes ayant pour la plupart un lien direct avec les effluents. Ils peuvent donc bioaccumuler différents composés. Un succès reproductif plus faible et un poids plus élevé du foie des oisillons ont été observés chez ces hirondelles. L'atteinte hépatique peut être liée à de nombreux facteurs dont l'exposition à des produits chimiques. Les carcasses de ces oisillons présentaient notamment un niveau plus important de

PCB **(436)**. Un déclin de la population sauvage sur le site de la STEP serait donc un premier indicateur d'une pollution anormale (pathogène / chimique).

Enfin, les rivières, la mer et notamment les sédiments sont le réservoir final de la pollution et des résistances **(184,306,368)**. Cette conclusion est problématique lorsque l'on sait que les principales cassettes de résistance retrouvées dans l'environnement proviennent aussi de taxons bactériens marins **(253)**. La faune marine associée peut donc présenter des germes résistants et bioaccumuler des composés chimiques dont la chlordécone et des métaux lourds avec un risque de se retrouver dans la chaine alimentaire. Ces concentrations varient selon l'espèce, le régime de l'animal et la proximité avec les zones d'activités **(6,182,255,352,438)**. La diffusion d'hormones est aussi préocupante **(255)**. Un impact négatif significatif et localisé est observable dans ce compartiment comme l'a décrit une étude sur des poissons capturés autour du rejet d'une base scientifique en Antarctique (*Trematomus bernacchii*). Ces animaux présentaient un plus grand nombre d'atteintes sévères sur leurs organes (*i.e.* foies, branchies) que d'autres individus prélevés à une plus grande distance du point de rejet **(255)**. En Guadeloupe, l'impact possible d'une fuite des eaux usées sur la faune aquatique a notamment été mentionné à Ste-Anne en 2021. Elle a abouti à la mort de nombreux poissons dans un cours d'eau (**Annexe 4**).

F) Une possible persistance environnementale de la résistance

Nous avons pu mettre en évidence un portage de germes résistants dans la faune sauvage et péri-domestique de la STEP, néanmoins il est difficile de savoir si ce portage est pérenne notamment en l'absence de pression de sélection. Il serait intéressant de connaître la longévité de ce type de portage au sein de cette faune si celle-ci n'est plus en contact avec ces polluants émergents, puisqu'il est possible qu'une résilience de leur microbiote s'opère. Une première analyse que nous avons menée sur des cafards semble indiquer que ces insectes ne sont pas des réservoirs d'entérobactéries multirésistantes sur le long terme. En effet, après 9 jours de captivité près de 77,8% des individus n'excrétaient plus d'entérobactéries BLSE (7/9) (**Annexe 6**). Cette observation ne peut cependant pas être généralisée pour toutes les espèces animales prélevées. Pour le genre *Klebsiella*, le ST17 a été retrouvé dans les 3 compartiments dont des oiseaux avec un plasmide de type IncF [K7:A-:B-]. Une étude norvégienne portant sur le même ST et son plasmide ($IncFII_K$/$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$) a souligné une importante stabilité sur 2 ans de cet élément au sein du microbiote intestinal de jeunes patients, et sans pression de sélection spécifique **(178)**. Dans l'environnement aquatique naturel, les KPNC résistantes peuvent être plus représentées qu'*E. coli* contrairement aux eaux usées **(439)**. Par exemple, le même réplicon IncF a été retrouvé chez des souches de KPNC ST258 présentant un gène $bla_{KPC\text{-}2}$ isolées d'un échantillon de rivière en Croatie. Ce germe résistant présentait une bonne adaptation à l'environnement aquatique puisqu'après 50 jours dans ce milieu les chercheurs ont constaté une très faible diminution du nombre de bactéries résistantes viables (-0,4 log UFC/mL) **(204)**. Des tests de ségrégation des plasmides *in-vitro* et de survie pour les principaux clones retrouvés au sein de la faune sauvage pourraient permettre d'apporter un premier élément de réponse sur la persistance des résistances.

L'intégration chromosomique du gène codant pour la BLSE chez certaines souches d'*E. coli* entraine une meilleure stabilité du gène au sein d'une lignée. Des échantillonnages ciblés menés à une plus grande échelle sur le territoire devraient permettre d'identifier si cet évènement génétique reste limité à des environnements comme les STEP ou si une large diffusion de ce type d'intégration chromosomique est déjà en place dans les différents compartiments, et notamment la faune sauvage **(183)**. En effet, les précédentes campagnes datent de 2013 – 2014, et des changements ont pu s'opérer depuis **(43)**. Par ailleurs, pour reprendre l'exemple du ST3580 chez *E. coli*, il a été mis en évidence que les souches du phylogroupe B1 dont fait partie ce ST présentent généralement moins d'éléments génétiques mobiles et pourraient être plus adaptées à l'environnement en comparaison du B2 qui serait plus spécifique de l'homme **(55)**. Dans notre collection, ce phylogroupe était le plus représenté entre les eaux usées et les animaux après le phylogroupe D (19 contre 22 isolats). D'autres travaux ont précédemment souligné la persistance de souches B1 dans des matrices secondaires comme les plantes. Il a en effet été mis en évidence que l'origine des récentes épidémies chez l'homme avec le sérotype O104:H4 (B1) serait associée à la consommation de végétaux contaminés **(5,56)**. Selon les auteurs d'une étude comparative, les souches B1 seraient plus généralistes et présenteraient un index d'association avec les plantes significativement supérieur à celui des autres phylogroupes. Cet index découle notamment d'une plus grande capacité à former du biofilm et à acquérir certains nutriments associés aux plantes (sucrose, raffinose) **(56,440)**. Ce phylogroupe était d'ailleurs majoritaire dans des isolats BLSE issus de légumes retrouvés dans 4 pays différents **(48)**.

Dans un premier travail annexe en janvier 2020, nous avons réalisé des prélèvements du sol à différents points de la STEP afin de mesurer une possible diffusion ou persistance environnementale de germes C3G-R (**Annexe 5**). Ces travaux ont permis de mettre en évidence des souches des 3 espèces d'entérobactérie recherchées dans 54,2% des échantillons (13/24). Un de ces derniers était par ailleurs associé aux déchets du dégrilleur (SOL27 ; **Annexe 5**). Cinq échantillons positifs présentaient des germes C3G-R (20,8% ; BLSE, céphalosporinase hyperproduite). Les autres étaient non résistants. Ces observations contrastent de nouveau avec une étude guadeloupéenne axée sur le suivi des entérobactéries multirésistantes en culture maraichère **(259)**. En effet, Sadikalay S. *et al.* avaient souligné par une approche de culture similaire, que les isolats résistants étaient présents uniquement dans les intrants. La concentration d'entérobactéries restait stable dans les sols amendés ($2{,}86\times10^4$ UFC/GMS), et un mois après la récolte ($7{,}31\times10^4$ UFC/GMS). Ces sols présentaient notamment des souches d'ECC et de KPNC qui sont généralement plus représentées qu'*E. coli*, mais aucune entérobactérie productrice de BLSE n'avait été isolée **(8,259)**. Au sein de la STEP, le sol semble être souillé par les effluents et pourrait servir de réservoir pour les résistances retrouvées en clinique. La survie de ces germes dans cette matrice peut cependant dépendre de nombreux facteurs dont la température des sols, la dessiccation et les radiations UV qui sont importantes dans cette région du monde **(56)**. Enfin, la persistance environnementale reste intimement liée à la pression de sélection. Nous n'avons pas investigué la pollution environnementale par les composés tels que les résidus antibiotiques ou les métaux lourds à l'origine de cette pression (exposome). Il serait intéressant de mesurer ces paramètres dans les eaux usées, au niveau de la zone de relargage et notamment les sédiments, mais aussi dans les sols de la station et son

périmètre proche, afin d'identifier les composés pouvant influencer la persistance de germes résistants **(254)**.

G) Virulence d'E. coli et hypervirulence chez K. pneumoniae complex : une future problématique au sein des STEP ?

L'objectif premier de ce travail de thèse n'était pas d'apprécier la composition en gènes de virulence des germes séquencés. Cependant, au vu du partage de lignées BLSE entre la faune sauvage et les eaux usées, il nous a semblé intéressant de regarder la virulence des souches environnementales. Concernant *E. coli*, les principaux ExPEC présents chez l'homme n'ont pas été retrouvés chez les animaux en dépit d'une diffusion dans les eaux usées (*i.e.* ST131, ST1193) **(4)**. De plus, les germes multirésistants portés par les animaux présentaient moins de gènes de virulence, et cette variation serait directement en lien avec l'absence du phylogroupe B2 dans ce compartiment **(30)**. Les souches les plus virulentes sont le plus souvent non productrices de BLSE. Ainsi, des lignées sensibles mais virulentes pourraient circuler entres les eaux et les animaux mais n'ont pas été mises en évidence dans notre étude. Ce biais sélectif a été mentionné pour le ST131 au Canada dans des échantillons d'eaux usées **(49)**. Le même constat a aussi été fait au Mexique sur une importante collection d'animaux sauvages, et en Allemagne sur des rats prélevés en ville, pour lesquels le phylogroupe B2 avait été identifié chez plusieurs individus mais ces souches étaient majoritairement non-BLSE **(430,441)**. Un projet de thèse initié en 2021 par Madame Degrâce BATANTOU à l'Institut Pasteur de la Guadeloupe aura notamment pour objectif de mieux caractériser cette population d'*E. coli* sensible.

En ce qui concerne KP1, le screening des virulences les plus couramment retrouvées a permis de mettre en évidence la présence de gènes codant pour la yersiniabactine dans 28 isolats associés aux ST11, ST14, ST17, ST29, ST35, ST152 et ST441 (score de virulence 1/5) **(94)**. La présence de cet îlot de pathogénicité n'est pas rare chez Kp1 et notamment pour les ST11 et ST152. Il est associé à des infections invasives **(105,110)**. En accord avec les données de la littérature le variant ICE*Kp4* était clairement prédominant **(105)**. Une récente étude sur le portage de ce complexe au sein de la communauté menée au Sénégal, au Cambodge et à Madagascar a souligné la présence de cette virulence dans 12,5% des isolats **(90)**. Ces germes présents sur le continuum des eaux usées et chez les animaux sauvages, notamment chez les oiseaux (3/6) seraient donc plus à risque de déclencher une infection **(96)**. Aucune souche caractérisée comme « hypervirulente » n'a été identifiée dans ce set de données en se fiant aux biomarqueurs spécifiques, bien que ce phénotype ait été mis en évidence au niveau communautaire en Guadeloupe **(94,107)**. Les souches isolées étaient par ailleurs toutes caractérisées comme non productrices de BLSE, ce qui a aussi pu entrainer un biais de sélection **(107,119)**. En effet, sauf quelques exceptions les populations hypermucoïdes et hypervirulentes présentent peu de résistances aux antibiotiques même si l'évolution actuelle des résistances de ce type de germe fait craindre un haut risque à l'avenir **(90,96,116)**.

Ce projet restait centré sur les souches résistantes aux β-lactamines et la caractérisation des souches de *K. pneumoniae* hypervirulentes et multirésistantes reste actuellement disparate et peu documentée **(91)**. En Guadeloupe, une approche One-Health pour ce germe est

actuellement en cours **(405)**. Elle fait l'objet des travaux de thèse de Madame Gaëlle GRUEL, et a pour objectif principal de décrire cette hypervirulence et d'identifier les principaux réservoirs de *Klebsiella*, et l'origine de ce caractère. Des germes non-BLSE ont aussi été conservés dans les différents prélèvements de l'étude ECHANGENE (n=110), que ce soit au sein des eaux usées avec une prévalence de 53,8% d'échantillons positifs, mais aussi chez les animaux sauvages et domestiques (73,5% et 50,0% respectivement). Parmi eux, nous avons pu identifier des souches mucoïdes en culture qui seront analysées plus finement, afin de déterminer si à l'instar d'une diffusion de clones hautement résistants, le continuum des eaux usées peut aussi être pourvoyeur de bactéries hypervirulentes dans l'environnement comme récemment souligné au Brésil **(107,204,442)**. Cette indication pourrait avoir un intérêt sanitaire en amont puisqu'il a par exemple été souligné un portage intestinal et donc une excrétion de certains clones de *Klebsiella* très proches de souches à l'origine d'abcès hépatiques dans la population générale en Corée **(15,108,340)**.

IV. Une diffusion secondaire chez les animaux domestiques.

A) Des similarités dans le voisinage des zones de traitement des eaux usées

Dans ce projet de thèse nous avons eu l'opportunité de prélever 32 animaux domestiques évoluant autour de la STEP lors de différentes campagnes (n=4). Rappelons que ces animaux n'avaient pas reçu de traitement antibiotique lors de l'étude. Parmi ces derniers, 71,9% présentaient au moins un des germes BLSE recherchés avec une prédominance de souches d'*E. coli* (n=15 isolats). Il n'existe pas actuellement de données semblables dans la littérature pour permettre une comparaison (STEP / animaux domestiques). Par ailleurs, nous avons constaté des différences entre les animaux prélevés, avec une présence d'*Enterobacter* chez une majorité de poules alors que *E. coli* était majoritaire chez les cochons. De plus, même si le genre *Klebsiella* était très présent au sein de l'hôpital et dans la faune sauvage, une seule souche a été retrouvée dans la population d'animaux domestiques. Ceci souligne l'intérêt de considérer plusieurs animaux et espèces bactériennes indicatrices afin d'être le plus représentatif possible lorsque des approches par culture sont mises en œuvre.

Les travaux de l'Institut Pasteur portant sur le portage d'entérobactéries multirésistantes dans les élevages de Guadeloupe en parallèle nous ont permis de souligner une spécificité chez les animaux de rente vivant près de la STEP en comparaison avec le reste du territoire. En effet, comme décrit dans la **Partie I** focalisée sur *Enterobacter*, aucune souche BLSE de ce genre n'a été isolée entre 2017 et 2018 chez des vaches et des cochons (n=62 animaux) **(408)**. À l'inverse, des souches d'*E. coli* BLSE ont été retrouvées au sein des filières porcines, avicoles et bovines guadeloupéennes. Sur les 62 fermes analysées entre 2018 et 2019, 11 présentaient des échantillons avec *E. coli* BLSE (17,7%). Ce qui correspondait à 26 prélèvements sur les 216 (12,0%), avec préférentiellement un gène de type $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (68,8%) **(365)**. Bien que le nombre d'animaux d'élevages de la même espèce prélevés dans le projet ECHANGENE soit plus modeste (n=24 après suppression des chiens et des oies), et que ces animaux vivent seulement sur deux sites distincts (les vaches étant en piquet en dehors de la propriété), la prévalence

d'échantillons positifs à *E. coli* BLSE était significativement supérieure avec 11 animaux (45,8% ; p=1.6×10^{-4}). À l'exception de deux souches (*bla*$_{\text{CTX-M-65}}$), la majorité des isolats d'*E. coli* séquencés pour cette sélection d'animaux avaient un gène *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ (6/8). Cette présence de gènes d'intérêt clinique était due à la circulation de deux clones d'*E. coli*. Même si aucun autre élevage, informel ou non, n'était présent dans le secteur pour confirmer ces observations, ces premiers résultats révèlent une possible influence de la STEP chez les animaux domestiques, comme souligné pour la faune sauvage dans la précédente partie (**Tableau 24**) **(43)**.

B) Séquençage complet de souches animales : un partage de clones entre la faune sauvage et les animaux domestiques

1. *Enterobacter* ST114 : l'exemple type d'un possible clone multirésistant à haut risque.

Lors de nos travaux, nous avons pu mettre en évidence un partage de souches associées à la sous-espèce *E. hormaechei subsp. xiangfangensis* entre un merle prélevé au sein de la STEP et une poule dans le voisinage (ST114 ; GENC318/341 : 14 SNP). Ces merles gravitaient aussi dans les arbres autour des animaux domestiques. Une souche du ST114 d'origine humaine et une souche prélevée chez une oie étaient également relativement proches (GENC005/253 ; 81 SNP) **(385)**. Ce ST n'a pas été identifié chez d'autres animaux en Guadeloupe en dehors de la STEP (*i.e.* **Partie I** ; n=230 individus), et aucune valeur de SNP aussi faible n'a été mise en évidence pour d'autres souches de cette sous-espèce entre les compartiments homme et animaux **(408)**. Dans la littérature, ce ST reste pour le moment moins représenté dans les infections ou en portage chez les animaux domestiques que chez l'homme **(79,82,83,408)**. Par ailleurs, les études sur ce genre sont beaucoup moins importantes que pour les deux autres entérobactéries comme le souligne le petit nombre de profils MLST (1 600 ; https://pubmlst.org). Sa diffusion pourrait donc être globalement sous-estimée.

Cette première observation nous a permis d'illustrer une circulation de souches cliniques vers les animaux domestiques *via* les eaux usées et la faune sauvage **(385)**. Ceci pourrait être évocateur d'une implantation en Guadeloupe d'un clone multirésistant d'*Enterobacter* à haut risque **(79)**. Cette classification nécessite au préalable le respect de différents critères selon la définition de l'équipe de Pitout, J.D.D. **(37,40,428)**. La bactérie doit tout d'abord présenter une distribution mondiale et des phénotypes multirésistants aux antibiotiques. Elle doit aussi être capable de se transmettre efficacement entre les hôtes et de persister pendant une longue période après colonisation. Ce pathogène doit enfin être à l'origine d'infections graves ou récurrentes. À noter que cette définition est plus complète que celle de Brisse *et al.* pour KPNC qui est fondée sur sur la fréquence de publications et le nombre de génomes associés à une lignée **(90)**. Les données ECHANGENE et le reste de la littérature suggèrent qu'ECC ST114 pourrait entrer dans cette définition comme c'est le cas pour le ST131 chez *E. coli* ou le ST307 pour *K. pneumoniae* **(37,79,82,84,191,198,385,428)**. Sa circulation locale avec de nombreux gènes de résistance au sein de différents compartiments peut donc devenir problématique.

2. L'implantation des *E. coli* productrices de BLSE

Pour étayer cette hypothèse d'une diffusion de germes BLSE autour de la STEP, nous nous sommes ensuite focalisés sur l'espèce majoritaire : *E. coli*. Tout d'abord, les données de séquençage pour ce compartiment nous ont permis de confirmer qu'une circulation de souches est possible entre animaux sauvages et domestiques. Cependant, l'éloignement avec la station a bien une incidence sur la diversité des lignées retrouvées. En effet, au moins 11 antibiotypes différents ont été identifiés chez les souches d'*E. coli* de la faune sauvage contre 2 au sein de la ferme. De même, seuls deux ST ont été retrouvés chez les animaux domestiques (ST6745 et ST2179), en comparaison des 19 de la faune sauvage. Ces ST appartiennent aux phylogroupes B1 et E. De nouveau, le phylogroupe B2 multirésistant était absent de ce compartiment **(31)**. Comme le ST114 pour *Enterobacter*, l'exemple du clone ST6745 a permis de souligner une introduction *via* la faune sauvage (merle) qui gravite entre le site de la station et les enclos. Il a ensuite diffusé et s'est maintenu entre les différents congénères et espèces domestiques présentes (chien, cochon, oie, poule) **(385)**. Son origine reste très probablement les eaux usées. En effet, même si aucune souche de la sélection n'a été retrouvée dans ce compartiment, ce ST et son plasmide de résistance ont initialement été retrouvés fin novembre 2018 dans les fèces d'un crapaud. Le microbiote de ces batraciens est le reflet des souches circulantes dans les eaux usées et stagnantes de la STEP dans la mesure où ils évoluent dès leur naissance dans cet environnement (**Annexe 5**).

Une analyse génomique approfondie des échantillons d'élevages guadeloupéens est actuellement en cours afin de mieux caractériser les plasmides et les lignées résistantes associées. Les premiers résultats ont mis en évidence que parmi les souches d'*E. coli* BLSE isolées des chevaux (ST10, ST155, ST1250, ST4164 et ST6981) et des animaux de fermes (**Annexe 2** : ST48, ST101, ST115, ST154, ST1630, ST2015 et ST3704), aucun ST n'avait été retrouvé chez l'homme sur le territoire **(185)**. À l'exception des ST2015 et ST3704, tous ces ST appartiennent aux phylogroupe A, B1 et D. En effet, ces deux derniers ST sont les premiers sur le territoire guadeloupéen à être associés au phylogroupe B2 chez des animaux (**Annexe 2**). Seuls les ST101 (phylogroupe B1) et ST10 (A) étaient communs avec les souches du projet, cependant ces souches n'ont pas été isolées chez des animaux domestiques, suggérant de nouveau une dichotomie entre ce petit élevage informel à proximité de la STEP et les élevages guadeloupéens en terme de diversité pour l'espèce *E. coli*.

C) Des spécificités au sein de l'élevage informel

Un autre clone d'*E. coli* appartenant au ST2179 a été retrouvé chez les animaux domestiques en décembre 2018. Ce ST du phylogroupe B1 reste très peu décrit dans la littérature, avec seulement 72 souches sur la base de données EnteroBase (04/03/2021 ; https://enterobase.warwick.ac.uk/), issues de prélèvements environnementaux et d'animaux. Le phénotype associé pour le ST2179 était sensible à la ceftazidime et à la gentamicine. Dans notre collection, le gène $bla_{\text{CTX-M-65}}$ était spécifique de cette lignée. Ce gène reste pour le moment très rare en Europe mais est endémique en Asie et en Amérique du Sud **(431)**. Le ST2179 n'était plus retrouvé par la suite sur les 15 autres isolats d'animaux domestiques, ce qui laisse supposer que son introduction était plus ancienne et qu'il a ensuite été remplacé par le ST6745 de

décembre 2018 jusqu'à la fin des prélèvements en mars 2019. Un article datant de juillet 2021 a présenté une émergence de cette lignée au Portugal. En effet, celle-ci a été identifiée dans des échantillons de viande de porc et de bœuf avec notamment les gènes *bla*$_{\text{CTX-M-65}}$ et *mcr-1* **(431)**. Les auteurs ont prédit une localisation chromosomique du gène codant pour la CTX-M en utilisant une autre approche que celle proposée dans notre manuscrit (PLACNETw : https://castillo.dicom.unican.es/upload/). Dans notre set de données, parmi les 3 souches, nous avons pu clairement prédire une localisation chromosomique du gène *bla*$_{\text{CTX-M-65}}$ pour un isolat.

En ce qui concerne les autres résistances, toutes les souches d'*E. coli* ST2179 et ST6745 isolées chez les animaux domestiques et sauvages présentaient un gène *floR*. Ce gène était spécifique de ces deux ST à l'exception d'une dernière souche retrouvée dans les eaux usées en sortie de la STEP (GESC268 – ST69) **(439)**. Ce dernier apporte une résistance au florfénicol par un mécanisme d'efflux et n'a pas été retrouvé chez ECC ni chez KPNC dans notre collection. Cet antibiotique est un analogue du chloramphénicol utilisé en médecine vétérinaire **(6,126)**. Le gène n'a pas été retrouvé dans les premiers isolats de fermes analysés en **Annexe 2**, et seule une souche d'*E. coli* provenant d'un iguane présentait cette résistance auparavant **(43)**. De nouvelles campagnes d'échantillonages menées par l'Institut Pasteur de la Guadeloupe ont permis de l'identifier dans un élevage porcin chez *E. coli* (S. Ferdinand, communication personnelle, 2021). Il a précédemment été mis en évidence au sein d'isolats d'oiseaux sauvages évoluant autour de STEP ou des aigrettes au Nigéria **(311,314)**. Cette résistance a aussi largement diffusé dans une collection plasmidique provenant de souches d'*E. coli* isolées chez l'homme (communauté / infection) dans des viandes de porc, de poulet et du poisson au Cambodge, suggérant une contamination des animaux vers l'homme **(6,7)**. Le gène *floR* était bien sur le chromosome des 4 souches ST6745 obtenues par long-reads suggérant de nouveau que cette lignée est particulièrement adaptée aux animaux. Par ailleurs, parmi les 8 souches de ce ST retrouvées sur EnteroBase, 5 présentaient aussi cette résistance (62,5%). La prédiction pour les *E. coli* des ST69 et ST2179 a indiqué une présence sur une structure plasmidique (3/4 logiciels). Ce gène a aussi été retrouvé dans les précédents isolats ST2179 issus d'échantillons de viande au Portugal **(431)**. Les eaux usées semblent aussi disséminer des gènes de résistance plus spécifiques du compartiment animal **(15)**. En partenariat avec les cliniques vétérinaires de l'archipel, une investigation est actuellement en cours pour connaître la prévalence de portage de souches BLSE chez les animaux de compagnie. Il est donc possible que certaines des cliniques vétérinaires de la région Pointoise soient reliées à la STEP de Jarry et puissent diffuser ce type de germe et / ou de résistance (eaux grises de nettoyage…). Le seul abattoir de la Guadeloupe est localisé au Moule et totalement indépendant de ce réseau d'épuration.

Les animaux de fermes et domestiques peuvent présenter des KPNC BLSE **(92,93)**. Dans notre étude, une seule souche a été retrouvée chez une oie fin 2018 et correspondait au ST405. Comme le ST2179, cette lignée n'aurait pas persisté contrairement à *E. coli* ST6745 ou *Enterobacter* ST114. La présence du gène (*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$) et le ST restent en adéquation avec une origine humaine. Ce ST est en effet souvent isolé au niveau nosocomial dans les territoires caribéens, et est considéré comme une lignée multirésistante à haut risque **(90,110)**. En Europe le ST405 est couramment associé à des infections multirésistantes chez l'homme (carbapénémase de type OXA) **(94)**. L'identification de cette lignée chez les animaux ou dans

l'eau reste très rare. Elle a par exemple été retrouvée en Autriche dans une rivière et chez des poissons pêchés sur les côtes de la mer méditerranée suggérant une possible contamination par les effluents urbains **(94,182)**. Le risque de diffusion de *Klebsiella* vers la ferme par les oiseaux reste possible. En effet, parmi les merles prélevés, 6 présentaient une souche de KPNC BLSE (54,5%), dont certaines ont aussi été retrouvées en amont chez l'homme et dans les effluents avec une forte similarité génomique (ST11, ST17). Ces ST restent pour le moment très rares chez les animaux domestiques mais sont à surveiller **(94)**. L'un des cas les plus évocateurs d'une possible dispersion est celui d'un centre vétérinaire en Suisse où des prélèvements environnementaux de cet établissement étaient liés à des souches ST11 ayant infecté différents animaux de compagnie (chats, chiens) entre 2018 et 2019 **(93)**.

V. Un plasmide de résistance épidémique adapté à l'environnement

L'un des autres points les plus importants soulignés lors de ce projet de thèse est la présence d'une même structure plasmidique au sein de différents compartiments qui a été confirmée par une approche de séquençage et des assemblages hybrides. Nous nous sommes notamment focalisés sur le plasmide IncHI2/ST1/*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ majoritaire dans la collection d'ECC, que ce soit au sein des membres du complexe mais aussi dans différents compartiments **(385)**. Cette diffusion va à l'encontre des travaux de Ludden *et al.* menés sur le partage de plasmides de résistance entre homme et animaux de rente au Royaume-Uni. En effet, leurs résultats centrés sur *E. coli* indiquaient que les éléments génétiques mobiles entre ces deux compartiments étaient distincts dans la majorité des cas (95%) **(31)**. Le postulat est par ailleurs inversé ici puisque ce sont les animaux qui portent des souches et des plasmides d'origine humaine et non l'homme qui est « contaminé » par les animaux.

D'après sa structure, l'origine du plasmide IncHI2 est clairement humaine (pMLST, résistances) **(61,278)**. À l'hôpital, cet élément génétique mobile n'a été retrouvé que dans des souches d'*Enterobacter*. Il aurait ensuite circulé entre différentes lignées et espèces hôtes au sein de l'environnement. Selon nos résultats, la matrice aquatique serait le principal véhicule de cette structure plasmidique entre les genres bactériens analysés. Ce constat s'appuie notamment sur les températures de conjugaisons efficaces qui sont inférieures à 30°C pour ce groupe d'incompatibilité **(81,238,439)**. Le partage intra-espèces de ce plasmide aurait par la suite conduit à la circulation et au succès d'un clone multirésistant chez les animaux sauvages et domestiques pour l'espèce *E. coli* (*i.e.* ST6745) **(385)**. Diverses modifications structurales sont à l'origine de plusieurs lignées de plasmides au sein de ce groupe d'incompatibilité **(243)**. L'arbre phylogénétique et les comparaisons que nous avons réalisé nous ont permis de conclure que les plasmides retrouvés chez *E. coli* et ECC dans notre set de données restaient phylogénétiquement très proches. Des analyses par conjugaison avec le protocole adopté par Dang B. *et al.* pourraient être développées *via* la matrice des eaux usées pour apprécier ces échanges plasmidiques *in vivo* (*i.e.* capture d'éléments conjugatifs par *E. coli gfp+*) **(184)**.

La présence d'un réplicon IncHI2 au sein d'une souche non BLSE environnementale isolée d'un concombre a également été mise en évidence en mars 2018 (ECC337). La lignée associée a aussi déjà été retrouvée dans des infections chez l'homme en Guadeloupe et dans d'autres régions du monde (ST98) **(79,408)**. Aucune résistance aux antibiotiques n'a été retrouvée à l'exception de la céphalosporinase chromosomique, et contrairement aux autres souches avec un plasmide IncHI2 celle-ci n'avait pas non plus de gène *intI*1. Par ailleurs, en utilisant la même approche de prédiction des contigs nous avons pu mettre en évidence que les gènes de résistance au tellurite, mercure, arsenic et cuivre étaient portés sur un contig plasmidique **(277)**. C'était aussi le cas pour les gènes du système toxine/antitoxine, un opéron lactose, le sidérophore Fe^{3+} et un système de détoxification du formaldéhyde retrouvés chez le plasmide pGENC414. Par ailleurs, une première approche par reconstruction hypothétique avec le plasmide pGENC200 a permis d'obtenir une structure avec seulement 76,6% d'identité nucléotidique. Ces observations semblent indiquer la présence d'un élément génétique mobile « ancestral » ou ayant perdu les insertions de gènes de résistance pour limiter le coût énergétique. Ces observations seraient à confirmer par du séquençage « long-reads ».

Ce groupe d'incompatibilité était peu décrit et séquencé sur le continent américain comme l'a révélé une précédente revue de la littérature **(238)**. Il est aujourd'hui bien présent au niveau mondial notamment chez *Enterobacter* **(61,64,86,191,273)**. En Chine par exemple, le réplicon IncHI2 fait partie des structures plasmidiques les plus retrouvées au niveau d'infections communautaires à ECC BLSE **(61)**. Par ailleurs, nos résultats concernant cette relation entre plasmide IncHI2, entérobactéries BLSE et environnement ont aussi été soulignés en Espagne ou encore au Brésil (eaux usées/rivières/ruisseaux urbains) **(418,439)**. Dans un récent article portant sur des animaux sauvages dans un centre vétérinaire en France, la présence d'un plasmide IncHI2/ST1 avec un même pattern de gènes a aussi été soulignée parmi des souches d'ECC et d'*E. coli* (*bla*$_{\text{CTX-M-9}}$/*bla*$_{\text{SHV-12}}$/*mcr-9*) **(85)**. De même, au Rwanda, une structure IncHI2 a été retrouvée chez différents lignées d'*E. coli* isolées de patients et chez une mouche capturée dans l'enceinte d'un hôpital **(46)**. Avec ce schéma de diffusion globale et inter-espèces, ce plasmide de résistance pourrait être considéré comme « épidémique » comme la lignée ECC ST114. Une étude menée en Australie est arrivée aux mêmes conclusions pour un plasmide IncHI2/ST1 porteur d'un large pattern de gènes de résistance chez des souches d'*E. coli* (ST216). Ces bactéries ont été isolées chez des goélands dans différentes localités et le plasmide présentait notamment une résistance aux carbapénèmes (*bla*$_{\text{IMP-4}}$). Par une analyse comparative les auteurs ont aussi retrouvé la même structure plasmidique dans des souches de *Citrobacter*, d'ECC et de *Salmonella* isolées au sein des compartiments homme et animaux domestiques sur le même continent (identité nucléotidique > 99% ; couverture > 91%) **(206)**.

La stabilité de ce type de plasmide a aussi été précédemment analysée. En raison de sa grande taille il serait logique de penser qu'il engendre un coup biologique non négligeable pour la cellule hôte. Cependant selon des travaux menés en laboratoire sur des transconjugants d'*E. coli* présentant un plasmide IncHI2 avec un gène *mcr-1* (265,5 Kb), celui-ci était toujours retrouvé même après 14 jours de passage dans des milieux de cultures non sélectifs (880 et 220 générations selon le milieu). En plus de la présence de système toxine/antitoxine, le séquençage et l'analyse des chromosomes bactériens de cette étude ont mis en évidence la survenue de mutations spécifiques retrouvées exclusivement chez les porteurs du plasmide. Celles-ci

pourraient être associées à un phénomène de compensation et une forte stabilité de cet élément génétique **(281)**. Dans le cas de la Guadeloupe, la lignée *Enterobacter* ST114 qui nous a servi de « fil conducteur » a initialement été retrouvée en clinique. Il est donc fort probable que cet environnement sélectif ait permis le développement de stratégies semblables pour diminuer le coût biologique de ce plasmide. Dans le cas d'*E. coli* ST6745, la coévolution plasmide / hôte a probablement eu lieu dans les eaux usées. Ces stratégies pourraient donc faciliter par la suite l'expansion de germes avec des résistances stables jusqu'aux animaux domestiques non soumis à un traitement antibiotique. Par ailleurs, étant donné sa température de conjugaison inférieure à 30°C, le maintien de ce plasmide de résistance au sein du microbiote dépend de la capacité de la bactérie porteuse à rester compétitive et à s'implanter **(81,238,439)**. Ce schéma de diffusion est à l'opposé des plasmides de type IncI qui peuvent plus facilement diffuser *in vivo* au sein de la population résidente par exemple **(220)**. Des travaux plus poussés permettraient de mieux comprendre l'association IncHI2/ST1 avec les différents genres bactériens du projet et de mieux anticiper cette large diffusion qui pourrait être pérenne.

Par ailleurs, selon l'outil d'analyse des PTU (*i.e.* COPLA), nous avons pu mettre en évidence que toutes les structures plasmidiques IncHI2/ST1 circularisées présentaient exactement le même PTU (PTU-HI2 ; score=0,9118). Celui-ci correspond bien à un haut grade de diffusion (IV). Ce grade est particulier car il indique que ces éléments génétiques mobiles peuvent être partagés au sein d'un même ordre, entre différentes espèces des familles *Enterobacteriaceae, Yersiniaceae*, *Erwiniaceae* et *Morganellaceae*. Selon les auteurs de l'étude évolutive associée, la majeure partie des plasmides conjugatifs et mobilisables rencontrés chez les entérobactéries présentent un grade inférieur de diffusion (*i.e.* III : limité aux membres de la famille) **(265,272)**. En effet, les plasmides de résistance de type IncF ou encore IncI sont connus pour présenter un panel d'hôtes bien plus étroit **(238)**. De plus au sein d'une même espèce, il a été démontré que des plasmides IncF avec différents schémas FAB pouvaient avoir une efficacité de conjugaison très variable avec des « préférences de lignées » (de 10^{-4} à $< 10^{-9}$) **(241)**. Nos observations de typage plasmidique ont aussi suggéré ces résultats puisque de rares souches d'*E. coli* présentaient un réplicon de type $IncFII_K$ (n=8) dont 7 [K7:A-:B-] et 1 [K7:A21:B-] pour un ST38. Ces derniers restent généralement spécifiques du genre *Klebsiella* **(274)**. Un projet de screening des plasmides IncF porteurs de gènes de résistance ou non, dans différents compartiment (eaux usées, animaux de rente), a mis en évidence par de l'assemblage hybride et du clustering (n=726 plasmides), que ces éléments génétiques mobiles étaient pour une grande majorité des cas distincts. De plus, parmi les 3 entérobactéries de ce projet, les auteurs ont aussi souligné une adaptation des structures plasmidiques par genre en accord avec l'approche par PTU (**Figure 83**) **(265,443)**. L'approche utilisée dans cette étude anglaise pour mesurer la similarité des séquences plasmidique était fondée sur Mash distance. Cette autre façon de procéder prend en compte le partage des *k-mer* entre les plasmides. L'indice de similarité est compris entre 0 et 1 ; plus cette distance est faible plus les séquences seront proches. Des analyses de ce type n'ont pas été réalisées pour des collections du groupe d'incompatibilité IncH pour le moment. À titre indicatif, en appliquant une approche similaire à cette première étude (longueur de *k-mer* de 13, taille d'esquisse de 5 000), les données de similarité Mash distance pour le set IncHI2/ST1/$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ étaient comprises entre $6{,}16\times10^{-5}$ et $9{,}41\times10^{-3}$. Ceci confirme la forte similarité entre ces éléments

puisque puisqu'il est considéré qu'un indice de distance ≤ 0,05 équivaut à une valeur ANI ≥ 95% **(401,443)**. Enfin, le plasmide hybride retrouvé chez KPNC dans les eaux usées (pGKP160), et le plasmide reconstruit d'*Enterobacter* issu de l'environnement et sans les résistances (pECC337) présentaient une moyenne de Mash distance plus importante contre le reste de la collection IncHI2 (0,02 et 0,01).

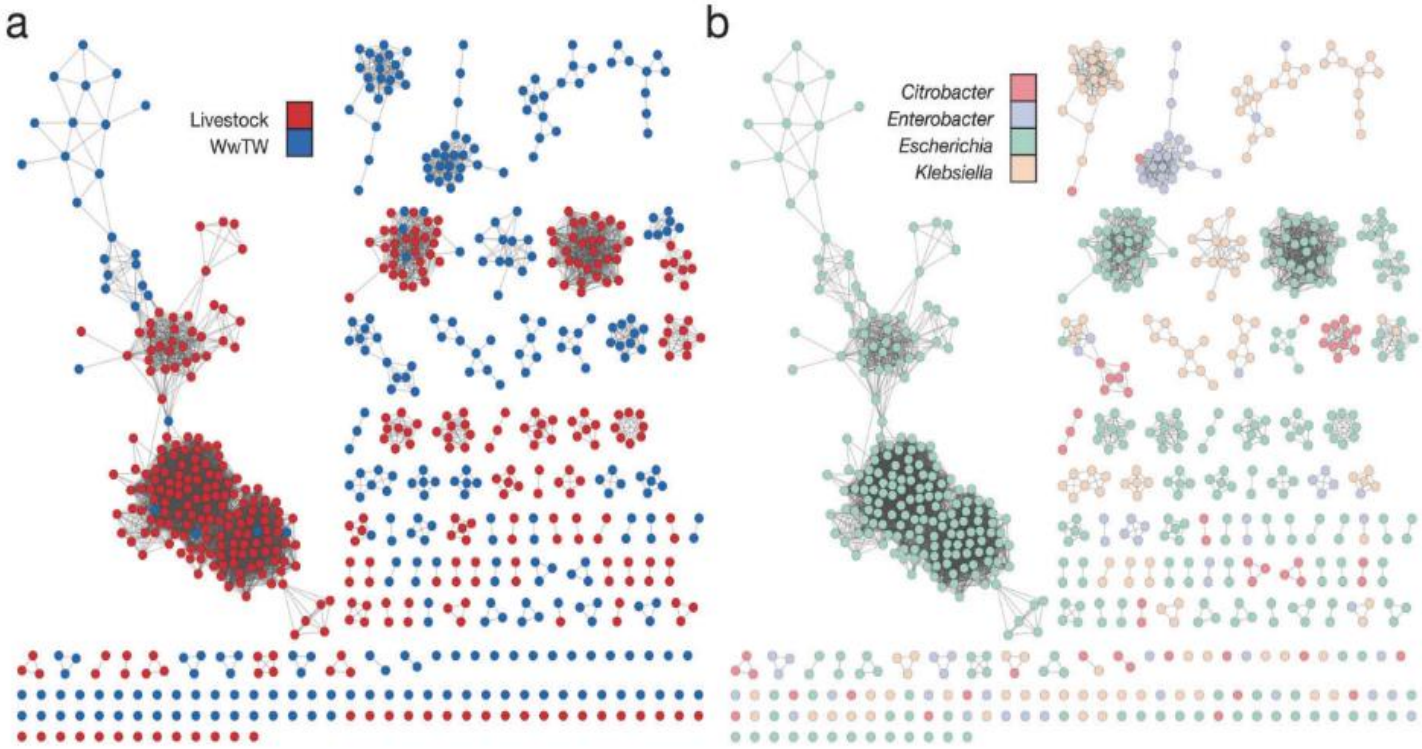


Figure 83. Réseaux de plasmides de type IncF isolés au Royaume-Uni (443). Les réseaux ont été construits par une comparaison Mash distance de séquence plasmidiques complètes ; chaque cercle correspond à une séquence plasmidique ; les couleurs en **a)** permettent de distinguer les 2 compartiments analysés et en **b)** les 4 genres bactériens isolés ; WwTW : influents et effluents urbains + milieu aquatique récepteur.

Au vu de ces résultats de circulation, une surveillance du plasmide IncHI2/ST1/ *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ pourrait être développée sur le territoire (objectif n°2 OMS) **(129)**. En bactériologie, les analyses restent principalement fondées sur une approche cultivable. Des outils permettant de screener des échantillons bruts ou de distinguer des isolats cliniques ou non-cliniques présentant ce type de plasmides épidémiques, sans pour autant passer par du séquençage complet, seraient intéressants à développer. Comme d'autres groupes d'incompatibilité, la structure initiale de cet élément génétique mobile a acquis au fur et à mesure des gènes de résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques par différents évènements d'insertion et de recombinaison **(277)**. Les résistances aux métaux lourds (mercure, tellurite) étaient peu présentes dans une collection de souches datant de l'ère pré-antibiotique **(264)**. Nous avons remarqué que le plasmide IncHI2 local présentait un opéron de résistance au tellurite : *terZABCDEF*. Cet opéron a déjà été retrouvé sur d'autres plasmides IncHI2 dans des épidémies hospitalières à *Enterobacter* **(64,81)**. La résistance à ce composé a précédement été exploitée dans la création d'un milieu chromogénique CHROMagar STEC medium (CHROMagar

Microbiology, Paris, France) pour faciliter l'identification de ce pathovar d'*E. coli* avec une spécificité de 98,9% **(444)**. Ces pathogènes présentent généralement cet opéron au niveau chromosomique **(19)**. Chez KPNC, la résistance au tellurite a aussi été exploitée pour mettre en évidence les groupes clonaux hypervirulents qui possèdent cet opéron sur un plasmide (GC23, GC65, et GC86) **(445)**. Par ailleurs, une récente étude a souligné que cet opéron n'était pas totalement spécifique de ces lignées chez *Klebsiella* **(285)**. La recherche de souches porteuse de ces éléments génétiques mobiles pourraient être envisagée avec un milieu de culture couplant tellurite et antibiotiques. Après une étude génomique, ce type d'approche pourrait être adapté à d'autres plasmides épidémiques selon les gènes accessoires spécifiques qu'ils apportent (métabolisme, résistance). D'après l'analyse *in-silico* résumée dans le **Tableau 25**, la mise en évidence de cette résistance dans les isolats pourrait avoir une sensibilité de 98,8% pour la recherche d'une structure IncHI2 (spécificité : 97,3%). Cette analyse doit être confirmée par de la culture et n'a été réalisée que sur un gène car différentes structures de l'opéron existent. Cette approche de culture aurait aussi l'avantage de pouvoir mettre en évidence des structures IncHI2 dans des échantillons plus complexes et pourrait faciliter la mesure de la fraction microbienne « permissive » lors d'épreuve de conjugaison. De plus, dans des échantillons environnementaux ceci permettrait aussi de mettre en évidence ce type de plasmide sans une sélection antibiotique puisque la souche environnementale C3G-S ECC337 faisait partie des isolats *terD* +.

Enfin, un projet focalisé sur KPNC a souligné chez le modèle murin que l'opéron *ter* pouvait apporter un avantage compétitif dans la colonisation intestinale lorsque ce dernier est enrichi en acide gras à chaîne courte. Ces acides gras sont produits par certaines lignées du microbiote et sont impliqués dans différentes voies de protection de l'intégrité de cette population **(285)**. L'opéron *ter* ne serait donc pas uniquement associé à la résistance au tellurite, et si cet avantage dans la colonisation intestinale est adaptable à ECC ou *E. coli* chez d'autres hôtes, ceci pourrait expliquer le nombre important d'animaux domestiques présentant les lignée ST114 ou ST6745 IncHI2/ST1/*terD* +. Cette information pourrait aussi servir au clinicien pour la prise en charge des patients puisque 62,1% (36/58) des isolats BLSE d'ECC à l'origine d'une infection nosocomiale présentaient un plasmide IncHI2/ST1/*terD* +, y compris les lignées pathogènes prédominantes : ST114 et ST1503.

Tableau 25. Présence d'un gène de l'opéron *terZABCDEF* dans les isolats guadeloupéens. La recherche de type BLASTn a été réalisée sur l'ensemble des souches séquencées entre les **Parties I et II** du projet de thèse. Les isolats ont été considérés *terD* + avec une couverture de 100% du gène et un pourcentage d'identité > 97% ; * parmi les isolats *terD* + seulement 4 avaient un pourcentage d'identité égale à 97% pour les autres il était égal à 100% ; ** 11 isolats présentaient un pourcentage d'identité du marqueur égal à 83%, pour les autres souches *terD* – il était égal à 0.

Marqueur tellurite-R *in-silico* (579pb)	**Nombre d'échantillons**	**Recherche du groupe d'incompatibilité**	
		IncHI2 +	**IncHI2 –**
	(N=376)	***(N=83)***	***(N=293)***
terD +	90	82	8*
terD –	286	1	285**

Dans les perspectives de ce projet, des études permettant de mieux caractériser l'ensemble des plasmides identifiés et d'apprécier leur potentiel conjugatif spécifique sont envisagées (projet TRAMID). En effet, nous avons pu répondre à la question initiale avec la diffusion d'un plasmide de résistance largement conservé de type IncHI2/ST1 dans les différents compartiments mais aussi au sein des différentes espèces du projet. Ces résultats ont aussi été comparés avec des éléments mobiles très proches et observés ailleurs dans le monde **(273)**. La question reste cependant en suspens pour la majorité des souches d'*E. coli* ou de KPNC porteuses de plasmides de type IncF avec une grande diversité et donc une faible synthénie entre eux **(227,443)**.

VI. Les eaux usées et les animaux, des « outils » incontournables dans la surveillance de l'antibiorésistance

A) Limitations et perspectives de l'utilisation des effluents dans le suivi local

Les effluents du CHUG représentaient qu'une très faible proportion du volume entrant à la station **(372,379)**. Même si l'impact des eaux usées hospitalières sur la résistance dans le reste des effluents est sujet à discussion selon les études, les eaux de ces établissements restent plus chargés en gènes de résistance **(258)**. Afin de mieux apprécier l'apport hospitalier (qualitatif / quantitatif), un prélèvement de 24h au sein du réseau de collecte, en amont de l'embranchement aurait été judicieux à mettre en place. De plus, nous nous sommes concentrés sur un seul établissement de santé. Cependant d'autres établissements sont aussi associés à cette communauté d'agglomération et pourraient également jouer un rôle dans la diffusion de ces germes résistants (Clinique des Eaux Claire, Polyclinique de la Guadeloupe).

La méthode de prélèvement et d'analyse des eaux usées était aussi discutable. Le choix a été porté sur une approche qualitative avec la présence ou non d'entérobactéries cibles résistantes. En raison de problèmes logistiques, nous n'avons pas effectué de prélèvement sur 24h qui aurait permis d'avoir des échantillons plus représentatifs, avec la prise en compte des fluctuations et d'avoir une estimation du débit. Dans la précédente étude menée par l'Institut Pasteur de la Guadeloupe, des variations importantes dans le dénombrement d'*E. coli* en sortie de station avaient été soulignées entre les prélèvements **(343)**. Les campagnes d'échantillonnage de ce nouveau projet (n=10) ont donc été étalées sur 17 mois afin de conforter les résultats et limiter au mieux l'impact de ces fluctuations. Par ailleurs, l'absence des germes BLSE ciblés dans certains échantillons, dont le point B (Poste de refoulement), pourrait être attribuée à ces variations en plus des dilutions successives **(16)**.

Nous n'avons pas mis en évidence le biomarqueur associé à une possible population spécifique et naturalisée d'*E. coli* dans les eaux usées (*uspC-IS30-flhD*) **(29)**. Comme l'avait évoqués T. J. Finn *et al.*, d'autres gènes spécifiques d'adaptation pourraient être liés aux eaux usées chez cette espèce **(49)**. Cela restait difficile à investiguer sur le petit set de données que nous avions par ailleurs limité aux antibiotypes similaires entre compartiments. Aucun cluster spécifique de souches des eaux usées n'a été mis en évidence dans l'arbre phylogénétique de

cette espèce, suggérant que nous avions bien isolé des souches humaines en circulation et non des souches naturalisées ou environnementales. En se focalisant sur les espèces les plus représentées en clinique nous avons pu retrouver des concordances avec les isolats des effluents par une approche phénotypique couplée à du séquençage complet (*i.e.* ST similaire, faible SNP, éléments génétiques mobiles et pattern de résistances proches) **(385)**. Les effluents sont donc potentiellement à inclure dans les systèmes de surveillance pour connaître les principales résistances et les pathogènes qui circulent localement chez l'homme **(31)**. Ceci nous a permis d'avoir une image des germes cirulant au niveau nosocomial, mais la fraction communautaire n'a pas pu être explorée. Or, celle-ci est aussi possiblement à l'origine de la diffusion de clones à haut-risque **(51,90)**. Une analyse épidémiologique plus complète avec des prélèvements au sein de la communauté pourraient permettre d'étayer cette conclusion et de retrouver certains ST non identifiés en clinique (ex : KPNC ST3512, *E. coli* ST34).

De plus, dans le cas de la Guadeloupe qui est pour le moment préservée au niveau de l'incidence de certaines résistance, cette surveillance pourrait mettre en évidence une future émergence de la production de carbapénémase chez les entérobactéries ou des résistances à d'autres antibiotiques de dernier recours comme évoqué précédemment **(15,39,42,281)**. Les travaux présentés ici et les études précédentes en Guadeloupe n'ont pas permis d'identifier des germes producteurs de carbapénémase dans cette matrice. Ces derniers n'ont d'ailleurs été détectés que de façon anecdotique en clinique **(28,111,194,343)**. Il est donc possible que ces bactéries soient présentes mais en quantité bien moindre. La recherche sur la portion cultivable et l'absence de milieu sélectif spécifique (+ imipénème, ertapénème) ont pu limiter la conclusion sur ce point. D'autres approches combinées comme de la métagénomique ou de la qPCR permettraient d'être plus exhaustif.

Enfin, comme le suggère une récente revue de la littérature, la majorité des études actuelles sur le sujet reste concentrée sur la fraction bactérienne, avec des échanges de gènes de résistance par conjugaison **(224)**. Ces structures plasmidiques ont en effet un rôle important dans la diffusion environnementale de résistances **(184)**. Cependant, une seconde fraction associée aux bactériophages, vésicules et ADN libre existe mais reste très peu étudiée. Cette fraction dont on ne connaît que très peu l'importance, et qui pourrait être mal évaluée selon les approches actuelles, nécessite plus d'attention dans la diffusion de la résistance au sein des eaux usées et dans l'environnement **(224,231,233)**. Enfin, l'environnement reste à l'origine de nombreuses structures et gènes de résistance qui ont par la suite diffusé en clinique. Cependant, la recherche de ces « précurseurs » ne peut pas être exhaustive avec seulement une approche en milieu sélectif **(251)**.

B) La faune sauvage : un autre indicateur de la résistance à mieux prendre en considération

Ce projet de thèse est l'un des premiers à analyser la diffusion d'entérobactéries multirésistantes dans l'environnement d'une STEP en utilisant comme indicateur le portage à un instant T chez autant d'espèces animales présentes aux alentours. En compilant les données précédentes menées sur la faune sauvage en Guadeloupe nous avons souligné que la présence de ces animaux au plus près des zones de traitement d'eaux usées les rend plus à même de

présenter des germes BLSE dans leurs fèces **(43)**. La diversité des espèces bactériennes isolées augmente aussi avec la proximité. Ces données sont en accord avec les précédentes conclusions faites sur une analyse globale des gènes de résistance portés par différentes populations d'oiseaux. De nombreuses résistances au sein de cette faune sauvage n'avaient été retrouvées que chez les animaux de STEP **(311)**. Cette observation n'était par ailleurs pas aussi évidente dans une étude centrée uniquement sur le portage de souches d'*E. coli* multirésistantes chez des ratons laveurs vivant dans des environnements ruraux, urbains et à proximité de plusieurs STEP aux Etats-Unis. En effet, même si la proximité avec les zones urbaines avaient une forte incidence sur le portage de souches multirésistantes, les auteurs ont souligné que la présence d'une STEP n'influençait pas sur la probabilité de retrouver ces germes. D'autres facteurs inhérents aux activités humaines dans les zones urbaines ont donc un impact sur le résistome de ces animaux. Les isolats issus d'animaux prélevés près des STEP présentaient cependant une plus grande richesse en termes de lignées d'*E. coli* **(313)**.

La présence de bactéries résistantes chez les animaux sauvages n'est probablement pas une surprise aujourd'hui dans un contexte urbain **(43,188,311,313)**. Cependant, les résultats les plus préoccupants de ce projet sont 1) l'isolement de lignées retrouvées en amont en clinique, et 2) l'identification de gènes de résistance associés aux infections humaines. L'origine anthropique d'une majorité de ces isolats ne fait que peu de doute. Nous sommes face à « un miroir » de la situation chez l'homme et/ou les animaux domestiques. Par ailleurs, les principaux germes retrouvés chez les patients pour l'espèce *E. coli* (ST131 et ST1193) semblaient circuler uniquement dans les eaux usées. L'utilisation des animaux comme sentinelle pour ce phylogroupe (B2) pourrait avoir biaisé les observations de diffusion si ce dernier reste plus « spécialisé » et retrouvé chez l'homme. En effet, avec les facteurs de virulence que présente ce phylogroupe, sa capacité de colonisation et de persistance chez l'homme est plus importante et stable que les autres lignées **(446)**. Ces observations interrogent aussi sur un possible biais dans les résultats d'autres travaux selon les bactéries indicatrices utilisées chez les animaux **(313)**. Par opposition au phylogroupe B2 d'*E. coli*, les lignées d'ECC et de KPNC identifiées dans ce projet le long du continuum des eaux usées et chez les animaux présentaient une plus faible diversité dans notre collection et semblaient plus « généralistes » (ex : ST114, ST307) **(74,78,91,385,428)**. Afin de suivre correctement les gènes de résistance, les lignées d'intérêt clinique et de mieux visualiser le risque d'exposition indirect pour l'homme, il semble donc que les entérobactéries du groupe « ESKAPE pathogens » pourraient être une bonne alternative à l'utilisation systématique d'*E. coli*.

Enfin, ce travail a été effectué dans une région française mais n'est probablement pas représentatif de l'ensemble des problématiques liées à l'assainissement et l'antibiorésistance dans le monde. Il serait intéressant de reproduire cette approche interconnectée entre les compartiments, et de rechercher une incidence terrestre des systèmes d'assainissement dans d'autres régions du globe, notamment dans des pays ayant accumulé des retards dans le traitement des eaux usées et où le risque de portage et d'excrétion de germes multirésistants par la population humaine est plus important **(167,213,335)**. Les sites avec une importante densité d'animaux sauvages ou péri-domestiques ayant un contact étroit avec l'homme et les STEP seraient à prioriser **(7)**. Les données collectées permettraient de bien cibler les points à risque

de diffusion et de mettre en place des actions locales. Certaines espèces caractérisées comme « envahissantes » ou largement répandues (*Larus* sp., *Periplaneta americana, Rattus* sp., *Rhinella marina*…) pourraient être utilisées comme sentinelles afin de faciliter les comparaisons **(10)**. Dans le cadre des rejets de STEP, la faune aquatique comme par exemple les bivalves qui restent des organismes filtrant et peuvent emmagasiner des germes de leur environnement peut également servir d'indicateur. Lors de la précédente étude guadeloupéenne, aucun bivalve n'avait été contrôlé positif à un germe BLSE, mais une récente prospection au Brésil a permis d'y mettre en évidence le clone ST131 de même qu'en Antarctique dans un environnement aquatique soumis à la pression anthropique **(255,343,352)**.

C) Perspectives de limitation de la diffusion environnementale des gènes de résistances aux antibiotiques

La Guadeloupe reste une région avec une consommation en antibiotique très faible en comparaison du reste de la France **(39)**. Il y aurait donc théoriquement moins de gènes de résistance dans les influents de STEP pour cette île **(214)**. Ceci pourrait compenser la gestion difficile et le manque de conformité actuel de ces ouvrages **(349)**. Un nouvel hôpital sera opérationnel pour 2023 dans la même agglomération que nous avons analysée **(447)**. La note d'orientation technique de l'OMS indique que « le traitement des eaux usées dans les établissements de santé peut ne pas être une activité essentielle lorsque les eaux usées sont acheminées vers une station de traitement secondaire ». Par ailleurs, « dans certains cas un prétraitement peut être requis ou souhaitable indépendamment des niveaux de traitement en aval » **(1)**. L'arrivée de ce complexe sur le territoire pourrait aussi être une occasion de mettre en place une politique de gestion et de suivi plus poussée des effluents, sujets à réserve par le passé **(380)**. En effet, il semble primordial suite aux observations faites pour le point de prélèvement A, le nombre de lits prévus dans ce nouveau projet (n=618), et les dysfonctionnements en aval, de mettre en place un traitement avant raccordement avec le réseau urbain afin de diminuer la charge de bactéries résistantes. Comme mentionné en introduction, il est admis que les effluents des hôpitaux contiennent de manière significative une plus grande proportion de gènes de résistance que les eaux usées urbaines. Ils restent très dilués par la suite **(257,258)**. Si l'on se concentre uniquement sur les enzymes CTX-M, il a été souligné que la diminution d'*E. col*i dans les effluents de STEP était clairement corrélée à une diminution de ces enzymes **(257)**. De ce fait, bloquer les entérobactéries productrices de BLSE et les lignées pathogènes dès la sortie de l'hôpital pourrait limiter les contaminations d'animaux par des lignées multirésistantes à haut-risque, et prévenir leur diffusion environnementale à l'image du modèle de Reason en gestion des risques.

Les STEP sont les principaux sites ouverts où les eaux usées et les déchets associés sont accessibles pour la faune sauvage. La présence d'animaux comme les oiseaux dans ces habitats artificiels serait à l'origine de la dissémination terrestre des souches multirésistantes **(385)**. Nous nous sommes focalisés dans ce projet sur une seule espèce d'oiseau couramment retrouvée en Guadeloupe (*Quiscalus lugubris*). Des hérons garde bœuf ont aussi été fréquemment observés au sein de la STEP mais étaient plus difficile à prélever. Ces animaux pourraient aussi présenter une voie de dissémination importante compte tenu des interactions

qu'ils peuvent avoir avec des animaux de rente comme les bovins **(314)**. Les îles des Caraïbes comptabilisent à elles seules environ 668 espèces d'oiseaux **(369)**. En Guadeloupe c'est plus de 250 espèces qui ont été recensées sur l'archipel dont « une centaine […] en provenance d'Amérique du Nord » **(366)**. Un portage par les migrateurs pourrait disséminer ces résistances dans des environnements moins soumis à la pression anthropique **(53,183,309)**. Ce passage d'animaux n'est pas simple à maitriser. Rappelons que de nombreuses espèces aviaires du territoire ont un statut « protégé », et il ne s'agit pas ici de supprimer cette biodiversité qui a nécessairement un rôle à jouer. Il convient cependant de bien réguler toutes les espèces exotiques envahissantes observées comme les rats **(188,351,370)**. Par ailleurs, même si l'espèce de crapauds retrouvée dans la STEP est aussi classée comme envahissante elle peut présenter un grand avantage dans la régulation des gites larvaires de moustiques. Les interactions batraciens / animaux domestiques semblent bien plus limitées tout comme leur capacité à diffuser des germes résistants.

D'un point de vue de la gestion terrestre et de l'implantation de ces structures sur le territoire, des actions locales semblent primordiales à mettre en oeuvre afin d'optimiser cette cohabitation avec les animaux sauvages naturellement présents. La suppression de l'accès direct aux déchets de process avec une couverture rapide des refus de dégrillage et des boues séchées est une première piste. Afin de limiter la création de flaque d'eau ou de lixiviats près des bassins, des capotages adaptés et des rigoles peuvent aussi être mis en place. La pose de filets au niveau des clarificateurs pourrait être une solution afin d'éviter que les oiseaux ne se posent sur ces bassins. L'opérateur doit aussi éviter les nidifications dans les bâtiments, notamment dans celui comprenant le filtre-presse **(382)**. La présence de chats sur des sites fermés permettrait de dissuader les oiseaux d'y séjourner en plus de correctement réguler la population de rongeurs. Cette démarche originale a notamment été mise en place dans une STEP aux Etats-Unis **(448)**. Une prise en compte paysagère pourrait aussi être réfléchie avec les associations ornithologiques par exemple, afin de détourner les espèces aviaires vers des points proches plus attractifs que la station. Enfin, pour limiter les interactions trop étroites avec les animaux domestiques présents dans le voisinage, un effarouchement des oiseaux selon la réglementation, pourrait aussi être envisagé.

VII. Station d'épuration, employés et riverains : perspectives

En parallèle, bien que l'objectif principal de ce travail de thèse ne fût pas d'apprécier l'exposition directe du personnel de la station et des riverains, il nous semblait cependant primordial de l'évoquer au vue de la forte prévalence d'animaux porteurs de souches BLSE. Aucune enquête et recherche de lignées BLSE spécifiques en portage commensal chez les riverains et les employés au sein de la STEP n'a été menée pour le moment en Guadeloupe.

A) Les bioaérosols une autre piste dans la diffusion de germes BLSE pour les employés ?

En plus d'une circulation intermédiaire par les animaux sauvages et notamment les oiseaux, l'une des hypothèses émises quant à la présence de germes multirésistants chez les animaux domestiques dans le voisinage était la diffusion *via* les bioaérosols. Cette seconde hypothèse rend compte de différents travaux menés au sein de STEP similaires sur la présence de bactéries pathogènes et entériques dans l'air (agents biologiques de niveau 2) **(334,336,338)**. Une première prospection a eu lieu au sein de l'environnement de la station étudiée. Ces travaux ont fait l'objet du stage de Madame Orlane MELICINE en parallèle de l'échantillonnage des sols (**Annexe 5**). Douze prélèvements d'air ont été réalisés à différents points de la STEP (méthode par impaction sur gélose CCA ; 4 campagnes sur 1 mois). Les entérobactéries du projet ECHANGENE ont été retrouvées dans 6 prélèvements (50,0%). Avec majoritairement ECC (5/6), suivi d'*E. coli* (4/6) et de KPNC (2/6). « Seulement » 2 *Enterobacter* étaient C3G-R par hyperproduction de la céphalosporinase. Les autres souches étaient sensibles au panel d'antibiotiques testés à l'exception des résistances naturelles et d'une résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole pour un 3ème isolat d'*Enterobacter*. Cette étude annexe, réalisée sur une courte période en saison sèche a bien confirmé que les bactéries entériques résistantes ou non aux antibiotiques étaient présentes dans l'air de la STEP de Pointe-à-donne. Elles pourraient en théorie diffuser par cette matrice dans cette zone (**Annexe 5**). Ce périmètre de diffusion pourrait être restreint grâce à l'importante végétation et la présence d'arbres autour du site.

En complément de ces premières observations, une équipe de chercheurs au Danemark a aussi pu souligner la présence de ces entérobactéries à plusieurs niveaux, et notamment dans l'air directement respiré par les employés travaillant au plus près du processus de traitement (*E. cloacae* complex ; **Figure 26**). Cette étude était fondée sur l'analyse des germes isolés *via* des préleveurs d'air placés près de points « chauds » dans la production de bioaérosols, mais surtout des préleveurs individuels pour le personnel de la STEP **(337)**. Le parallèle avec les résultats en Guadeloupe suggère donc que le risque de dépôt, d'inhalation ou d'ingestion de clones pathogènes opportunistes et multirésistants est donc réel. De futurs travaux couplés avec de la phylogénie pourraient être menés en ce sens localement afin de vérifier cette hypothèse et d'en limiter le risque pour les employés **(329,339)**. Par ailleurs, chaque environnement de station est différent, et certains paramètre climatiques pourraient limiter la survie de germes entériques multirésistants dans l'air **(56,338,370)**. À noter que le seul site où une entérobactérie BLSE a été isolée dans l'air guadeloupéen correspond à un prélèvement d'aérosols d'un élevage de volaille (*E. coli*). Fait surprenant cette souche présentait 2 gènes codant pour une BLSE ($bla_{\text{CTX-M-1}}$ et $bla_{\text{SHV-12}}$), et aucun isolat avec ce profil n'a été retrouvé dans les fientes de poules en amont **(259)**.

B) Germes BLSE dans l'environnement des STEP et risque de portage chez les riverains

La réglementation en vigueur en France indique que « les stations de traitement des eaux usées sont conçues et implantées de manière à préserver les riverains des nuisances de voisinage et des risques sanitaires ». Aucune mention spécifique n'a été faite en ce qui concerne la présence et la diffusion de souches résistantes aux antibiotiques **(322)**. Cependant, si l'on considère ces bactéries et les gènes spécifiques associés comme des polluants émergents, ils seraient des indicateurs importants à prendre en considération **(1,306)**. Le partage de lignées d'*E. coli* BLSE entre chien et propriétaire et une transmission zoonotique entre les porcs et l'éleveur ont déjà été suggérés **(50,181)**. Les animaux domestiques vivant près de la STEP semblent avoir ici un rôle de réservoir, et la transmission à l'homme *via* l'environnement ou ces animaux est donc envisageable. Une récente étude menée sur des élèves en école vétérinaire a par exemple démontré par une analyse métagénomique et de culture la modification temporaire du leurs microbiote et résistome intestinal lors d'un stage en élevages porcins. Les auteurs ont souligné le lien fort entre le microbiote des élèves et des prélèvements faits au sein des fermes (système de ventilation / fèces de porc / compost) mais aussi chez les éleveurs **(449)**.

Dans cette optique, un projet ambitieux a eu lieu entre 2018 et 2020 dans 3 pays européens (Allemagne, Pays-Bas et Roumanie). Il avait pour but de mieux caractériser le risque de portage fécal de bactéries BLSE chez les employés des STEP mais aussi chez les résidents vivant autour du process de traitement (rayon de 300 m). Pour se faire un questionnaire a été transmis à tous les participants sélectionnés pour limiter de possibles facteurs de confusion, et une analyse microbiologique des selles a été effectuée. Contrairement à l'hypothèse de départ, cette première analyse n'a pas mis en exergue une augmentation du risque de portage chez ces personnes par rapport à la population générale **(450)**. Cependant, avec les résultats de ce manuscrit, il serait judicieux de bien prendre en compte la présence d'animaux domestiques et sauvages dans l'environnement des STEP comme possible facteur de risque supplémentaire pour les riverains dans de futurs travaux de ce type.

Sur le terrain ce facteur de risque a aussi été observé au niveau d'une autre STEP de grande envergure et proche des habitations à Ste-Rose (code Sandre : S079712900001 ; 3 000 EH ; 16.3338367 N, 61.700971 W). En effet comme le souligne la **Figure 84**, nous avons pu constater la présence d'animaux domestiques (*i.e.* 4 oies) au sein même du site de traitement. Ces animaux pouvaient traverser la clôture entre une propriété privée et la station, et surtout se rapprocher des bassins et des lits de séchage des boues **(372)**. Même si ces animaux n'ont pas fait l'objet d'une étude approfondie, le parallèle avec les résultats sur la faune sauvage de la STEP de Pointe-à-donne suggère que le risque de portage de souches BLSE et / ou pathogènes est important. Cette situation de « porosité entre compartiments » requiert une plus grande vigilance des exploitants du site et des riverains pour limiter la circulation de ces animaux de basse-cour au sein de la STEP puisqu'ils pourraient potentiellement servir de vecteur.



Figure 84. Présence et circulation d'animaux domestiques sur un site de traitement des eaux usées urbaines en Guadeloupe. Les oies et l'ouverture dans le grillage du site sont représentées pas une étoile jaune ; l'étoile bleue correspond aux lits de séchage des boues de process facilement accessibles pour les animaux ; la sortie des effluents traités est indiquée par une étoile orange ; la distance entre les bassins et les premières habitations voisines est d'environ 50 m (mesure satellite à partir de Géoportail ; https://www.geoportail.gouv.fr/carte).

C) Perspectives de recherche et questionnement sanitaire aux alentours des stations

La détection de gènes de résistance dans l'environnement n'est pas nécessairement associée à un risque pour l'homme. Cependant, au vu de la charge importante de souches résistantes d'importance clinique chez les animaux, des analyses plus poussées sur le portage dans la communauté (animaux domestiques et/ou propriétaires) autour de ces structures semblent donc indispensables à généraliser aujourd'hui, tout comme il l'a été souligné pour les travailleurs de ce secteur d'activité en contact direct avec les eaux usées **(50,181,337)**. Organiser une étude autour de chacune des STEP de grande ampleur de l'archipel (>2 000 EH) présentant des habitations dans un périmètre restreint aurait tout son intérêt en Guadeloupe au vu des problématiques actuelles de conformité **(349,372)**. En effet, en dépit des difficultés éthiques et sociétales que ce type d'analyse pourrait rencontrer (*i.e.* analyse des selles employés / riverains) **(450)**, ceci permettrait :

- De corréler les premiers éléments factuels de ce manuscrit, de mieux connaître le risque de circulation vers l'homme de souches semblables à celles retrouvées dans les STEP, et de cartographier les possibles point-chauds.

- D'aider les exploitants mais surtout les autorités sanitaires à mettre en place des mesures barrières adaptées dans le cas d'une diffusion avérée sur un site, ou

d'améliorer l'efficacité des actions existantes, en adaptant les actions « WASH » pour l'archipel (**Figure 84**) **(1)**.

- De prendre en compte de nouveaux paramètres dans les études d'impact lors de l'installation de ces structures, et les possibles problématiques au long cours de la diffusion de germes résistants pour les riverains.

Le but sanitaire de ces mesures serait de limiter l'enrichissement du résistome environnemental et surtout d'empêcher de refermer le « cercle » One-Health. En effet les eaux usées regroupent notamment des isolats cliniques ayant entrainé des infections chez des patients en amont ; la circulation *via* les eaux usées aboutissant à un portage secondaire au sein de la communauté doit donc être évitée.

D) Un élargissement des vigilances environnementales pour limiter les points de diffusion

1. Une prise de conscience globale nécessaire

Comme évoqué dans l'introduction, cette notion de résistance aux antibiotiques en dehors du secteur hospitalier et de diffusion *via* le continuum des eaux usées est peu ou pas connue par les filières associées et la population générale en Guadeloupe. L'un des points du plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens implique la notion de médiation **(129)**. Par ailleurs dans les notes d'orientation de 2020 de l'OMS il a été évoqué que « la plupart des pays ont élaboré leurs plans d'action nationaux sur la [résistance aux antimicrobiens] et les révisent périodiquement. Toutefois, les rôles importants [de l'eau, l'assainissement, l'hygiène] et de la gestion des eaux usées ne sont souvent pas abordés » **(1)**. Cette situation est notamment due à des lacunes dans la compréhension de cette diffusion **(16)**. Au niveau de l'hexagone, un récent rapport d'expertise complet et public de l'ANSES intitulé : *Antibiorésistance et environnement, état et causes possibles de la contamination des milieux en France*, a permis de dresser un premier état des lieux de cette problématique **(345)**. Malheureusement les recherches associées à l'antibiorésistance et sa dissémination reste hétérogènes et limitées dans d'autres régions du globe notamment en Amérique du Sud et dans les territoires des Caraïbes ou encore en Afrique **(16,368)**.

Aux Antilles françaises, la pollution anthropique est communément associée à l'impact et la diffusion de la chlordécone, à la préservation des zones protégées, au déclin des coraux, aux déchets plastiques et dépôts sauvages, ou encore aux échouages de sargasses sur le littoral **(368,370,438,451,452)**. Au niveau bactériologique les travaux menés par l'Institut Pasteur de la Guadeloupe depuis plusieurs années ont permis de souligner la faible prévalence de résistance aux antibiotiques, notamment chez les entérobactéries, dans différents compartiment en dehors du secteur hospitalier. Que ce soit au niveau des infections urinaires communautaires, de la faune sauvage mais aussi dans les élevages, l'archipel guadeloupéen semble pour le moment relativement préservé grâce notament à une utilisation modérée des antibiotiques **(13,28,39,43,365)**. L'objectif de ce travail de thèse n'est pas d'incriminer puisque la diffusion environnementale de germes multirésistants n'est pas réglementée. De plus, les difficultés

actuelles et passées des différentes parties prenantes à ce projet que sont le secteur hospitalier ou les réseaux d'assainissement du territoire sont des points bien connus par les entités administratives et la population, et sont en phase d'amélioration **(349,379–381)**. Comme mentionné plus haut, au même titre qu'une démarche qualité classique il serait cependant plus que judicieux de mieux sensibiliser les acteurs qui sont associés aux « points chauds de l'antibiorésistance » afin de limiter autant que faire se peut une dissémination terrestre et une circulation secondaire dans les compartiments associés **(129,313,332,339)**.

2. Bactéries multirésistantes et environnement aquatique : le rôle de l'assainissement à mieux considérer

Cette problématique de diffusion environnementale est aussi à mieux prendre en compte au niveau aquatique et notamment de la mer. Cet environnement est une importante niche écologique et le relargage de bactéries résistantes en fin de process d'épuration a bien été démontré dans ce projet et surtout précédemment sur d'autres sites de la Guadeloupe **(28)**. La salinité de l'eau est un des paramètres secondaire qui va permettre un contrôle de la population de bactéries entériques **(56)**. Un risque environnemental dû à un déversement continu et localisé est envisageable, et des mesures côtières spécifiques seraient à prévoir pour correctement apprécier l'efficacité du traitement et de la résilience du milieu **(343)**. Cette île présente une économie touristique importante notamment tournée vers la mer avec 88 sites de baignades référencés (+ 17 en rivière) **(453)**. Le rapport de l'ARS sur la qualité des eaux de baignade en Guadeloupe en 2020 a indiqué la présence des indicateurs fécaux au-delà des normes pour 13% de ces sites, dont 4 zones côtières aujourd'hui interdites de façon permanente **(453)**. Ces résultats sont à l'image des activités anthropiques voisines, dont la non-conformité des petites ou grandes STEP et les zones industrielles, comme par exemple Petite-Anse à Bouillante ou Viard à Petit-Bourg (observation faite *via* https://www.geoportail.gouv.fr/carte) **(372,376,453)**. Ce mauvais fonctionnement et des casses dans le réseau de collecte ont tout au long de ce projet engendré des fermetures temporaires de plages et l'interdiction d'activités nautiques à certains points à cause du risque sanitaire associé (**Annexe 4**) **(374,376,454)**.

L'exposition de la population aux bactéries surveillées en clinique et résistantes aux antibiotiques par l'environnement aquatique, marin ou non, reste pour le moment peu étudiée. Les données actuelles présentent ce risque comme peu important (< 3% au Pays-Bas) **(166)**. Cependant, un récent projet au Royaume-Uni a démontré la présence d'*E. coli* BLSE sur les côtes (11/97) malgré la forte dilution et l'environnement moins adapté à leur développement (salinité, température). Des souches du phylogroupe B2, dont ST131 présentant en majorité un gène de type $bla_{\text{CTXM-15}}$ ont été isolées dans les eaux de baignade de différentes localités, suggérant un relargage et une contamination continue par les activités anthropiques aux alentours, ou une possible adaptation de ces lignées et la présence dans les sédiments **(11,41,255,352)**. Les mêmes auteurs, en se concentrant ensuite sur le portage de souches résistantes chez les usagers de la mer ont démontré que les activités de baignade sur ces sites, comme la pratique du surf, pouvaient augmenter le risque de portage de germes résistants similaires à ceux retrouvés dans l'eau. Cette observation de prévalence doit cependant être approfondie par phylogénie **(41)**. En Guadeloupe, cette exposition des usagers était très

probable sur la plage de Petite-Anse citée précédemment. En effet nous avons pu isoler des KPNC BLSE en sortie d'une petite station (350 EH), privée et non-conforme, en amont. Ces souches étaient aussi présentes dans la ravine qui se déverse au point Est de la plage, sans système de relargage au large (données d'octobre 2018 non présentées) **(372)**. L'ARS a par ailleurs indiqué que « la baignade devait être [momentanément] interdite » dans cette zone après les dernières analyses approfondies pour 2020 **(453)**. L'origine de ces germes multirésistants serait probablement associée aux activités d'un centre gérontologique dépendant de la station **(455)**. Ces constats devraient amener à plus de vigilance sanitaire dans les sites de forte affluence de l'archipel et dans le reste des territoires des Caraïbes qui présentent, comme les précédents pays cités en référence (*i.e.* Pays-Bas et Royaume-Uni), une importante activité économique tournée vers la mer. En effet en plus de la pêche ou des réseaux de navigation, « l'économie bleue » au sein de l'ensemble de cette région du globe et notamment aux petites Antilles, est très dépendante du tourisme. Ce secteur d'activité y génère chaque année environ 57 milliards de dollars avec plus de 27 millions de touristes, et le management de la pollution côtière est une lacune pour un bon nombre de ces territoires **(368)**.

3. Le cas de la zone humide de Jarry et de la mangrove guadeloupéenne : des zones totalement protégées ?

Les résultats de ce projet suggèrent que la présence de bactéries multirésistantes au sein de la faune sauvage serait majoritairement retrouvée dans l'enceinte de la STEP et dans un périmètre restreint aux alentours. Il a précédemment été démontré que la résistance aux β-lactamines au sein de la faune sauvage terrestre en forêt reste limitée au point d'exposition et diminue avec la distance et l'absence de pression anthropique **(307)**. La STEP de Pointe-à-donne n'est pas en contact direct avec la zone humide de Jarry située à environ 1,5 km et séparée par la zone industrielle de Jarry. Cette zone protégée de foret marécageuse, de marais et de mangrove pouvant être soumise à la pression anthropique en périphérie renferme une importante diversité d'animaux dont des oiseaux. Il serait intéressant de mener des investigations plus spécifiques sur ces dernières au sein de ce type d'environnement, avec l'hypothèse d'une plus grande distance de dissémination que le périmètre STEP → ferme **(53)**.

Par ailleurs, comme indiqué dans un rapport de 2019 sur la zone, « les eaux usées ne sont pas déversées directement dans la forêt marécageuse. Toutefois certains dysfonctionnements engendrent des points de rejet d'eaux usées non traitées localement qui vont potentiellement se retrouver, par le biais du ruissellement ou des réseaux des eaux pluviales, dans le milieu naturel » **(370)**. Une casse importante sur le réseau en février 2021 a engendré un déversement des effluents non traités de l'agglomération pointoise, « en milieu naturel, en l'occurrence à l'embouchure de la Rivière Salée » pendant plusieurs semaines **(454)**. Une analyse plus poussée dans les sédiments dans cet environnement protégé pourrait donc être menée, en considérant soit des points de contaminations intermédiaires par des casses dans le réseau, soit la distance avec la STEP, « hot-spot » de la résistance aux antibiotiques dans la zone. En effet des germes et résistances similaires à ceux recherchés dans ce projet ont déjà été identifiés dans ce type d'écosystème et pourrait persister et diffuser dans les sédiments **(11,184,456)**. Les décharges sauvages, les écoulements de lixiviats associés ou les

déversements *via* les activités des entreprises adjacentes pourraient aussi apporter une pollution microbiologique non étudiée sur le territoire **(32,356,370)**. Rappelons enfin que la zone de mangrove représente environ 75 km² en Guadeloupe et reste un lieu de biodiversité biologique à préserver. Les précédents travaux sur le territoire étaient focalisés seulement sur des points stratégiques, l'étudier dans son ensemble selon un degré de pression anthropique, ou comparer avec les îles voisines pourrait être révélateur des points où la pollution marine est importante **(343,368,457)**.

E) Une autre pollution durable et moderne de l'environnement aquatique : les plastiques

La pollution marine par les macro- et micro-plastiques est une autre problématique mondiale depuis de nombreuses années. Les pays situés sur les côtes du continent asiatique restent les plus gros contributeurs en terme de possible apport environnemental de plastiques, avec en tête la Chine qui présentait en 2010 environ 881 917 tonnes de déchets plastiques mal pris en charge à cause d'infrastructures et d'un management inadaptés dans les régions proches des côtes. Cette quantité de plastiques présentaient un risque accru de se retrouver dans les milieux marins **(458)**. Entre 1986 et 2008, Law K. L. *et al.* estimaient en moyenne la présence de plus de 1 400 pièces de plastiques (visible à l'œil nu) par km² dans la mer des Caraïbes. Par ailleurs des concentrations 140 fois supérieures ont été mesurées sur la côte Atlantique à l'Est de la Floride à la même période **(459)**. Aujourd'hui, plus de 20 ans après, ces données seraient bien plus importantes au vu de la résistance de ces composés à la dégradation, des courants marins, des épisodes climatiques (*i.e.* cyclones, inondations, tsunamis), et surtout de la pollution croissante. Pour la région d'étude, la « mer de plastiques » près des côtes de l'île de Roatán en est l'un des exemples les plus médiatiques **(368)**. Parmi les territoires antillais, la République Dominicaine, l'archipel de Trinité-et-Tobago ou encore Cuba étaient les plus gros pourvoyeurs de déchets plastiques potentiellement éliminés de manière inadéquate (de 90 630 à 118 226 tonnes en 2010). En comparaison l'estimation pour la même période en Guadeloupe était de 6 564 tonnes, ce qui reste problématique pour de petits territoires insulaires **(458)**. Ces déchets qui découlent en partie d'actes d'incivilités ont été observés sur le terrain notamment en lisière de la zone humide de Jarry et sur les plages de l'archipel **(370,452)**.

En plus d'un risque toxique pour la faune aquatique et terrestre, et le passage dans la chaine alimentaire, ces composés synthétiques pourraient avoir d'autres répercussions au long cours en lien avec le présent travail de thèse **(452,460)**. Les plastiques ont été décrits comme de bons vecteurs dans la dispersion d'espèces marines entre les continents (algues, crustacés…) **(461)**. À une plus petite échelle, un récent projet mené sur des macro-plastiques isolés dans la baie de Guanabara au Brésil a souligné la présence de lignées virulentes d'*E. coli*, et d'autres espèces comme *Vibrio cholerae* sur des éléments à la dérive **(462)**. En mer méditerranée, une équipe a aussi démontré que les plastiques pouvaient être des vecteurs de germes résistants aux antibiotiques (*i.e.* $bla_{\text{CTX-M}}$) **(360)**. La diversité bactérienne et des gènes de résistance entre les communautés présentes sur ces éléments et celles de l'eau est cependant variables selon les études et les approches **(256,360)**. La communauté microbienne agrégée (*i.e.* plastisphère) reste encore peu étudiée et la persistance de lignées d'importance clinique, pathogènes ou résistantes,

et le devenir des gènes de résistance pouvant être associés est à mieux élucider. Un protocole expérimental en laboratoire a souligné que ces niches écologiques présenteraient une plus forte tolérance aux agressions extérieures (*i.e.* molécules antibiotiques dans l'eau) que les organismes libres **(256)**. De plus de façon générale comme pour d'autres substrats solides, une récente revue de la littérature sur le sujet a conclu que l'abondance des gènes de résistance reste plus importante au sein de la plastisphère qu'au sein du microbiome de l'environnent aquatique associé **(460)**.

La pollution plastique est inhérente aux sociétés modernes et se retrouve au carrefour de nombreuses disciplines comme la résistance aux antibiotiques. De plus l'élimination des plus petits éléments de la phase liquide lors du process de traitement des eaux usées est aussi très inégale selon les stations et les process utilisés. Une petite fraction sera systématiquement retrouvée dans l'environnement récepteur et l'absence de conformité d'une STEP ne permet pas de savoir actuellement si l'abaissement de la concentration des composés comme les micro-plastiques (< 5 mm) est efficiente avant le rejet. Leur abondance en entrée de process est estimée entre 0,28 éléments à $3{,}14\times10^{4}$/L d'eau usée, avec notamment les polystyrènes et d'autres fibres issues des ménages (*i.e.* vêtements synthétiques lors des lavages répétés) **(325)**. Ceci questionne sur le devenir de ces polluants émergents à dégradation lente rejetés en continu par ces systèmes (0,01 à $2{,}97\times10^{2}$ particules L^{-1}), et le développement ou perfectionnement des approches technologiques pour limiter au maximum leur diffusion environnementale avec la flore allochtone associée issue des déjections humaines **(325,460)**.

Conclusion générale du projet

Les bactéries résistantes aux traitements antibiotiques représentent aujourd'hui un important défi sanitaire. Les capacités d'adaptation de ces micro-organismes et le partage de gènes de résistance au sein des populations sont à l'origine de leur expansion rapide et non maitrisée. Ces bactéries ont la possibilité de circuler entre les hommes, les animaux et le compartiment environnemental. Par conséquent, des collaborations et des protocoles d'étude de type « One-Health » ont été mis en place afin d'unir les efforts et de lutter efficacement contre cette problématique mondiale aux multiples répercussions.

Cette thèse fournit pour la première fois une vue globale des principales lignées d'entérobactéries multirésistantes qui circulent dans le plus grand hôpital de la Guadeloupe. Par une approche phylogénétique, l'ensemble des résultats a aussi permis de souligner l'importance des effluents urbains et des processus de traitement associés dans la propagation environnementale de ces lignées. Actuellement, la littérature scientifique sur le sujet reste principalement centrée sur la circulation de ces germes au sein du continuum des eaux usées et jusqu'à la zone aquatique réceptrice. Dans ce projet nous avons mis en évidence que l'environnement terrestre des STEP était aussi une source importante de bactéries multirésistantes, avec une large diffusion de ces dernières vers la faune sauvage associée. En Guadeloupe le portage de bactéries multirésistantes chez ces animaux est faible et le cas des STEP reste l'exception. La diffusion au sein de la faune sauvage est multifactorielle, mais selon le comportement de ces animaux et leur mode de vie, ils pourraient servir de sentinelles dans un lieu spécifique et permettre d'apprécier le degré de pollution anthropique. La faune sauvage, péri-domestique ou non, doit par conséquent être mieux considérée dans les programmes d'écologie et de lutte contre la propagation de l'antibiorésistance. Nos observations et les hypothèses détaillées dans ce manuscrit ont aussi permis d'étayer le rôle de ces animaux en tant que vecteur de la résistance. En effet, une circulation secondaire de lignées spécifiques a aussi été soulignée chez des animaux domestiques proches de la STEP mais n'ayant aucun contact avec le process de traitement. La faune sauvage qui gravite autour en serait le principal pourvoyeur.

Grâce aux données accumulées à l'Institut Pasteur de la Guadeloupe, la problématique de l'antibiorésistance en Guadeloupe semble être à l'image des pays européens et Nord-américains, avec des infections à bactéries productrices de BLSE presque exclusivement retrouvées à l'hôpital et une faible incidence au niveau communautaire. On observe aussi une utilisation raisonnée des molécules antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, et une séparation des bactéries résistantes entre les compartiments animaux domestiques et homme. La diffusion environnementale de bactéries productrices de BLSE reste associée aux eaux usées, mais les processus de compostage des boues de station permettent une bonne limitation de ces germes avant valorisation agricole. Ces résultats sont d'une importance cruciale pour une meilleure prise en compte de l'assainissement dans les programmes locaux et mondiaux de lutte contre la diffusion de l'antibiorésistance. Par ce manuscrit, la notion de « hot-spot » de la résistance prend ici tout son sens à plusieurs niveaux du continuum des eaux usées. En raison des difficultés rencontrées par les acteurs du secteur sur le territoire guadeloupéen, ces travaux

pourraient être voués à être reproduits et approfondis en collaboration avec d'autres parties prenantes, afin de mieux identifier les zones de diffusion environnementale de ces germes. Des recherches supplémentaires devraient aussi être consacrées à l'évaluation des possibilités de limitation efficaces des bactéries résistantes dans les eaux usées avec une notion de prétraitement dès la sortie des établissements de soins. La mise en place de traitements tertiaires pourrait aussi être une piste car ils ne sont pas installés dans les STEP de Guadeloupe pour le moment.

Ces travaux ont également soulevé la question de la nomenclature des ECC et la possibilité de mise à jour du système de typage fondé sur l'approche « *hsp60* » **(407,408)**. En effet le suivi épidémiologique des principaux pathogènes sur le territoire est crucial mais ne peut se faire sans une identification correcte de ces derniers. Enfin, ce projet a permis de démontrer que le groupe d'incompatibilité plasmidique IncHI2 notamment associé aux membres du complexe *Enterobacter* présente une réelle importance dans la diffusion environnementale de résistances et dans le succès de lignées pathogènes opportunistes en Guadeloupe. Par ailleurs, de nombreux aspects fondamentaux concernant la phylogénie de ces éléments génétiques mobiles et l'adaptation à l'hôte ne sont pas connus. Or, ce n'est qu'en comprenant les relations plasmide / hôte que nous pourrons mieux évaluer et limiter la propagation et la persistance de la résistance. Cet approfondissement est aussi crucial pour anticiper la possible émergence de « super-plasmides » de résistance sur le territoire, ou de lignées de *Klebsiella* hypervirulentes et multirésistantes suite à des transferts horizontaux **(191,263)**.

Ce manuscrit présente des résultats moins « poussés » en ce qui concerne l'espèce *E. coli* et le genre *Klebsiella*. Cette analyse partielle assumée tient compte des projets menés en parallèle au sein de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe. En effet l'étude hors cadre des STEP sur la diversité au sein de la population de KPNC fait l'objet du projet de thèse de Madame Gaëlle GRUEL initié en 2018 **(405)**. Tandis que les données pour l'espèce *E. coli* et les résistances associées chez les animaux domestiques et la faune sauvage découlent des travaux actuels et passés des docteures Séverine FERDINAND, Stéphanie GUYOMARD-RABENIRINA, Syndia SADIKALAY (2013 – 2020) et de Madame Degrâce BATANTOU (2021 – 2024) **(43,185,404)**. Une mise en commun de toutes les données génomiques accumulées est donc en perspective, afin d'avoir une vision plus globale de l'évolution de la résistance sur l'ensemble du territoire et d'analyser la diffusion de ces germes dans le temps comme effectué ici pour *Enterobacter*.



Merci d'avoir pris le temps de me lire.

Image adaptée de https://www.huffingtonpost.fr

ANNEXES

INSTITUT PASTEUR

Annexe 1. Poster présenté lors du Caribbean Science and Innovation Meeting du 20 au 23 octobre 2019 à l'Université des Antilles, Guadeloupe.

ENVIRONMENTAL RESERVOIRS OF ECC CLUSTER VIII IN GUADELOUPE, FRENCH WEST INDIES

Matthieu Pot [a], Yann Reynaud [a], Séverine Ferdinand [a], Sébastien Breurec [a,b,c], Pierre Legreneur[d], Antoine Talarmin [a], François Guérin[e], Stéphanie Guyomard-Rabenirina [a]

[a] Unité Environnement et Santé, Institut Pasteur de Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, France
[b] Laboratoire de Microbiologie clinique et environnementale, Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre/les Abymes, Pointe-à-Pitre, France
[c] Faculté de Médecine Hyacinthe Bastaraud, Université des Antilles, Pointe-à-Pitre, France
[d] CRIS EA 647 (P3M), Université de Lyon, Villeurbanne, France
[e] Université de Caen Normandie, EA4655 U2RM (Équipe Antibio-Résistance), Caen, France

Introduction

Species of *Enterobacter cloacae complex* (ECC) are widely distributed in the environment and are part of the gut microbiota of both animals and human. *Anolis marmoratus*, an endemic and anthropophilic lizard of Guadeloupe, is a natural carrier of ECC and in particular of strains resistant to third generation cephalosporins (3GCR) [(1)]. Bacteria belonging to this complex are also major opportunistic pathogens which draw attention by their involvement in nosocomial infections and the emergence of multidrug resistant clones. Using *hsp60* genotyping, ECC is divided into 12 genetic clusters (cluster I-XII) and a loosely knit group (cluster xiii) [(2)]. Strains belonging to clusters III, VI and VIII are prominent in human infections [(3)].

Objectives

- To evaluate the presence of 3GCR-ECC in different environments in Guadeloupe
- To identify putative environmental reservoirs of ECC C-VIII
- To assess the genetic diversity of ECC C-VIII isolated from different sources

Methods

- Between January 2017 and September 2018, 155 ECC strains were isolated from local fruits and vegetables, fecal samples of *Anolis marmoratus* and water catchment sampled in different sites of Guadeloupe.
- Antibiotic susceptibility was performed according to the EUCAST 2017.
- 66 ECC clinical isolates were recovered from two hospitals, Pointe-à-Pitre (Guadeloupe) and Caen (France) and added to the environmental collection.
- Partial sequencing of *hsp60* gene was done to identify the specific cluster for each strains.
- A Maximum likelihood analysis based on the core genome analysis was realized on a selection of ECC cluster VIII strains (n=58) isolated from human (n=33) and lizard (n=25).

Results

- Of the 155 environmental ECC strains, 28.4% were 3GCR. This resistance was exclusively due to the overexpression of the chromosomic AmpC cephalosporinase. None resistance to other class of antibiotics was recovered.
- All clusters were present in environmental samples except C-II and C-VII.
- Cluster VIII was predominant in *Anolis marmoratus* isolates (n=37, 38.9%) and in water catchment (n=10, 45.6%).
- Maximum likelihood analysis revealed a clear split of isolates into 2 main clusters depending on sources : clinical samples together (n=29) but also 5 strains isolated from *Anolis*. The second group was mainly constituted by strains from lizard (n=20) and by 4 clinical samples.

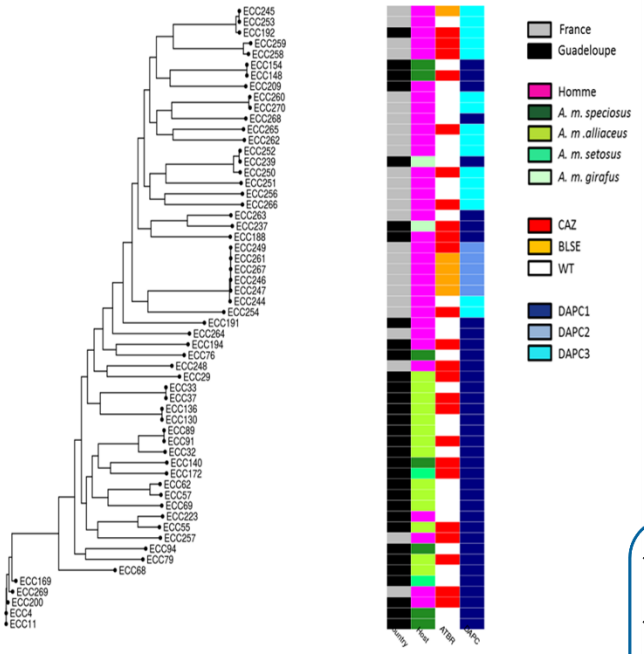


Figure 2 : Core genome analysis (Maximum likelihood) and antibiotic resistance profiles (ATBR) of ECC cluster VIII isolated from human and different *Anolis marmoratus* subspecies

Antibiotic resistance profiles : Wild type (WT), extended spectrum beta-lactamase (BLSE), AmpC cephalosporinase (CAZ) in the absence of BLSE. DAPC: discriminant analysis of principal component on accessory genomes (Adegenet software)

Table 1 : Number of ECC according to sample type

Type of sample	Number sampled	Number of samples positive for ECC	Number of samples positive for 3GCR ECC (%)
Anolis marmoratus	145	56	25 (17.2)
Fruits and vegetables	65	33	7 (10.8)
Water catchment	40	20	2 (5.0)

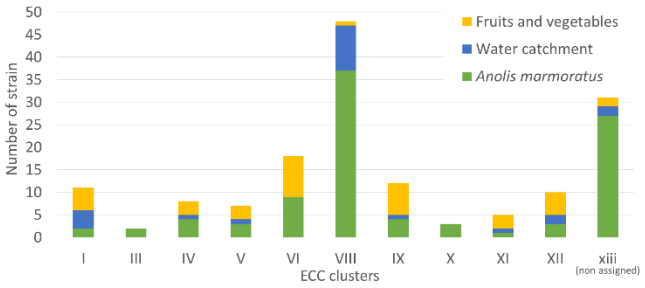


Figure 1 : Environmental distribution of ECC clusters according to sample type

Conclusions

- In Guadeloupe, bacteria resistant to third generation cephalosporins exist in environmental reservoirs.
- The first results on the core genome analysis of ECC cluster VIII suggest that exchanges may happen between human and *Anolis marmoratus* within a One Health approach.
- Other strains will be added and further analysis will give us a better overview of the reservoirs of ECC cluster VIII in Guadeloupe.

References

[(1)] Rabenirina, S. (2016). Résistance aux antibiotiques des entérobactéries en Guadeloupe : importance en milieu communautaire et diffusion environnementales. Thèse Doctorat : Microbiologie. Pointe-à-Pitre : Université des Antilles, 247p.
[(2)] Hoffmann, H., Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenspecies Enterobacter cloacae. Applied and Environmental Microbiology, 69, 5306-5318
[(3)] Guérin, F. (2015). Infections à Enterobacter cloacae complex : résistance aux antibiotiques et traitement. Journal des Anti-Infectieux, 17, 79-89

Annexe 2. Poster présenté au 15e Congrès National de la Société Française de Microbiologie à Paris du 30 Septembre 2019 au 2 octobre 2019.

CIRCULATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES BETWEEN BACTERIA FROM DIFFERENT ORIGINS

Pot M. [a], Reynaud Y. [a], Gruel G. [a], Ferdinand S. [a], Breurec S. [a,b], Talarmin A. [a], Guyomard-Rabenirina S. [a]

[a] Unité Transmission Réservoir & Diversité des Pathogènes, Institut Pasteur de Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, France
[b] Faculté de Médecine Hyacinthe Bastaraud, Université des Antilles, Pointe-à-Pitre, France

Introduction

An environment affected by anthropogenic activities can play an important role in spread and concentration of antibiotic resistant bacteria. Under antibiotic selection pressure, exchanges of antibiotic resistance genes (ARGs) can occur between bacteria from human, animal and environmental reservoirs. Wastewater treatment plants (WWTPs) are known to be hotspots for selection and emergence of antibiotic resistant bacteria and constitute a favorable interface for these circulations [(1)].

Objectives

➔ To appreciate the presence of *Enterobacteriaceae* strains resistant to third-generation cephalosporins (3GCR) in clinical, wastewater and animal samples by focusing on *Enterobacter cloacae complex, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae* species in Guadeloupe.

➔ To assess resistome and genomic diversity along wastewater continuum.

➔ To evaluate the possible exchange of ARGs between bacteria isolated from human to environment and animals.

Method

- Between June 2018 and April 2019 we isolated a total of 613 3GCR bacterial strains from different environments : 348 from wastewater and 265 from domestic and wild animals (n=123). These were living near sewers of the University Hospital of Pointe-à-Pitre (UHPAP) and near the urban WWTP treating hospital effluent (320 m radius).
- Within the same period, 292 3GCR *Enterobacteriaceae* isolates were recovered from the UHPAP.
- Antibiotic susceptibility was performed according to the EUCAST 2017 and strains were grouped in different resistant clusters.
- A first Maximum likelihood analysis based on the core genome analysis was realized on a selection of Extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing *E. coli* (n=30) and compared to another collection of antibiotic resistant *E. coli* collected in farms in Guadeloupe in 2019 (n=12).

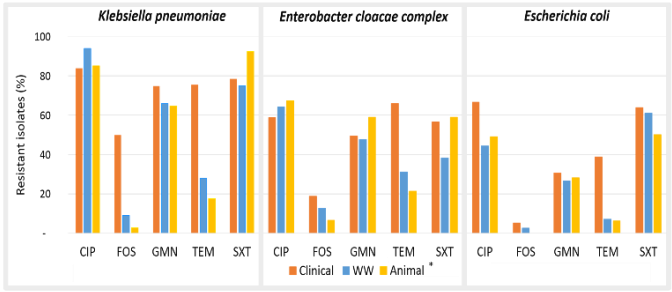


Figure 1 : 3GCR *Enterobacteriaceae* and associated resistances according to sample type. CIP=Ciprofloxacin; FOS=Fosfomycin; GMN=Gentamicin; SXT=Trimethoprim/Sulfamethoxazole; TEM=Temocillin; WW= Wastewater. **E. coli* strains from farm collection were not included in this figure.

Results

- ESBL producing *Enterobacteriaceae* were found in all wastewater samples (n=36), from the hospital sewers to WWTP effluent.
- The occurrence of 3GCR *Enterobacteriaceae* was important in domestic and wild animals living nearby these polluted environments (n=86, 70%).
- The first genome-based comparison showed that $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ was the most present ESBL gene (17/42), being only shared between strains from hospital, wastewater and animals living near WWTP. In contrast, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ was the only ESBL gene found in farm samples (11/42).
- Associated resistances seem to be higher in clinical samples and some strains such as *E. coli* ST131 (n=4, fig. 2) were only isolated in the hospital.
- One sequence type (*E. coli* ST38) contained both wastewater and animal isolates (GESC163/241/272) differed by ≤ 5 single nucleotide polymorphisms (SNPs).

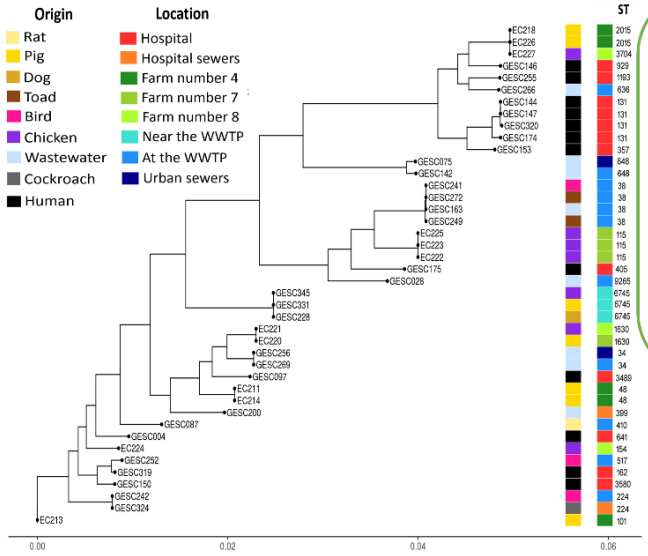


Figure 2 : Core genome analysis (Maximum likelihood based on 90 509 SNPs in the 2731 core genes) and Multilocus sequence type (MLST) of ESBL producing *E. coli* isolated from human, wastewater and animals in Guadeloupe. GESC=Strains from the wastewater continuum (n=30); EC=Strains collected in farms in Guadeloupe (n=12).

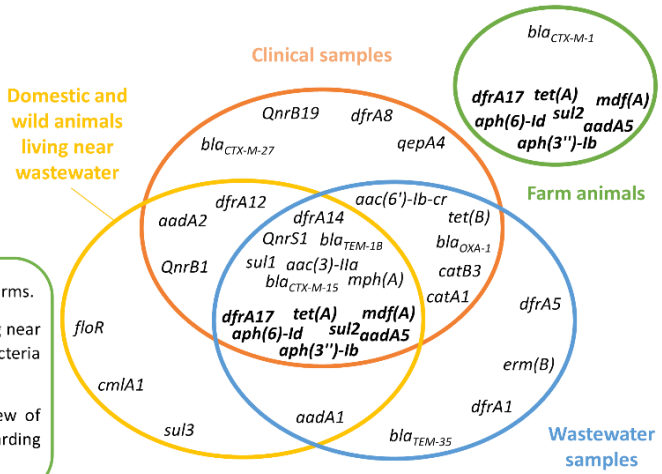


Figure 3 : Venn diagram displaying ARGs found in sequenced *E. coli* (n=42). In bolt text=Genes shared between the 4 collections.

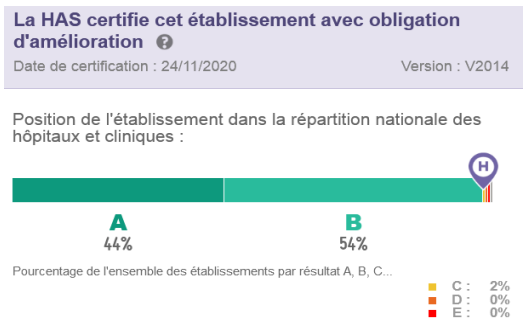
Conclusions

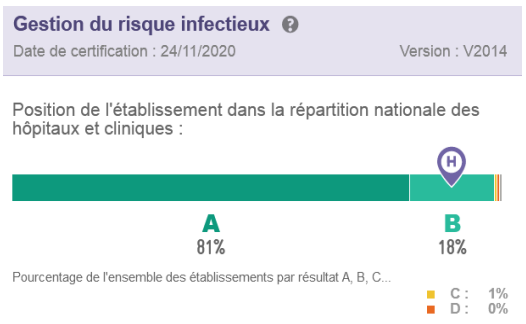
- In Guadeloupe, 3GCR *Enterobacteriaceae* exist in environmental reservoirs and farms.
- The first results on the core genome analysis of *E. coli* confirm that animals living near sewers and WWTP are subjected to antibiotic resistance pressure and some bacteria and ARGs could be closely related.
- Other strains will be added and further analysis will give us a better overview of exchanges that may happen between human-environment and animals regarding antibiotic resistance.

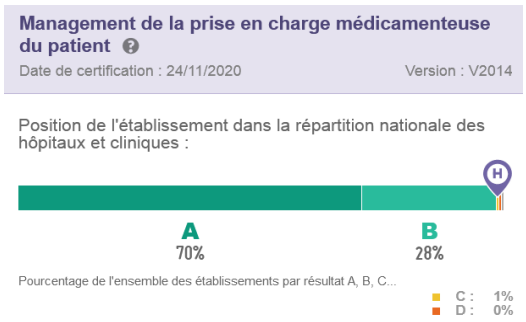
Reference

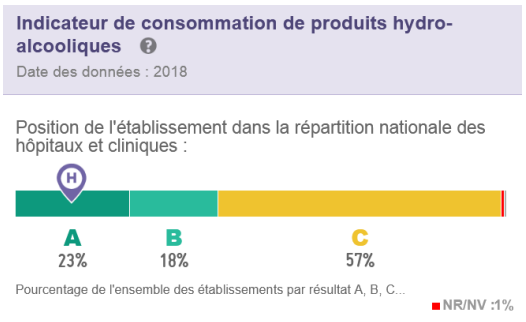
[(1)] Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., Mulkiewicz, E., 2019. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. Science of the Total Environment. 697, 134023.

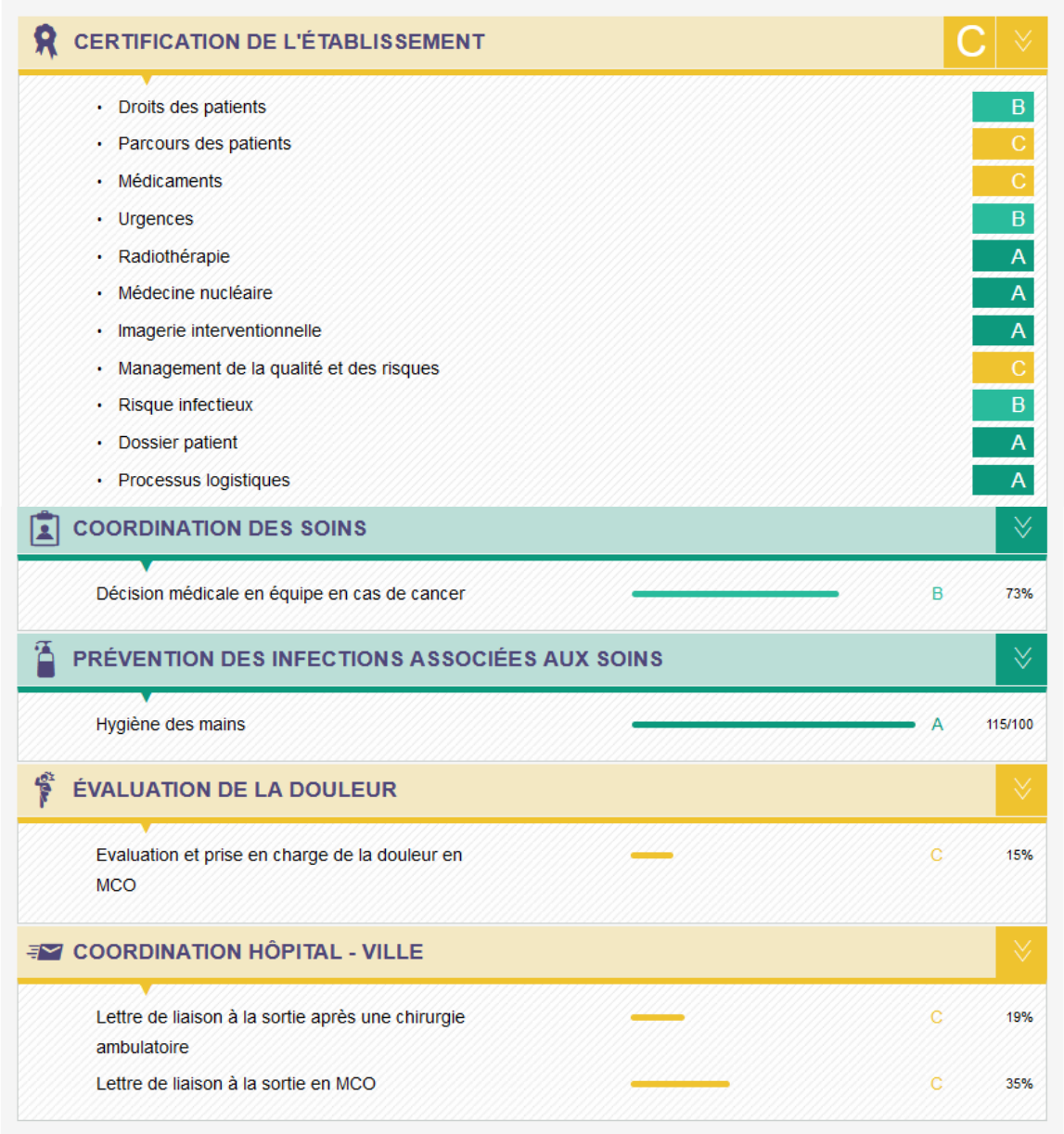
Annexe 3. Détails des indicateurs qualité Scope Santé du CHU de Pointe-à-Pitre/Les Abymes











Toutes ces données et les détails sont accessibles au public à l'adresse suivante : https://www.scopesante.fr. Site consulté le 30/10/2021.

Annexe 4. Courrier d'alerte transmis par la mairie de Ste-Anne à la police de l'eau suite à des morts suspectes de poissons dans un cours d'eau en 2021.

Sainte-Anne, le 10 juillet 2021

Le Maire,

A

Monsieur le Directeur de la DEAL
POLICE DE L'EAU
Zac de Kann'Opé - Dothémare II
97139 LES ABYMES

Pôle Technique
Téléphone : 0590 85 48 78
Fax. : 0590 85 38 51

Affaire suivie par : Karine FROMAGER
Courriel : karine.fromager@villesainteanne.fr

Nos Réf. : C.B/G.P/K.F/251

Objet : Signalement présence de poissons morts – Le Helleux Anse Gros Sable – demande urgente de prélèvements sur le milieu.

Monsieur le Directeur,

J'ai reçu des signalements relatifs à la présence de poissons morts au niveau de la mangrove située à l'Anse Gros Sable – LE HELLEUX.

Je vous joins les photos prises sur site ce jour.

Dans le cadre de votre compétence de police de l'eau, je vous demande de réaliser des prélèvements sur le milieu afin d'établir une éventuelle pollution. Le cas échéant, les sources de cette pollution devront être recherchées.

La zone se trouvant non loin du poste de refoulement d'eaux usées, défectueux, de l'Anse Gros sable, par la présente, je formule de nouveau ma demande au Président du SIAEAG, destinataire en copie de ce courrier, de prendre les mesures nécessaires au niveau de cet ouvrage.

Un signalement avait également été adressé à la CARL et au SIAEAG quant au disfonctionnement de ce poste de refoulement des eaux usées.

Je précise par ailleurs que j'avais déjà pris le soin d'adresser une demande à la directrice de l'ARS afin que soit réalisé une analyse de l'eau de baignade dans cette zone. Demande transmise en date du 19/08/2020.

Par ailleurs, afin de prévenir tous risques, l'Anse Gros Sable étant une zone de pratique de sports nautiques, je vous informe je prendrai un arrêté afin d'interdire l'accès au site dans l'attente d'un retour de la part de vos services.

Je vous prie de bien vouloir agréer, Monsieur le Directeur, mes salutations respectueuses.

Ampliation : SIAEAG, CARL, ARS, Office de l'eau Conservatoire du littoral, ONF, OFB

Le Maire

Christian BAPTISTE

Tout courrier doit être adressé à :

Monsieur le Maire - Hôtel de ville Place Schœlcher 97180 SAINTE-ANNE-Tél. :0590 85 48 68
Courriel : service.courrier@ville-sainteanne.fr

Ce document annexe est une copie. Le courrier original est accessible sur le site de la ville de Ste-Anne à l'adresse suivante : https://www.ville-sainteanne.fr/actualites/article/pollution-plage-du-helleux-intervention-de-la-police-de-l-environnement

Annexe 5. Expérimentation annexe n°1 : Prélèvements environnementaux effectués en parallèle du projet ECHANGENE au sein de la station de Point-à-donne.

Contexte et présentation du projet

Les eaux usées des STEP sont connues pour renfermer en leur sein de nombreux germes de différentes origines. On peut en effet retrouver des bactéries, des champignons, des virus ou encore des protozoaires et des helminthes qui vont pouvoir proliférer et diffuser le long de ce continuum. Tous ces germes proviennent notamment de l'homme *via* les matières fécales. Les risques microbiologiques associés au sein d'une station de traitement peuvent en théorie être nombreux car ces eaux présentent aussi des agents pathogènes. Les stratégies d'épuration mises en œuvre comportent généralement une utilisation de bassins d'aération impliqués dans le traitement biologique des effluents. À cette étape du traitement, le liquide est brassé et oxygéné en continue pour garder les micro-organismes épurateurs en suspension et maintenir une activité biologique aérobie adéquate. Divers systèmes permettent ce brassage. Au sein de la STEP de Jarry ces bassins à ciel ouvert sont équipés d'aérateurs de surface qui engendrent la production en continu d'aérosols mais aussi de bulles. De par nos observations sur le terrain, une autre étape en amont libère aussi des particules dans l'air. Celle-ci correspond à la phase de dégrillage située en début de traitement. Selon la forme du dégrilleur il est possible d'observer une production de gouttelette plus ou moins fines. C'est le cas dans la STEP étudiée où les dégrilleurs présentent une forme pyramidale et ne comportaient pas de système fermé limitant l'émission de particules au début de l'année 2018.

Des analyses annexes de l'eau stagnante au sein de la STEP ont permis de révéler la présence de souches BLSE pouvant expliquer en partie le portage de souches résistantes chez les crapauds qui vivent et se développent dans cet environnement (**Figure S1**). En ce qui concerne le portage chez d'autres espèces sauvages présentes au sein de la station, comme les oiseaux et les rats, celui-ci pourrait s'expliquer en plus des flaques par le contact direct avec les déchets et notamment les macro-déchets isolés au niveau des dégrilleurs et stockés sur le site dans des bennes ouvertes. Quant aux cafards ces derniers sont en contact constant avec des germes résistants aux antibiotiques de par leur régime coprophage et les lieux où ils se développent.

Cependant ceci ne peut pas être généralisé pour les animaux domestiques présents dans le voisinage de la STEP. Bien qu'ils n'aient pas reçu de traitements antibiotiques comme nous l'a affirmé le propriétaire, de nombreux animaux présentaient des entérobactéries productrices de BLSE. Cette propriété se trouve à environ 300 m des premiers bassins et cette forte proximité laisse à penser que ces animaux auraient été contaminés à partir de souches issues de la STEP. Une première hypothèse illustrée par les analyses phylogénétiques dans ce manuscrit serait une diffusion *via* les oiseaux ou des petits mammifères qui gravitent entre les deux sites (**Figures 39 et 65**). Une seconde hypothèse serait une transmission avec les aérosols et un possible dépôt sur les sols du domaine.

Matériel et méthode

Pour vérifier cette seconde hypothèse de bioaérosols émis au sein de la STEP, des prélèvements d'air (n=12) ont été effectués en janvier 2020 à différents points avec la méthode par impaction sur gélose CCA avec et sans antibiotique (ceftriaxone à 4 mg/L ; **Figure S1**). Le volume d'aspiration était réglé à 60 L/min pendant une heure. Les conditions météorologiques pendant chaque campagne (n=4) ont été notées dans le **Tableau S1**. Pour comparer avec un environnement neutre, un prélèvement d'air dans les mêmes conditions a été effectué à chaque campagne sur le site de l'Institut Pasteur. Les échantillons ont ensuite été placés à 4°C pour le transport jusqu'au laboratoire puis mis à incuber à 37°C pendant 24h.

Un échantillonnage du sol de la STEP a été réalisé à la même période en surface (n=24 ; **Figure S1**). Les échantillons ont été placés à 4°C jusqu'au laboratoire, puis 50 g de terre ont été supplémentés de 250 ml d'eau peptonée. Après agitation, 100 µL de la solution ont été étalé sur un milieu CCA simple et CCA supplémenté de ceftriaxone à 4 mg/L puis incubés à 37°C pendant 24h.

Les colonies d'ECC, de KPNC et d'*E. coli* (résistantes ou sensibles aux C3G) ont été clairement identifiées par galerie API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). La sensibilité a été testée en milieu solide Mueller-Hinton pour les antibiotiques suivants (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) : ampicilline (AMP, concentration en antibiotique : 10 µg), amoxicilline-acide clavulanique (AMC, 20 – 10 µg), céfoxitine (FOX, 30 µg), céfotaxime (COX, 5 µg), ceftazidime (CAZ, 10 µg), céfépime (FEP, 30 µg), ertapénème (ETP, 10 µg), acide nalidixique (NAL, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), gentamicine (GMN, 10 µg), amikacine (AKN, 30 µg), tigécycline (TGC, 15 µg), triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT, 1,25 – 23,75 µg). Le protocole de préparation des cultures suivait les recommandations CA-SFM/EUCAST 2018 (http://www.sfm-microbiologie.org).

Tableau S1. Conditions météorologiques lors des prélèvements d'air. Les couleurs de campagne sont associées aux couleurs de la **Figure S1** ; les indications météorologiques proviennent de météo France (https://meteofrance.com/), et l'indice de qualité atmosphérique du site Gwad'Air (www.gwadair.fr) ; la direction et la vitesse du vent par rapport à la STEP de Jarry, ont été récupérées sur le site Windguru (https://www.windguru.cz).

Date	Campagne	Météo	Température	Indice atmosphérique	Vitesse du vent (nœud)	Direction du vent (STEP)
16/01/2020	1		25°C	Bon 3/10	12	←
21/01/2020	2		25°C	Bon 3/10	16	←
23/01/2020	3		25°C	Bon 3/10	11	↖
29/01/2020	4		25°C	Bon 3/10	8	↖

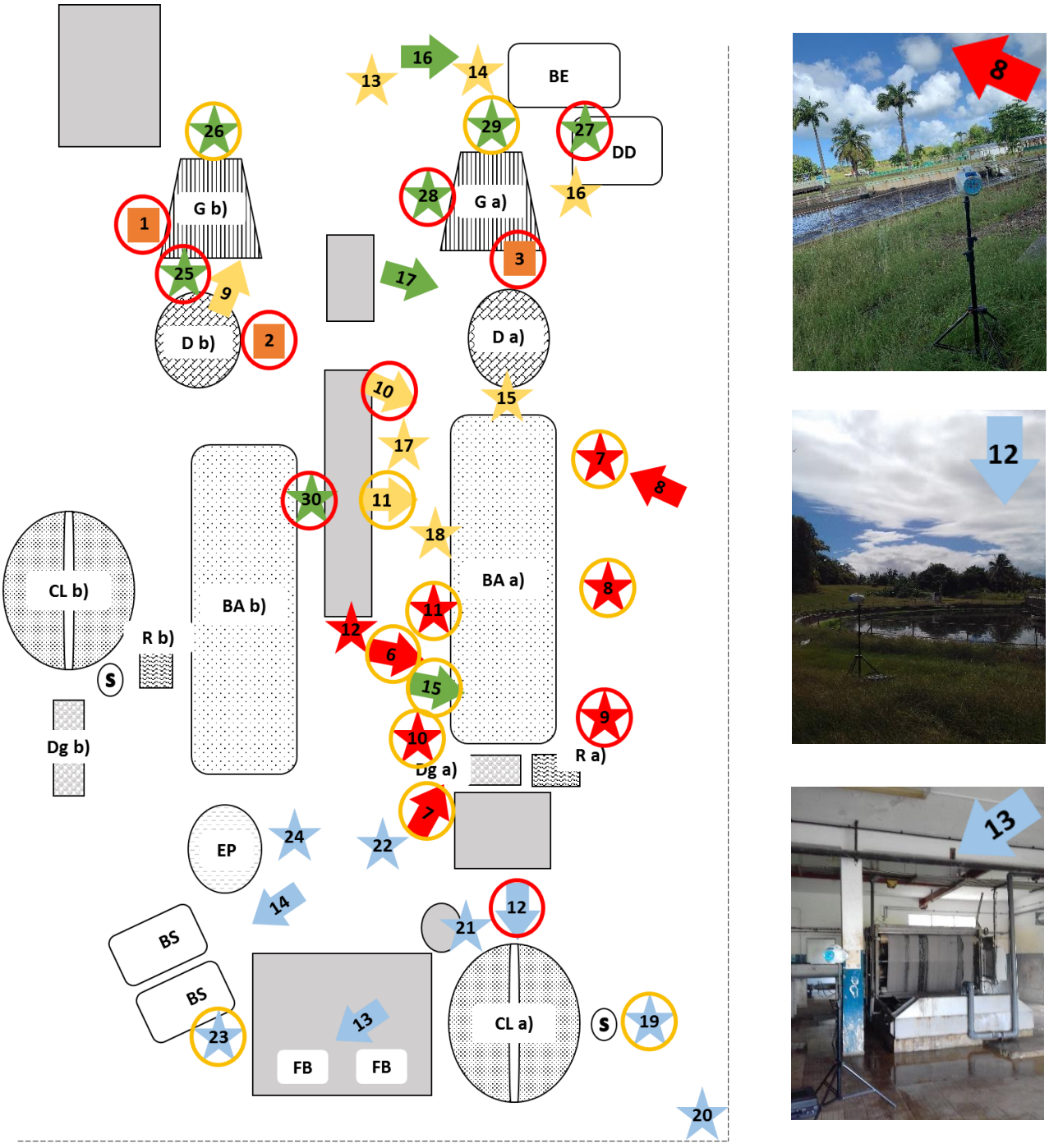


Figure S1. Points de prélèvement de l'air et du sol au sein de la station d'épuration de Jarry Pointe-à-donne.

Légende de la STEP : BE : bassin d'entrée – répartiteur, DD : déchets de dégrilleur (conteneur), G : dégrilleur, D : dégraisseur, BA : bassin d'aération, Dg : dégazeur, R : pompe de recirculation des boues, CL : clarificateur, EP : épaississeur, FB : filtre à bande, S : sortie, BS : boue sèche (conteneur). La STEP est divisée en deux lignes de traitement parallèles a) b). Seule la ligne de traitement a) a été prise en considération dans ce projet

Légende des prélèvements : étoiles : sol, carré : eau stagnante / flaque, flèche : air et direction du préleveur, cercle orange présence des entérobactéries recherchées, cercle rouge souches C3G-R.

Résultats et discussion

La prévalence d'échantillons d'air contenant les germes recherchés était de 50,0% (6/12), tandis que 54,7% (13/24) des échantillons de sol étaient positifs (**Figure S1**). À noter qu'aucun échantillon de contrôle mené à l'Institut Pasteur n'était positif. Cette première observation a souligné le caractère ubiquiste de ces germes. Cependant si l'on se concentre uniquement sur les échantillons présentant des germes C3G-R, seulement 5 échantillons de sols étaient concernés contre 2 échantillons d'air. Au total 9 souches C3G-R ont été identifiées avec une majorité d'ECC (n=5), dont 3 avaient une céphalosporinase hyperproduite.

Les échantillons de sol avec des entérobactéries C3G-R étaient SOL9, SOL25, SOL27, SOL28 et SOL30 (**Figure S1**). Le sol de la station semble donc être souiller par les effluents. On retrouve en effet des germes avec des BLSE directement amputables aux eaux usées et à la pollution anthropique exercée sur le milieu. Parmi ces germes multirésistants, nous avons isolé 3 souches d'ECC, 3 souches de KPNC et 1 souche d'*E. coli.* De plus nous avons pu remarquer que les déchets de dégrilleur renfermaient bien des germes résistants (SOL27) renforçant l'idée d'une contamination des oiseaux et des rats par le contact direct avec ces déchets.

Concernant les points de prélèvement positifs pour l'air, AIR10 et AIR12 présentaient ECC avec une céphalosporinase hyperproduite. Le premier était situé face au bassin d'aération tandis que le second se trouvait face au clarificateur (**Figure S1**). La diffusion de germes résistants dans l'air reste donc envisageable même si la prévalence était faible dans ce petit set de données. Elle serait cependant limitée au site et aux points proches des bassins comme le suggère la vitesse et la direction du vent enregistrées lors des campagnes. Par ailleurs nous nous sommes concentrés sur la résistance aux antibiotiques mais cela n'exclut pas la possibilité de retrouver d'autres espèces de bactéries plus virulentes et des virus qui pourraient affecter les employés travaillant sur la zone. De manière surprenante, aucune bactérie recherchée n'a été trouvée dans le prélèvement AIR13 qui correspondait à un point dans un bâtiment lors du nettoyage des filtres à bandes. Ce nettoyage avait formé une fine brume visible à l'œil nu dans cette espace peu ventilé.

Par ailleurs, 2 prélèvements d'air dirigés vers la station ont été réalisés dans les mêmes conditions fin 2019 au plus près de la ferme voisine (points non présentés). Ils n'avaient pas permis d'isoler de germe C3G-R. Cependant 1 de ces prélèvements renfermait une KPNC sauvage. Sans une approche phylogénétique il nous était cependant difficile d'attribuer un lien direct avec la station. Si l'on garde une hypothèse de diffusion par l'air, la présence et le maintien de germes avec BLSE chez les animaux domestiques prélevés autour de la station pourrait s'expliquer par une contamination ponctuelle et massive seulement lors de vents importants dirigés et d'évènements cycloniques, et probablement moins dans des conditions météorologiques « normales ». Bien entendu, ces observations environnementales ne sont valables que pour cette station et devraient être vérifiées et confirmées sur d'autres sites de l'archipel.

Annexe 6. Expérimentation annexe n°2 : élevage de cafards et suivi du portage d'entérobactéries C3G-R

Contexte et présentation du projet

Au vu du fort taux de résistance au sein de la faune présente à la station et dans les canalisations en amont (cafards), nous avons souhaité approfondir la notion de portage de bactéries C3G-R et savoir si ce dernier était temporaire ou non. Pour ce faire, un test a été effectué sur un lot de cafards prélevés au sein du réseau des eaux usées et gardés en captivité au laboratoire dans un environnement contrôlé. Ces animaux ont été choisis pour leur disponibilité et la forte prévalence d'échantillons positifs aux entérobactéries C3G-R, mais surtout pour la relative facilitée de leur maintien en élevage dans un espace confiné. Leurs fèces ont été prélevés de manière journalière et analysés selon les mêmes modalités que précédemment sur une période de 1 mois. Dans la littérature ce type de suivi pour l'antibiorésistance n'a pas été réalisé selon nos connaissances sur des insectes. Certaines recherches ont été effectuées sur des souris en laboratoire ou sur l'homme. D'autres analyses ont cependant été effectuées comme par exemple la comparaison du microbiote de cafard de l'espèce *P. americana* après différents régimes en captivité. Il semblerait que le microbiome de cette espèce reste relativement stable mais aucune indication n'a été apportée sur la notion de résistance. Des recherches similaires ont été faites sur d'autres espèces de cafards avec des résultats nuancés. Par ailleurs les cafards sont suspectés d'être de potentiels vecteurs mécaniques de certaines infections. Ici, le fait que ces insectes soient isolés dans les canalisations d'eau usées présente plusieurs intérêts. En effet ces animaux sont coprophages et vont se nourrir de nos excréments et divers déchets présents dans ce milieu. Le point de prélèvement est situé juste avant le réseau général à la sortie du CHUG mais nous pouvons émettre l'hypothèse que ces mêmes animaux sont aussi présents en amont du réseau et avec un contact rapproché avec l'homme.

Point important, même si ces germes C3G-R sont retrouvés au sein de cette espèce et dans cet environnement en particulier, ceci ne prouve pas pour autant que l'animal soit un vecteur naturel de ce type d'organisme. Il est donc possible qu'une multiplication de germes C3G-R se fasse au sein de l'animal et qu'ils soient excrétés mais probablement sur un temps court. L'eau usée est un réservoir « non-vivant » d'agents pathogènes et de bactéries résistantes. Dans cette approche nous souhaitions mettre en évidence le fait que les cafards peuvent aussi servir de réservoir pour les germes résistants. Ces insectes pourraient dans ces conditions être perçus comme des sentinelles dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Le but est de savoir après combien de temps dans un environnement neutre les cafards vont excréter des entérobactéries résistantes aux antibiotiques afin de mieux définir cette notion de passage ou de portage.

Matériel et méthode

Capture des cafards

Avant d'entamer l'élevage expérimental des cafards, nous avons effectué une capture par lot au niveau du continuum des eaux usées. Comme pour l'analyse des bactéries résistantes au sein de leur tube digestif, les cafards ont été piégés dans des bouteilles d'eau minérale propres avec un appât alimentaire correspondant aux aliments utilisés pour la suite de l'élevage en laboratoire. Ces bouteilles ont été placées sur un seul regard puis récupérées après 24 h (Site A, **Figure 39**). Seul les adultes ont été conservés. Ils appartenaient tous à l'espèce la plus commune, *Periplaneta americana*.

Captivité au sein du laboratoire

Les cafards ont été étudiés individuellement afin de vérifier si le fait de capturer ces insectes grégaires dans un même point pouvait engendrer une distribution homogène des bactéries résistantes au sein de la population analysée avec une circulation et un partage de clones semblable. Au laboratoire le piège a tout d'abord été rapidement placé au congélateur (-20°C) pendant une période de 3 minutes afin de faciliter la manipulation des insectes lorsque ces derniers sont suffisamment engourdis. Après le tri, les individus non conservés ont été replacés pendant 15 minutes à -20°C afin de les euthanasier, puis ont été éliminés dans les poubelles à DASRI. Les cafards sélectionnés ont ensuite été nettoyés avec un papier imbibé d'eau stérile afin de supprimer les macros-déchets. Les 10 individus conservés ont été placés dans des boites en plastique identiques de 17×7,5×9cm. Elles comportent un couvercle préalablement percé. Etant donné que ces insectes sont lucifuges, la caisse d'élevage a été placée à la pénombre afin de ne pas interférer leur photocycle. L'expérience a débuté en juillet 2019, la température de la pièce était de 25°C en moyenne et l'hygrométrie de 80%. Aucun substrat n'a été placé dans le fond des boites afin de faciliter la récupération des excréments (**Figure S2**).

Entretien

Les cafards sont des insectes peu exigeants en termes de nourriture. Afin de contrôler au mieux les apports et d'éviter une introduction de germes, les insectes ont été nourris avec des croquettes pour lapin préalablement contrôlées (culture sur gélose CCA avec et sans antibiotiques) et légèrement humidifiées avec de l'eau stérile puis placées dans le couvercle d'une boite de pétri stérile (Ø55). À noter que cette nourriture était aussi utilisée au sein du laboratoire d'entomologie de l'Institut pour nourrir les larves de moustiques. L'apport de l'eau a été faite *via* de l'eau stérile gélifiée au laboratoire. Cette eau gélifiée permettait aussi d'apporter une bonne hygrométrie au sein de la boite d'élevage. Le cube gélifié était placé dans le fond de la boite de pétri. Afin de limiter les contaminations par des bactéries externes ou une installation des germes C3G-R (biofilm), le bac en plastique individuel a été nettoyé tous les jours avec de l'éthanol à 70,0% puis rincé avec de l'eau stérile. Avant cette manipulation le cafard a été placé dans un pot à selles stérile et individuel. L'alimentation (1 croquette) et l'apport en eau ont été remplacés lors de cette étape et placés dans un nouveau support stérile. Toutes les manipulations ont été effectuées avec des gants stériles.

Récupération des excréments

Les excréments présentaient généralement une taille ne dépassant pas 2mm. Les matières fécales ont été collectées tous les jours, le plus tôt possible après leur émission et placées au frais dans des tubes eppendorf individuels de 2mL. Tout le reste des feces était récupéré avant l'étape de nettoyage du bac et poolé avec les prélèvements du jour pour chaque insecte (émissions inégales entre individu). Afin de se rapprocher au mieux du protocole d'analyse sur les échantillons isolés au sein de la STEP une étape d'enrichissement à systématiquement été réalisée en ajoutant 2mL d'eau peptonée. Les mélanges ont ensuite été vortexés et placés dans l'étuve à 37°C pour un enrichissement pendant 18 à 24h. Les excréments ont été récupérés et techniqués de la façon suivante : tous les jours les 2 premières semaines. Puis à J18, J21, J24 et J27 et J30 (le lavage était fait systématiquement tous les jours). En fin de manipulation (J37) les cafards ont été euthanasiés et disséqués.

Culture et isolement des bactéries d'intérêt

Après l'enrichissement, 100 µL de la solution ont été étalés sur un milieu CCA simple servant de témoin et CCA supplémenté de ceftriaxone à 4 mg/L puis incubés à 37°C pendant 24h. Contrairement aux précédentes analyses nous nous sommes concentrés sur l'ensemble des entérobactéries C3G-R afin d'être le plus représentatif possible. Les colonies présomptives se développant sur CCA supplémentée d'antibiotique ont été identifiées par galerie API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). La sensibilité aux antibiotiques suivants en milieu solide a ensuite été testées (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) : ampicilline (AMP, concentration en antibiotique : 10 µg), amoxicilline-acide clavulanique (AMC, 20 – 10 µg), céfoxitine (FOX, 30 µg), céfotaxime (COX, 5 µg), ceftazidime (CAZ, 10 µg), céfépime (FEP, 30 µg), ertapénème (ETP, 10 µg), acide nalidixique (NAL, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), gentamicine (GMN, 10 µg), amikacine (AKN, 30 µg), tigécycline (TGC, 15 µg), triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT, 1,25 – 23,75 µg). Le protocole de préparation des cultures suivait les recommandations CA-SFM/EUCAST 2018 (http://www.sfm-microbiologie.org).



Figure S2. Illustrations du petit élevage de cafards.

Résultats et discussion

L'analyse en captivité de cafards a été une expérience très chronophage (nettoyage des cages individuelles tous les jours). De ce fait nous nous sommes restreints à seulement 15 individus pour ce premier test. Malheureusement, le protocole serait à améliorer car 6 d'entre eux ne sont pas arrivés au terme de l'expérience. Les résultats suivant ont donc été obtenus sur les 9 cafards restant.

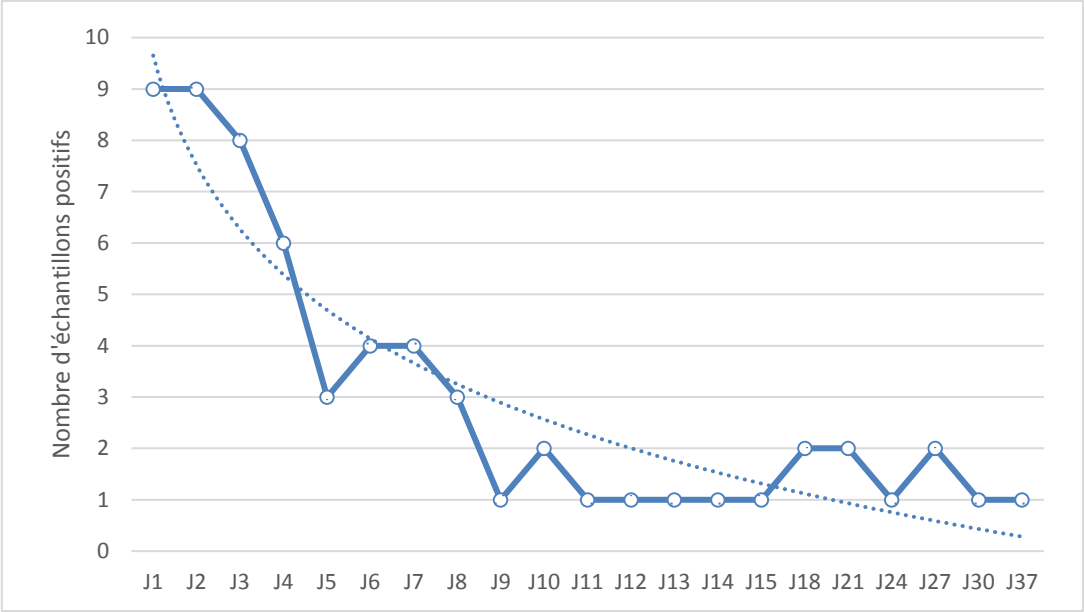


Figure S3. Nombre de cafards présentant une entérobactérie C3G-R au cours du temps.

Des souches C3G-R ont été isolées sur l'ensemble des individus les 2 premiers jours. Le portage a ensuite diminué progressivement pour finir à 1 cafard à J37 présentant une souche d'ECC BLSE (**Figure S3**). Au total 92 souches d'entérobactéries C3G-R ont été analysées tout au long de l'expérimentation. Parmi les espèces isolées il y avait : *Citrobacter braakii, C. freundii, E. aerogenes, E. cloacae* complex, *E. coli, Hafnia alvei* et *K. pneumoniae* complex. Une nouvelle espèce de *Kluyvera* a aussi été isolée et sera décrite prochainement. La diversité au sein d'un même échantillon était de 4 espèces différentes en moyenne la première semaine pour se réduire à 2 espèces dès la deuxième semaine.

Bien que cette analyse ait été fortement limitée par le nombre d'individus analysés, nous avons tout de même pu remarquer une nette diminution du nombre de cafards porteurs de souches résistantes lorsque l'environnement dans lequel ils évoluaient n'était plus soumis à une quelconque pression ou pollution anthropique. Cette observation semble indiquer que le portage d'entérobactéries productrices de BLSE ne serait que transitoire chez ces insectes. Une comparaison avec des insectes isolés dans des environnements non pollués pourrait appuyer cette hypothèse.

Par ailleurs, cette première analyse restait limitée sur un point. En effet nous ne pouvions pas savoir si la diminution de l'excrétion de germes résistants est due à :

1) Une perte des plasmides de résistances pour les entérobactéries analysées. Dans cette première hypothèse les bactéries seraient toujours présentes mais n'auraient plus un phénotype multirésistant.

2) Une perte des souches résistantes. Dans cette seconde hypothèse la bactérie ne serait plus présente (sensible ou résistante).

Ceci ne pouvait malheureusement pas être clairement vérifié en l'état puisque aucun séquençage n'a été réalisé pour savoir si en parallèle des souches résistantes les isolats retrouvés sur la gélose témoin sans antibiotiques étaient les mêmes ou non. La diminution rapide des insectes présentant des souches C3G-R est une information positive à prendre en considération et à vérifier pour d'autres animaux plus complexes. En effet ceci suppose que si des améliorations importantes sont mises en place en amont pour limiter la diffusion de souches multirésistantes dans les eaux usées, la dynamique de portage pendant une longue période de ces germes au sein de la faune sauvage se retrouverait grandement limitée. Il y aurait donc un phénomène de résilience.

REFERENCES

INSTITUT PASTEUR

1. Organisation mondiale de la Santé (OMS), Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et Organisation mondiale de la Santé animale (OIE). 2020. Note d'orientation technique relative à l'eau, l'assainissement et l'hygiène et la gestion des eaux usées pour prévenir les infections et réduire la propagation de la résistance aux antimicrobiens. 1-32.

2. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. 2020. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 32(4):1-32.

3. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. 2020. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 18:344-59.

4. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 19:37-54.

5. Hölzel CS, Tetens JL, Schwaiger K. 2018. Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: a need for quantitative risk assessment. Foodborne Pathog Dis. 15(11):671–688.

6. Nadimpalli ML, Vuthy Y, de Lauzanne A, Fabre L, Criscuolo A, Gouali M, *et al*. 2019. Meat and fish as sources of extended-spectrum *β*-Lactamase–producing *Escherichia coli*, Cambodia. Emerg Infect Dis. 25(1):126-31

7. Nadimpalli ML, Stegger M, Viau R, Yith V, de Lauzanne A, Sem N, *et al*. 2021. Leakiness at the human-animal interface in Southeast Asia and implications for the spread of antibiotic resistance. Preprint. 1-24.

8. Wyres KL, Holt KE. 2018. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. Curr Opin Microbiol. 45:131-9.

9. Abraham EP, Chain E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Rev Infect Dis. 10(4):677-8.

10. Stedt J, Bonnedahl J, Hernandez J, Mcmahon BJ, Hasan B, Olsen B, *et al*. 2014. Antibiotic resistance patterns in *Escherichia* coli from gulls in nine European countries. Infect Ecol Epidemiol. 1(4):1-10.

11. Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ. 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. Appl Environ Microbiol. 71(6): 3041-8.

12. Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. 2013. The role of flies in spreading the extended-spectrum *β*-lactamase gene from cattle. Microb Drug Resist. 19(5):415–20.

13. Guyomard-Rabenirina S, Malespine J, Ducat C, Sadikalay S, Falord M, Harrois D, *et al*. 2016. Temporal trends and risks factors for antimicrobial resistant *Enterobacteriaceae* urinary isolates from outpatients in Guadeloupe. BMC Microbiol. 16(1):1-8.

14. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. 2017. Global epidemiology of CTX-M *β*-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. J Antimicrob Chemother. 72(8):2145-55.

15. Raven KE, Ludden C, Gouliouris T, Blane B, Naydenova P, Brown NM, *et al*. 2019. Genomic surveillance of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants as

an indicator of clinically relevant pathogens and their resistance genes. Microb Genom. 5(5):e000267.

16. Goulas A, Belhadi D, Descamps A, Andremont A, Benoit P, Courtois S, *et al.* 2020. How effective are strategies to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment ? A systematic review. 9(4):1-32.

17. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA. 92(5):1664–8.

18. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, *et al*. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med. 308(12):681-5.

19. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, *et al.* 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). Arch Microbiol. 193(12):883-91.

20. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, *et al.* 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol. 41(11):4930-40.

21. von Mentzer A, Blackwell GA, Pickard D, Boinett CJ, Joffré E, Page AJ, *et al.* 2021. Long-read-sequenced reference genomes of the seven major lineages of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) circulating in modern time. Sci Rep. 11(1):9256.

22. Jønsson R, Struve C, Boll EJ, Boisen N, Joensen KG, Sørensen CA, *et al.* 2017. A novel pAA virulence plasmid encoding toxins and two distinct variants of the fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli*. Front Microbiol. 8:263.

23. Pilla G, McVicker G, Tang CM. 2017. Genetic plasticity of the *Shigella* virulence plasmid is mediated by intra- and inter-molecular events between insertion sequences. PLoS Genet. 13(9):e1007014.

24. O'Brien CL, Bringer MA, Holt KE, Gordon DM, Dubois AL, Barnich N, *et al.* 2017. Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. Gut. 66(8):1382-9.

25. Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. 2015. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. J Clin Microbiol. 53(8):2410-26.

26. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 5(1):58-65.

27. Stoppe NC, Silva JS, Carlos C, Sato MIZ, Saraiva AM, Ottoboni LMM, *et al.* 2017. Worldwide phylogenetic group patterns of *Escherichia coli* from commensal human and wastewater treatment plant isolates. Front Microbiol. 21;8:2512.

28. Guyomard-Rabenirina S, Dartron C, Falord M, Sadikalay S, Ducat C, Richard V, *et al.* 2017. Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. PLoS One. 12(3):e0173155.

29. Zhi S, Banting G, Li Q, Edge TA, Topp E, Sokurenko M, *et al.* 2016. Evidence of naturalized stress-tolerant strains of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants. Appl Environ Microbiol. 82(18):5505-18.

30. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, *et al.* 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect Immun. 67(2):546-53.

31. Ludden C, Raven KE, Jamrozy D, Gouliouris T, Blane B, Coll F, *et al.* 2019. One Health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. mBio. 10(1):e02693-18.

32. Höfle U, Jose Gonzalez-Lopez J, Camacho MC, Solà-Ginés M, Moreno-Mingorance A, Manuel Hernández J, *et al.* 2020. Foraging at solid urban waste disposal sites as risk factor for cephalosporin and colistin resistant *Escherichia coli* carriage in white storks (*Ciconia ciconia*). Front Microbiol. 11:1397.

33. Clermont O, Gordon D, Denamur E. 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. Microbiology (Reading). 161(Pt 5):980-8.

34. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, *et al.* 2013. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. J Infect Dis. 207(6):919-28.

35. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, *et al.* 2017. Development of a web tool for *Escherichia coli* subtyping based on *fimH* alleles. J Clin Microbiol. 55(8):2538-43.

36. Ludden C, Decano AG, Jamrozy D, Pickard D, Morris D, Parkhill J, *et al.* 2020. Genomic surveillance of *Escherichia coli* ST131 identifies local expansion and serial replacement of subclones. Microb Genom. 6(4):e000352.

37. Pitout JDD, Finn TJ. 2020. The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. Infect Genet Evol. 81:104265.

38. Johnson TJ, Danzeisen JL, Youmans B, Case K, Llop K, Munoz-Aguayo J, *et al.* 2016. Separate F-type plasmids have shaped the evolution of the H30 subclone of *Escherichia coli* sequence type 131. mSphere. 1(4):e00121-16.

39. Santé publique France. 2021. GEODES. Available from: https://geodes.santepubliquefrance.fr [Accessed Jan 2, 2021].

40. Peirano G, Pitout JDD. 2019. Extended-spectrum *β*-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: update on molecular epidemiology and treatment options. Drugs. 79(14):1529-41.

41. Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Hawkey PM, Murray AK, *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). Environ Int. 114:326-33.

42. Runcharoen C, Raven KE, Reuter S, Kallonen T, Paksanont S, Thammachote J, *et al.* 2017. Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. Genome Med. 9(1):81.

43. Guyomard-Rabenirina S, Reynaud Y, Pot M, Albina E, Couvin D, Ducat C, *et al.* 2020. Antimicrobial resistance in wildlife in Guadeloupe (French West Indies): distribution of a single *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$/IncI1/ST3 plasmid among humans and wild animals. Front Microbiol. 11:1524.

44. Pires J, Taracila M, Bethel CR, Doi Y, Kasraian S, Tinguely R, *et al.* 2015. *In vivo* evolution of CMY-2 to CMY-33 *β*-lactamase in *Escherichia coli* sequence type 131: characterization of an acquired extended-spectrum AmpC conferring resistance to cefepime. Antimicrob Agents Chemother. 59(12):7483-8.

45. Livermore DM, Day M, Cleary P, Hopkins KL, Toleman MA, Wareham DW, *et al.* 2019. OXA-1 *β*-lactamase and non-susceptibility to penicillin/*β*-lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 74(2):326-33.

46. Eger E, Heiden SE, Korolew K, Bayingana C, Ndoli JM, Sendegeya A, *et al.* 2021. Circulation of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* of pandemic sequence types 131, 648, and 410 among hospitalized patients, caregivers, and the community in Rwanda. Front Microbiol. 12:662575.

47. Hernández J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, *et al*. 2012. Human-associated extended-spectrum *β*-lactamase in the Antarctic. Appl Environ Microbiol. 78(6):2056-8.

48. Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, Morach M, Zihler Berner A, Hächler H, Stephan R. 2015. Extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. Appl Environ Microbiol. 81(9):3115-20.

49. Finn TJ, Scriver L, Lam L, Duong M, Peirano G, Lynch T, *et al.* 2020. A comprehensive account of *Escherichia coli* sequence type 131 in wastewater reveals an abundance of fluoroquinolone-resistant clade A strains. Appl Environ Microbiol. 86(4):e01913-9.

50. van den Bunt G, Fluit AC, Spaninks MP, Timmerman AJ, Geurts Y, Kant A, *et al.* 2020. Faecal carriage, risk factors, acquisition and persistence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dogs and cats and co-carriage with humans belonging to the same household. J Antimicrob Chemother. 75(2):342-50.

51. Johnson JR, Davis G, Clabots C, Johnston BD, Porter S, DebRoy C, *et al.* 2016. Household clustering of Escherichia coli sequence type 131 clinical and fecal isolates according to whole genome sequence analysis. Open Forum Infect Dis.3(3):ofw129.

52. Schaufler K, Semmler T, Wieler LH, Wöhrmann M, Baddam R, Ahmed N, *et al.* 2016. Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410 - another successful pandemic clone? FEMS Microbiol Ecol. 92(1):fiv155.

53. Ahlstrom CA, Bonnedahl J, Woksepp H, Hernandez J, Reed JA, Tibbitts L, *et al.* 2019. Satellite tracking of gulls and genomic characterization of faecal bacteria reveals environmentally mediated acquisition and dispersal of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on the Kenai Peninsula, Alaska. Mol Ecol. 28(10):2531-45.

54. Matsumura Y, Pitout JD, Gomi R, Matsuda T, Noguchi T, Yamamoto M, *et al.* 2016. Global *Escherichia coli* sequence type 131 clade with *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ gene. Emerg Infect Dis. 22(11):1900-7.

55. Touchon M, Perrin A, de Sousa JAM, Vangchhia B, Burn S, O'Brien CL, *et al.* 2020. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli.* PLoS Genet. 16(6):e1008866.

56. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. J Appl Microbiol. 123(3):570-81.

57. Gomi R, Matsuda T, Matsui Y, Yoneda M. 2014. Fecal source tracking in water by next-generation sequencing technologies using host-specific *Escherichia coli* genetic markers. Environ Sci Technol. 48(16):9616-23.

58. Pot M. 2017. *Anolis* réservoir de souches d'*Enterobacter cloacae* complex multi-résistantes ?

59. Hoffmann H, Roggenkamp A. 2003. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae.* Appl Environ Microbiol. 69(9):5306-18.

60. Garinet S, Fihman V, Jacquier H, Corvec S, Le Monnier A, Guillard T, *et al.* 2018. Elective distribution of resistance to beta-lactams among *Enterobacter cloacae* genetic clusters. J Infect. 77(3):178-82.

61. Zhou K, Yu W, Cao X, Shen P, Lu H, Luo Q, *et al.* 2018. Characterization of the population structure, drug resistance mechanisms and plasmids of the community-associated *Enterobacter cloacae* complex in China. J Antimicrob Chemother. 73(1):66-76.

62. Morand PC, Billoet A, Rottman M, Sivadon-Tardy V, Eyrolle L, Jeanne L, *et al.* 2009. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. J Clin Microbiol. 47(8):2489-95.

63. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. Syst Appl Microbiol. 36(5):309-19.

64. Beyrouthy R, Barets M, Marion E, Dananché C, Dauwalder O, Robin F, *et al.* 2018. Gauthier L, Jousset A, Dortet L, Guérin F, Bénet T, Cassier P, Vanhems P, Bonnet R. Novel *Enterobacter* lineage as leading cause of nosocomial outbreak involving carbapenemase-producing strains. Emerg Infect Dis. 24(8):1505-15.

65. Ji Y, Wang P, Xu T, Zhou Y, Chen R, Zhu H, *et al*. 2021. Development of a one-step multiplex PCR assay for differential detection of four species (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter roggenkampii*, and *Enterobacter kobei*) belonging to *Enterobacter cloacae* complex with clinical significance. Front Cell Infect Microbiol. 11:677089.

66. Li Y, Huang J, Wang X, Xu C, Han T, Guo X. 2020. Genetic characterization of the O-antigen and development of a molecular serotyping scheme for *Enterobacter cloacae*. Front Microbiol.11:727.

67. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. 2013. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. PLoS One. 8(6):e66358.

68. Vogt S, Löffler K, Dinkelacker AG, Bader B, Autenrieth IB, Peter S, *et al.* 2019. Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopy for typing of clinical *Enterobacter cloacae* complex isolates. Front Microbiol. 10:2582.

69. Sutton GG, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE. 2018. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. F1000Res. 7:521.

70. Wu W, Feng Y, Zong Z. 2020. Precise species identification for *Enterobacter*: a genome sequence-based study with reporting of two novel species, *Enterobacter quasiroggenkampii* sp. nov. and *Enterobacter quasimori* sp. nov. mSystems. 5(4):e00527-20.

71. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics. 14:60.

72. Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. 2016. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol. 66(2):1100-3.

73. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, *et al.* 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol. 68(1):461-6.

74. Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. 197(8):1079-81.

75. Steffen G, Pietsch M, Kaase M, Gatermann S, Werner G, Fuchs S, *et al.* 2019. Overestimation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in Germany, 2015. Pediatr Infect Dis J. 38(6):631-7.

76. Girlich D, Ouzani S, Emeraud C, Gauthier L, Bonnin RA, Sache N Le, *et al.* 2021. Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic shock deaths in newborns : a cohort study. lancet Microbe. 5247(21):1–9.

77. Paauw A, Caspers MP, Schuren FH, Leverstein-van Hall MA, Delétoile A, Montijn RC, *et al.* 2008. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. PLoS One. 3(8):e3018.

78. Siebor E, de Curraize C, Neuwirth C. 2019. Identification of AGI1-A, a variant of *Acinetobacter* genomic island 1 (AGI1), in a French clinical isolate belonging to the *Enterobacter cloacae* complex. J Antimicrob Chemother. 74(2):311-4.

79. Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJ, Carmeli Y, *et al.* 2015. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob

Chemother. 70(1):48-56.

80. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2015. Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 81(4):264-8.

81. Pati NB, Doijad SP, Schultze T, Mannala GK, Yao Y, Jaiswal S, *et al.* 2018. *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. Sci Rep. 8(1):5392.

82. Haenni M, Saras E, Ponsin C, Dahmen S, Petitjean M, Hocquet D, *et al.* 2016. High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. J Antimicrob Chemother. 71(6):1497-500.

83. Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Kajino A, *et al.* 2017. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Enterobacter* spp. isolates from companion animals in Japan. PLoS One. 12(3):e0174178.

84. Goldberg DW, Fernandes MR, Sellera FP, Costa DGC, Loureiro Bracarense AP, Lincopan N. 2019. Genetic background of CTX-M-15-producing *Enterobacter hormaechei* ST114 and *Citrobacter freundii* ST265 co-infecting a free-living green turtle (*Chelonia mydas*). Zoonoses Public Health. 66(5):540-45.

85. Haenni M, Métayer V, Jarry R, Drapeau A, Puech MP, Madec JY, *et al*. 2020. Wide spread of *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$/*mcr-9* IncHI2/ST1 plasmids and CTX-M-9-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* in Rescued Wild Animals. Front Microbiol. 11:601317.

86. Daniels JB, Chen L, Grooters SV, Mollenkopf DF, Mathys DA, Pancholi P, *et al.* 2018. *Enterobacter cloacae* complex sequence type 171 isolates expressing KPC-4 carbapenemase recovered from canine patients in Ohio. Antimicrob Agents Chemother. 62(12):e01161-18.

87. Wang C, Wu W, Wei L, Feng Y, Kang M, Xie Y, *et al*. 2020. *Enterobacter wuhouensis* sp. nov. and *Enterobacter quasihormaechei* sp. nov. recovered from human sputum. Int J Syst Evol Microbiol. 70(2):874-81.

88. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, *et al.* 2017. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. Clin Infect Dis. 65(2):208-15.

89. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo TA, Criscuolo A, Brisse S. 2019. Description of *Klebsiella africanensis* sp. nov., *Klebsiella variicola* subsp. *tropicalensis* subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov. Res Microbiol. 170(3):165-70.

90. Huynh BT, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo T, Kerleguer A, Hennart M, *et al.* 2020. *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors. Gut Microbes.11(5):1287-99.

91. Thorpe H, Booton R, Kallonen T, Gibbon MJ, Couto N, Passet V, *et al.* 2021. One Health or three ? Transmission modelling of *Klebsiella* isolates reveals ecological barriers to transmission between humans, animals and the environment. Preprint. 1-34.

92. Ludden C, Moradigaravand D, Jamrozy D, Gouliouris T, Blane B, Naydenova P, *et al.* 2020. A One Health study of the genetic relatedness of *Klebsiella pneumoniae* and their mobile elements in the East of England. Clin Infect Dis. 70(2):219-26.

93. Brilhante M, Gobeli Brawand S, Endimiani A, Rohrbach H, Kittl S, Willi B, *et al.* 2021. Two high-risk clones of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* that cause infections in pets and are present in the environment of a veterinary referral hospital. J Antimicrob Chemother. 76(5):1140-9.

94. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. 2021. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. Nat Commun. 12(1):4188.

95. Brisse S, Verhoef J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. Int J Syst Evol Microbiol. 51(Pt 3):915-24.

96. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, *et al.* 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA. 112(27):E3574-81.

97. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, *et al.* 2013. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. J Clin Microbiol. 51(12):4073-8.

98. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, *et al.* 2016. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. Microb Genom. 2(8):e000073.

99. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. 2018. Kaptive Web: user-friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. J Clin Microbiol. 56(6):e00197-18.

100. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 43(8):4178-82.

101. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, *et al.* 2014. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. Emerg Infect Dis. 20(11):1812-20.

102. Bridel S, Watts SC, Judd LM, Harshegyi T, Passet V, Rodrigues C, *et al.* 2021. *Klebsiella* MALDI TypeR: a web-based tool for *Klebsiella i*dentification based on MALDI-TOF mass spectrometry. Res Microbiol. 172(4-5):103835.

103. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, *et al.* 2006. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. Proc Natl Acad Sci USA. 103(44):16502-7.

104. Marsh JW, Mustapha MM, Griffith MP, Evans DR, Ezeonwuka C, Pasculle AW, *et al.* 2019. Evolution of outbreak-causing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 at a tertiary care hospital over 8 years. mBio. 10(5):e01945-19.

105. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, *et al.* 2018. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. Microb Genom. 4(9):e000196.

106. Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, *et al.* 2018. Tracking key virulence *loci* encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in

Klebsiella pneumoniae. Genome Med. 10(1):77.

107. Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, *et al.* 2018. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. J Clin Microbiol. 56(9):e00776-18.

108. Chung DR, Lee H, Park MH, Jung SI, Chang HH, Kim YS, *et al.* 2012. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31(4):481-6.

109. Cheng HY, Chen YS, Wu CY, Chang HY, Lai YC, Peng HL. 2010. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. J Bacteriol. 192(12):3144-58.

110. Heinz E, Brindle R, Morgan-McCalla A, Peters K, Thomson NR. 2019. Caribbean multi-centre study of *Klebsiella pneumoniae*: whole-genome sequencing, antimicrobial resistance and virulence factors. Microb Genom. 5(5):e000266.

111. Bastian S, Nordmann P, Creton E, Malpote E, Thiery G, Martino F, *et al.* 2015. First case of NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Caribbean islands. Int J Infect Dis. 34:53-4.

112. Runcharoen C, Moradigaravand D, Blane B, Paksanont S, Thammachote J, Anun S, *et al.* 2017. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. Genome Med. 24;9(1):6.

113. Cotton MF, Wasserman E, Pieper CH, Theron DC, van Tubbergh D, Campbell G, *et al.* 2000. Invasive disease due to extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: the possible role of cockroaches. J Hosp Infect. 44(1):13-7.

114. Wintachai P, Naknaen A, Thammaphet J, Pomwised R, Phaonakrop N, Roytrakul S, *et al.* 2020. Characterization of extended-spectrum-*β*-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* phage KP1801 and evaluation of therapeutic efficacy *in vitro* and *in vivo*. Sci Rep. 10(1):11803.

115. Jousset AB, Bonnin RA, Rosinski-Chupin I, Girlich D, Cuzon G, Cabanel N, *et al.* 2018. A 4.5-year within-patient evolution of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* sequence type 258. Clin Infect Dis. 67(9):1388-94.

116. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, Chan EW, *et al.* 2018. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. Lancet Infect Dis. 18(1):37-46.

117. Liu YC, Cheng DL, Lin CL. 1986. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. Arch Intern Med. 146(10):1913-6.

118. Chen YC, Lin CH, Chang SN, Shi ZY. 2000. Epidemiology and clinical outcome of pyogenic liver abscess: an analysis from the National Health Insurance Research Database of Taiwan, 2000-2011. J Microbiol Immunol Infect. 49(5):646-53.

119. Piednoir P, Clarac U, Rolle A, Bastian S, Gruel G, Martino F, *et al.* 2020. Spontaneous community-acquired bacterial meningitis in adults admitted to the intensive care units in the Caribbean French West Indies: unusual prevalence of *Klebsiella pneumonia*. Int J Infect Dis. 100:473-5.

120. Wright GD. 2010. Q&A: antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? BMC Biol. 8:123.

121. Spyrou MA, Keller M, Tukhbatova RI, Scheib CL, Nelson EA, Andrades Valtueña A, *et al.* 2019. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. Nat Commun. 10(1):4470.

122. Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Infect Dis. 42 Suppl 1:S25-34.

123. Bush K, Bradford PA. 2016. *β*-lactams and *β*-lactamase inhibitors: an overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 6(8):a025247.

124. Flensburg J, Sköld O. 1987. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. Eur J Biochem. 162(3):473-6.

125. Saga T, Yamaguchi K. 2009. History of antimicrobial agents and resistant. J Japan Med Assoc. 137(3):103–8.

126. Shen Y, Zhou H, Xu J, Wang Y, Zhang Q, Walsh TR, *et al.* 2018. Anthropogenic and environmental factors associated with high incidence of *mcr-1* carriage in humans across China. Nat Microbiol. 3(9):1054-62.

127. van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, *et al.* 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci USA. 112(18):5649-54.

128. Nelson RE, Hatfield KM, Wolford H, Samore MH, Scott RD, Reddy SC, *et al.* 2021. National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States. Clin Infect Dis. 72(Suppl 1):S17-S26.

129. Organisation mondiale de la Santé. 2015. Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. 1-32

130. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé. 2016. Liste des antibiotiques critiques - Actualisation 2015. 1-13.

131. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54(3):969-76.

132. Mack AR, Barnes MD, Taracila MA, Hujer AM, Hujer KM, Cabot G, *et al.* 2020. A standard numbering scheme for class C *β*-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 64(3):e01841-19.

133. Thiolas A, Bornet C, Davin-Régli A, Pagès JM, Bollet C. 2004. Resistance to imipenem, cefepime, and cefpirome associated with mutation in Omp36 osmoporin of *Enterobacter aerogenes*. Biochem Biophys Res Commun. 317(3):851-6.

134. Wong MH, Chan EW, Chen S. 2015. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 59(6):3290-7.

135. Edgar R, Bibi E. 1997. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. J Bacteriol.179(7):2274-80.

136. Arredondo-Alonso S, Top J, Corander J, Willems RJL, Schürch AC. 2021. Mode and

dynamics of vanA-type vancomycin resistance dissemination in Dutch hospitals. Genome Med. 13(1):9.

137. Kieffer N, Royer G, Decousser JW, Bourrel AS, Palmieri M, Ortiz De La Rosa JM, *et al.* 2019. *mcr-9*, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. Antimicrob Agents Chemother. 63(9):e00965-19.

138. Stock I, Grüger T, Wiedemann B. 2001. Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. Int J Antimicrob Agents. 18(6):537-45.

139. World Health Organization. 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available from: https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed [Accessed Feb 2, 2020].

140. Desvars-Larrive A, Ruppitsch W, Lepuschitz S, Szostak MP, Spergser J, Feßler AT, *et al.* 2019. Urban brown rats (*Rattus norvegicus*) as possible source of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and meticillin-resistant *Staphylococcus* spp., Vienna, Austria, 2016 and 2017. Euro Surveill. 24(32):1900149.

141. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. Antimicrob Agents Chemother. 49(8):3523-5.

142. Jacoby GA. 2009. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 22(1):161-82.

143. Mizrahi A, Delerue T, Morel H, Le Monnier A, Carbonnelle E, Pilmis B, *et al.* 2020. Infections caused by naturally AmpC-producing *Enterobacteriaceae*: can we use third-generation cephalosporins? A narrative review. Int J Antimicrob Agents. 55(2):105834.

144. Guérin F, Isnard C, Cattoir V, Giard JC. 2015. Complex regulation pathways of AmpC-mediated *β*-Lactam resistance in *Enterobacter cloacae* complex. Antimicrob Agents Chemother. 59(12):7753-61.

145. Goldstein FW. 2002. Cephalosporinase induction and cephalosporin resistance: a longstanding misinterpretation. Clin Microbiol Infect. 8(12):823-5.

146. Livermore DM, Yang YJ. 1987. Beta-lactamase lability and inducer power of newer beta-lactam antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 155(4):775-82.

147. Kaneko K, Okamoto R, Nakano R, Kawakami S, Inoue M. 2005. Gene mutations responsible for overexpression of AmpC beta-lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. J Clin Microbiol. 43(6):2955-8.

148. Gravey F, Cattoir V, Ethuin F, Fabre L, Beyrouthy R, Bonnet R, *et al.* 2020. ramR deletion in an *Enterobacter hormaechei* isolate as a consequence of therapeutic failure of key antibiotics in a long-term hospitalized patient. Antimicrob Agents Chemother. 64(10):e00962-20.

149. Yang X, Zeng J, Zhou Q, Yu X, Zhong Y, Wang F, *et al.* 2020. Elevating nagZ improves resistance to *β*-lactam antibiotics *via* Promoting AmpC *β*-Lactamase in *Enterobacter cloacae*. Front Microbiol. 11:586729.

150. Kohlmann R, Bähr T, Gatermann SG. 2018. Species-specific mutation rates for ampC

derepression in *Enterobacterales* with chromosomally encoded inducible AmpC *β*-lactamase. J Antimicrob Chemother. 73(6):1530-6.

151. Vogwill T, MacLean RC. 2015. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. Evol Appl. 8(3):284-95.

152. Torrens G, Sánchez-Diener I, Jordana-Lluch E, Barceló IM, Zamorano L, Juan C, *et al.* 2019. *In vivo* validation of peptidoglycan recycling as a target to disable AmpC-mediated resistance and reduce virulence enhancing the cell-wall-targeting immunity. J Infect Dis. 220(11):1729-37.

153. Burdet C, Grall N, Linard M, Bridier-Nahmias A, Benhayoun M, Bourabha K, *et al.* 2019. Ceftriaxone and cefotaxime have similar effects on the intestinal microbiota in human volunteers treated by standard-dose regimens. Antimicrob Agents Chemother. 63(6):e02244-18.

154. Kohlmann R, Bähr T, Gatermann SG. 2019. Effect of ampC derepression on cefepime MIC in *Enterobacterales* with chromosomally encoded inducible AmpC *β*-lactamase. Clin Microbiol Infect. 25(9):1158.

155. Livermore DM, Brown DF, Quinn JP, Carmeli Y, Paterson DL, Yu VL. 2004. Should third-generation cephalosporins be avoided against AmpC-inducible *Enterobacteriaceae*? Clin Microbiol Infect. 10(1):84-5.

156. Babouee Flury B, Ellington MJ, Hopkins KL, Turton JF, Doumith M, Loy R, *et al.* 2016. Association of novel nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in ampD with cephalosporin resistance and phylogenetic variations in ampC, ampR, ompF, and ompC in *Enterobacter cloacae* isolates that are highly resistant to carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 60(4):2383-90.

157. Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. 2003. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 47(2):755-8.

158. Neubauer S, Madzgalla S, Marquet M, Klabunde A, Büttner B, Göhring A, *et al.* 2020. A genotype-phenotype correlation study of SHV *β*-lactamases offers new insight into SHV resistance profiles. Antimicrob Agents Chemother. 64(7):e02293-19.

159. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. 2016. A review of SHV extended-spectrum *β*-lactamases: neglected yet ubiquitous. Front Microbiol. 7:1374.

160. Haeggman S, Löfdahl S, Burman LG. 1997. An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. Antimicrob Agents Chemother. 41(12):2705-9.

161. Jacquier H, Marcadé G, Raffoux E, Dombret H, Woerther PL, Donay JL, *et al.* 2013. *In vivo* selection of a complex mutant TEM (CMT) from an inhibitor-resistant TEM (IRT) during ceftazidime therapy. J Antimicrob Chemother. 68(12):2792-6.

162. Clasen J, Birkegård AC, Græsbøll K, Folkesson A. 2019. Evolution of TEM-type extended-spectrum *β*-lactamases in *Escherichia coli* by cephalosporins. J Glob Antimicrob Resist. 19:32-9.

163. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrob Agents Chemother. 37(8):1637-44.

164. Cholley P, Hocquet D, Alauzet C, Cravoisy-Popovic A, Talon D, Aissa N, *et al.* 2010. Hospital outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. J Med Microbiol. 59(Pt 7):866-9.

165. Mulvey MR, Boyd DA, Baker L, Mykytczuk O, Reis EM, Asensi MD, *et al.* 2004. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar *agona* strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase ($bla_{\text{OXA-53}}$) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac(6')-I30*]. J Antimicrob Chemother. 54(2):354-9.

166. Mughini-Gras L, Dorado-García A, van Duijkeren E, van den Bunt G, Dierikx CM, Bonten MJM, *et al.* 2019. Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing *β*-lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. Lancet Planet Health. 3(8):357-69.

167. Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. 2016. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk factors among healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 63(3):310-8.

168. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. 2013. CTX-M-type *β*-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. Int J Med Microbiol. 303(6-7):305-17.

169. Mendonça N, Ferreira E, Louro D; ARSIP Participants, Caniça M. 2009. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. Int J Antimicrob Agents. 34(1):29-37.

170. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection. 118(5):294-8.

171. Potron A, Munoz-Price LS, Nordmann P, Cleary T, Poirel L. 2011. Genetic features of CTX-M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. Antimicrob Agents Chemother. 55(12):5946-8.

172. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob Agents Chemother. 46(9):3045-9.

173. Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. 2006. *In vitro* analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene $bla_{\text{CTX-M}}$ of *Kluyvera ascorbata*. Antimicrob Agents Chemother. 50(4):1282-6.

174. Ito R, Pacey MP, Mettus RT, Sluis-Cremer N, Doi Y. 2018. Origin of the plasmid-mediated fosfomycin resistance gene *fosA3*. J Antimicrob Chemother. 73(2):373-6.

175. Birgand G, Armand-Lefevre L, Lolom I, Ruppe E, Andremont A, Lucet JC. 2013. Duration of colonization by extended-spectrum *β*-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* after hospital discharge. Am J Infect Control. 41(5):443-7.

176. Le Terrier C, Vinetti M, Bonjean P, Richard R, Jarrige B, Pons B, *et al.* 2021. Impact of a restrictive antibiotic policy on the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in an endemic region: a before-and-after, propensity-matched cohort study in a Caribbean intensive care unit. Crit Care. 25(1):261.

177. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Judd LM, Wyres KL, Thomson NR, *et al.* 2018. Antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital. Clin Infect Dis. 67(2):161-70.

178. Löhr IH, Hülter N, Bernhoff E, Johnsen PJ, Sundsfjord A, Naseer U. 2015. Persistence of a pKPN3-like CTX-M-15-encoding IncFII$_K$ plasmid in a *Klebsiella pneumonia* ST17 host during two years of intestinal colonization. PLoS One. 10(3):e0116516.

179. Tängdén T, Cars O, Melhus A, Löwdin E. 2010. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 54(9):3564-8.

180. Moser AI, Kuenzli E, Büdel T, Campos-Madueno EI, Bernasconi OJ, DeCrom-Beer S, *et al.* 2021. Travellers returning from the island of Zanzibar colonized with MDR *Escherichia coli* strains: assessing the impact of local people and other sources. J Antimicrob Chemother. 76(2):330-7.

181. Dohmen W, Bonten MJ, Bos ME, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, *et al.* 2015. Carriage of extended-spectrum *β*-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. Clin Microbiol Infect. 21(10):917-23.

182. Brahmi S, Touati A, Dunyach-Remy C, Sotto A, Pantel A, Lavigne JP. 2018. High prevalence of extended-spectrum *β*-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in wild fish from the Mediterranean sea in Algeria. Microb Drug Resist. 24(3):290-8.

183. Guenther S, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Wieler LH, Schaufler K. 2017. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. J Antimicrob Chemother. 72(5):1310-3.

184. Dang B, Mao D, Xu Y, Luo Y. 2017. Conjugative multi-resistant plasmids in Haihe river and their impacts on the abundance and spatial distribution of antibiotic resistance genes. Water Res. 111:81-91.

185. Sadikalay S, Reynaud Y, Guyomard-Rabenirina S, Falord M, Ducat C, Fabre L, *et al.* 2018. High genetic diversity of extended-spectrum *β*-lactamases producing *Escherichia coli* in feces of horses. Vet Microbiol. 219:117-22.

186. Yang L, Li W, Jiang GZ, Zhang WH, Ding HZ, Liu YH, *et al.* 2017. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying CTX-M-27 in *Salmonella* spp. resistant to third generation cephalosporins isolated from pork in China. Sci Rep. 7:40710.

187. Dolejska M, Papagiannitsis CC. 2018. Plasmid-mediated resistance is going wild. Plasmid. 99:99-111.

188. Guenther S, Wuttke J, Bethe A, Vojtech J, Schaufler K, Semmler T, *et al.* 2013. Is fecal carriage of extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Escherichia coli* in urban rats a risk for public health? Antimicrob Agents Chemother. 57(5):2424-5.

189. Ripoll A, Baquero F, Novais A, Rodríguez-Domínguez MJ, Turrientes MC, Cantón R, *et al.* 2011. *In vitro* selection of variants resistant to beta-lactams plus beta-lactamase inhibitors in CTX-M beta-lactamases: predicting the *in vivo* scenario? Antimicrob Agents Chemother. 55(10):4530-6.

190. Mission Spares. 2019. Surveillance de l'antibiorésistance en établissement de santé,

résultats 2018. 1–40.

191. Macesic N, Blakeway LV, Stewart JD, Hawkey J, Wyres KL, Judd LM, *et al.* 2021. Silent spread of mobile colistin resistance gene *mcr-9.1* on IncHI2 "superplasmids" in clinical carbapenem-resistant *Enterobacterales*. Clin Microbiol Infect. S1198-743X(21)00205-6.

192. Wong JLC, Romano M, Kerry LE, Kwong HS, Low WW, Brett SJ, *et al.* 2019. OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae in vivo*. Nat Commun. 10(1):3957.

193. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. 2017. Trends in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, France, 2012 to 2014. Euro Surveill. 22(6):30461.

194. Breurec S, Bastian S, Cuzon G, Bernabeu S, Foucan T, Galanth S, *et al.* 2015. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* in the Caribbean islands. J Glob Antimicrob Resist. 3(3):217-8.

195. Poirel L, Héritier C, Nordmann P. 2004. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. Antimicrob Agents Chemother. 48(1):348-51.

196. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, *et al.* 2011. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene *via* outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii.* Antimicrob Agents Chemother. 55(7):3084-90.

197. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. 2011. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 55(10):4896-9.

198. Peirano G, Matsumura Y, Adams MD, Bradford P, Motyl M, Chen L, *et al.* 2018. Genomic epidemiology of global carbapenemase-producing *Enterobacter* spp., 2008-2014. Emerg Infect Dis. 24(6):1010-9.

199. Poirel L, Ortiz de la Rosa JM, Richard A, Aires-de-Sousa M, Nordmann P. 2019. CTX-M-33, a CTX-M-15 derivative conferring reduced susceptibility to carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 63(12):e01515-9.

200. Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, *et al.* 2017. Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 72(8):2249-58.

201. Pauly N, Hammerl JA, Grobbel M, Käsbohrer A, Tenhagen BA, Malorny B, *et al.* 2020. Identification of a *bla*$_{\text{VIM-1}}$-carrying IncA/C$_2$ multiresistance plasmid in an *Escherichia coli* isolate recovered from the German food chain. Microorganisms. 9(1):29.

202. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 45(4):1151-61.

203. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. 2011. Functional characterization of Tn*4401*, a Tn*3*-based transposon involved in *bla*$_{\text{KPC}}$ gene mobilization. Antimicrob Agents Chemother. 55(11):5370-3.

204. Jelić M, Hrenović J, Dekić S, Goić-Barišić I, Tambić Andrašević A. 2019. First evidence of KPC-producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in river water. J Hosp Infect. 103(2):147-50.

205. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, *et al.* 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother. 38(1):71-8.

206. Tarabai H, Wyrsch ER, Bitar I, Dolejska M, Djordjevic SP. 2021. Epidemic HI2 plasmids mobilising the carbapenemase gene bla_{IMP-4} in Australian clinical samples identified in multiple sublineages of *Escherichia coli* ST216 colonising silver gulls. Microorganisms. 9(3):567.

207. Cheng Z, Bethel CR, Thomas PW, Shurina BA, Alao JP, Thomas CA, *et al.* 2021. Carbapenem use is driving the evolution of imipenemase 1 variants. Antimicrob Agents Chemother. 65(4):e01714-20.

208. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect Dis. 11(5):355-62.

209. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 53(12):5046-54.

210. Kizny Gordon A, Phan HTT, Lipworth SI, Cheong E, Gottlieb T, George S, Peto TEA, *et al.* 2020. Genomic dynamics of species and mobile genetic elements in a prolonged bla_{IMP-4}-associated carbapenemase outbreak in an Australian hospital. J Antimicrob Chemother. 75(4):873-82.

211. Chatterjee S, Mondal A, Mitra S, Basu S. 2017. *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene *via* outer membrane vesicles. J Antimicrob Chemother. 72(8):2201-7.

212. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. 1999. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 43(7):1584-90.

213. Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, *et al.* 2019. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. Nat Commun. 10(1):1124.

214. Pärnänen KMM, Narciso-da-Rocha C, Kneis D, Berendonk TU, Cacace D, Do TT, *et al.* 2019. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. Sci Adv. 5(3):eaau9124.

215. Angeletti S, Cella E, Lai A, Lo Presti A, Antonelli F, Conti A, *et al.* 2017. Whole-genome sequencing of *Klebsiella pneumoniae* MDR strain isolated in a Syrian refugee. Pathog Glob Health. 111(4):212-5.

216. Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé. 2011. Circulaire DGS/RI/DGOS/PF no 2010-413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesure de contrôles des

cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC). Solidarité no 2011/1 du 15 février 2011: 307-11.

217. Gillings MR. 2017. Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. Ann N Y Acad Sci. 1389(1):20-36.

218. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. 2010. Mobility of plasmids. Microbiol Mol Biol Rev. 74(3):434-52.

219. Guglielmini J, Néron B, Abby SS, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP. 2014. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. Nucleic Acids Res. 42(9):5715-27.

220. Fischer EAJ, Dierikx CM, van Essen-Zandbergen A, Mevius D, Stegeman A, Velkers FC, *et al.* 2019. Competition between *Escherichia coli* populations with and without plasmids carrying a gene encoding extended-spectrum beta-lactamase in the broiler chicken gut. Appl Environ Microbiol. 85(17):e00892-19.

221. Li L, Dechesne A, He Z, Madsen JS, Nesme J, Sørensen SJ, *et al.* 2018. Estimating the transfer range of plasmids encoding antimicrobial resistance in a wastewater treatment plant microbial community. Environ Sci Technol. 5(5):260-5.

222. Cyriaque V, Jacquiod S, Riber L, Abu Al-Soud W, Gillan DC, Sørensen SJ, *et al.* 2020. Selection and propagation of IncP conjugative plasmids following long-term anthropogenic metal pollution in river sediments. J Hazard Mater. 382:121173.

223. San Millan A, MacLean RC. 2017. Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. Microbiol Spectr. 5(5).

224. Woegerbauer M, Bellanger X, Merlin C. 2020. Cell-free DNA: an underestimated source of antibiotic resistance gene dissemination at the interface between human activities and downstream environments in the context of wastewater reuse. Front Microbiol. 11:671.

225. Karkman A, Pärnänen K, Larsson DGJ. 2019. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. Nat Commun. 10(1):80.

226. Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM, *et al.* 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. Nat Commun. 1:147.

227. Mostafa HH, Cameron A, Taffner SM, Wang J, Malek A, Dumyati G, *et al.* 2020. Genomic surveillance of ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* in western New York suggests the extended-spectrum *β*-Lactamase $bla_{\text{CTX-M-27}}$ is emerging on distinct plasmids in ST38. Front Microbiol. 11:1747.

228. Blahová J, Králiková K, Krcméry V, Jezek P. 2000. Low-Frequency transduction of imipenem resistance and high-frequency transduction of ceftazidime and aztreonam resistance by the bacteriophage AP-151 isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. J Chemother. 12(6):482-6.

229. Schmieger H, Schicklmaier P. 1999. Transduction of multiple drug resistance of*Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104. FEMS Microbiol Lett. 170(1):251-6.

230. Blokesch M. 2016. Natural competence for transformation. Curr Biol. 26(21):1126-30.

231. Keen EC, Bliskovsky VV, Malagon F, Baker JD, Prince JS, Klaus JS, *et al.* 2017. Novel

"superspreader" bacteriophages promote horizontal gene transfer by transformation. mBio. 8(1):e02115-16.

232. Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP. 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Science. 313(5783):89-92.

233. Riva F, Riva V, Eckert EM, Colinas N, Di Cesare A, Borin S, *et al.* 2020. An environmental *Escherichia coli* strain is naturally competent to acquire exogenous DNA. Front Microbiol. 11:574301.

234. Bos J, Cisneros LH, Mazel D. 2021. Real-time tracking of bacterial membrane vesicles reveals enhanced membrane traffic upon antibiotic exposure. Sci Adv. 7(4):eabd1033.

235. Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR. 2000. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. Appl Environ Microbiol. 66(10):4414-20.

236. Dubey GP, Ben-Yehuda S. 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. Cell. 144(4):590-600.

237. Pospíšil J, Vítovská D, Kofroňová O, Muchová K, Šanderová H, Hubálek M, et al. 2020. Bacterial nanotubes as a manifestation of cell death. Nat Commun. 2;11(1):4963.

238. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, *et al.* 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 73(5):1121-37.

239. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. Nucleic Acids Res. 34(Database issue):D32-6.

240. Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. 2004. Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes. FEMS Microbiol Lett. 234(2):201-7.

241. Yoon EJ, Gwon B, Liu C, Kim D, Won D, Park SG, *et al.* 2020. Chromosomal integration of the Genes for CTX-M extended-spectrum *β*-Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* for stable propagation. mSystems. 5(5):e00459-20.

242. Porse A, Schønning K, Munck C, Sommer MO. 2016. Survival and evolution of a large multidrug resistance plasmid in new clinical bacterial hosts. Mol Biol Evol. 33(11):2860-73.

243. Cain AK, Hall RM. 2012. Evolution of IncHI2 plasmids *via* acquisition of transposons carrying antibiotic resistance determinants. J Antimicrob Chemother. 67(5):1121-7.

244. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH. 2002. *IntI*2 integron integrase in *Tn*7. J Bacteriol. 184(6):1712-21.

245. Barraud O, Ploy M-C. 2011. Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise au point. J des Anti-infectieux. 13(3):133–44.

246. Marin MA, Vicente AC. 2013. Architecture of the superintegron in *Vibrio cholerae*: identification of core and unique genes. F1000Res. 2:63.

247. Boucher Y, Cordero OX, Takemura A, Hunt DE, Schliep K, Bapteste E, *et al.* 2011. Local mobile gene pools rapidly cross species boundaries to create endemicity within global *Vibrio cholerae* populations. mBio. 2(2):e00335-10.

248. Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. 2003. Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. J Infect Dis. 187(2):251-9.

249. Barraud O, Ploy MC. 2015. Diversity of class 1 integron gene cassette rearrangements selected under antibiotic pressure. J Bacteriol. 197(13):2171-78.

250. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, *et al.* 2009. The SOS response controls integron recombination. Science. 324(5930):1034.

251. Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, *et al.* 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. J Bacteriol. 190(14):5095-100.

252. Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM. 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. Mol Microbiol. 26(4):731-45.

253. Ghaly TM, Tetu SG, Gillings MR. 2021. Predicting the taxonomic and environmental sources of integron gene cassettes using structural and sequence homology of attC sites. Commun Biol. 4(1):946.

254. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. ISME J. 9(6):1269-79.

255. Stark JS, Corbett PA, Dunshea G, Johnstone G, King C, Mondon JA, *et al.* 2016. The environmental impact of sewage and wastewater outfalls in Antarctica: an example from Davis station, East Antarctica. Water Res. 105:602-14.

256. Yang K, Chen QL, Chen ML, Li HZ, Liao H, Pu Q, *et al.* 2020. Temporal dynamics of antibiotic resistome in the plastisphere during microbial colonization. Environ Sci Technol. 54(18):11322-32.

257. Pallares-Vega R, Blaak H, van der Plaats R, de Roda Husman AM, Hernandez Leal L, van Loosdrecht MCM, *et al.* 2019. Determinants of presence and removal of antibiotic resistance genes during WWTP treatment: a cross-sectional study. Water Res. 161:319-28.

258. Buelow E, Rico A, Gaschet M, Lourenço J, Kennedy SP, Wiest L, *et al.* 2020. Hospital discharges in urban sanitation systems: long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. Water Res X. 7:100045.

259. Sadikalay S. 2018. Influence des rejets humains et animaux sur la diffusion de l'antibiorésistance à l'homme, aux animaux et à l'environnement, en Guadeloupe. Université des Antilles Ecole doctorale ED589: Faculté des Sciences Exactes et Naturelles. Thesis.1-202.

260. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. 2002. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 184(15):4259-69.

261. Robertson J, Nash JHE. 2018. MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. Microb Genom. 4(8):e000206.

262. Shintani M, Fukushima N, Tezuka M, Yamane H, Nojiri H. 2008. Conjugative transfer

of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. Biotechnol Lett. 30(1):117-22.

263. Xu Y, Zhang J, Wang M, Liu M, Liu G, Qu H, *et al.* 2021. Mobilization of the nonconjugative virulence plasmid from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae.* Genome Med.13(1):119.

264. Hughes VM, Datta N. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era. Nature. 302(5910):725-6.

265. Redondo-Salvo S, Fernández-López R, Ruiz R, Vielva L, de Toro M, Rocha EPC, *et al.* 2020. Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. Nat Commun. 11(1):3602.

266. Datta N, Hedges RW. 1971. Compatibility groups among fi-R factors. Nature. 234(5326):222-3.

267. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 63(3):219-28.

268. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, *et al.* 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 58(7):3895-903.

269. Hancock SJ, Phan MD, Peters KM, Forde BM, Chong TM, Yin WF, *et al.* 2017. Identification of IncA/C plasmid replication and maintenance genes and development of a plasmid multilocus sequence typing scheme. Antimicrob Agents Chemother. 61(2):e01740-16.

270. Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. 2012. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. PLoS One. 7(7):e40438.

271. Fernandez-Lopez R, Redondo S, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F. 2017. Towards a taxonomy of conjugative plasmids. Curr Opin Microbiol. 38:106-13.

272. Redondo-Salvo S, Bartomeus-Peñalver R, Vielva L, Tagg KA, Webb HE, Fernández-López R, *et al.* 2021. COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. BMC Bioinformatics. 22(1):390.

273. Galata V, Fehlmann T, Backes C, Keller A. 2019. PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. Nucleic Acids Res. 47(D1):D195-D202.

274. Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. J Antimicrob Chemother. 65(12):2518-29.

275. Johnson TJ, Elnekave E, Miller EA, Munoz-Aguayo J, Flores Figueroa C, Johnston B, *et al.* 2018. Phylogenomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* sequence type 1193, an emerging multidrug-resistant clonal group. Antimicrob Agents Chemother. 63(1):e01913-8.

276. Mahérault AC, Kemble H, Magnan M, Gachet B, Roche D, Le Nagard H, *et al.* 2019. Advantage of the F2:A1:B-IncF pandemic plasmid over IncC plasmids in *in vitro* acquisition and evolution of $bla_{\text{CTX-M}}$ gene-bearing plasmids in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 63(10):e01130-19.

277. Gilmour MW, Thomson NR, Sanders M, Parkhill J, Taylor DE. 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. Plasmid. 52(3):182-202.

278. García-Fernández A, Carattoli A. 2010. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. J Antimicrob Chemother. 65(6):1155-61.

279. Gibert M, Paytubi S, Madrid C, Balsalobre C. 2020. Temperature dependent control of the R27 conjugative plasmid genes. Front Mol Biosci. 7:124.

280. Forns N, Baños RC, Balsalobre C, Juárez A, Madrid C. 2005. Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. J Bacteriol. 187(12):3950-9.

281. Ma K, Feng Y, Zong Z. 2018. Fitness cost of a *mcr-1*-carrying IncHI2 plasmid. PLoS One. 13(12):e0209706.

282. Valcek A, Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, *et al.* 2019. IncI1 ST3 and IncI1 ST7 plasmids from CTX-M-1-producing *Escherichia coli* obtained from patients with bloodstream infections are closely related to plasmids from *E. coli* of animal origin. J Antimicrob Chemother. 74(8):2171-5.

283. Poidevin M, Sato M, Altinoglu I, Delaplace M, Sato C, Yamaichi Y. 2018. Mutation in ESBL plasmid from *Escherichia coli* O104:H4 leads autoagglutination and enhanced plasmid dissemination. Front Microbiol. 9:130.

284. Majeed H, Gillor O, Kerr B, Riley MA. 2011. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. ISME J. 5(1):71-81.

285. Vornhagen J, Bassis CM, Ramakrishnan S, Hein R, Mason S, Bergman Y, *et al.* 2021. A plasmid locus associated with Klebsiella clinical infections encodes a microbiome-dependent gut fitness factor. PLoS Pathog.17(4):e1009537.

286. Loftie-Eaton W, Yano H, Burleigh S, Simmons RS, Hughes JM, Rogers LM, *et al.* 2016. Evolutionary paths that expand plasmid host-range: implications for spread of antibiotic resistance. Mol Biol Evol. 33(4):885-97.

287. Loftie-Eaton W, Bashford K, Quinn H, Dong K, Millstein J, Hunter S, *et al.* 2017. Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids. Nat Ecol Evol. 1(9):1354-63.

288. Palkovicova J, Kutilova I, Delafuente J, Valcek A, Medvecky M, Hamborova I, *et al.* 2021. Fitness effects of CTX-M-15-encoding IncF plasmids on their native *Escherichia coli* ST131 *H30*Rx hosts. Preprint. 1-26.

289. Zwanzig M, Harrison E, Brockhurst MA, Hall JPJ, Berendonk TU, Berger U. 2019. Mobile compensatory mutations promote plasmid survival. mSystems. 4(1):e00186-18.

290. Xie Y, Wei Y, Shen Y, Li X, Zhou H, Tai C, *et al.* 2018. Deng Z, Ou HY. TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. Nucleic Acids Res. 46(D1):D749-D53.

291. Stalder T, Cornwell B, Lacroix J, Kohler B, Dixon S, Yano H, *et al.* 2020. Evolving

populations in biofilms contain more persistent plasmids. Mol Biol Evol. 37(6):1563-76.

292. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. Pathology. 47(3):199-210.

293. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, *et al.* 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 67(11):2640-4.

294. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol. 13(6):e1005595.

295. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al.* 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 19(5):455-77.

296. George S, Pankhurst L, Hubbard A, Votintseva A, Stoesser N, Sheppard AE, *et al.* 2017. Resolving plasmid structures in *Enterobacteriaceae* using the MinION nanopore sequencer: assessment of MinION and MinION/Illumina hybrid data assembly approaches. Microb Genom. 3(8):e000118.

297. Arredondo-Alonso S, Rogers MRC, Braat JC, Verschuuren TD, Top J, Corander J, *et al.* 2018. mlplasmids: a user-friendly tool to predict plasmid- and chromosome-derived sequences for single species. Microb Genom. 4(11):e000224.

298. van der Graaf - van Bloois L, Wagenaar JA, Zomer AL. 2020. RFPlasmid: predicting plasmid sequences from short read assembly data using machine learning. Preprint.1-17.

299. Krawczyk PS, Lipinski L, Dziembowski A. 2018. PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. Nucleic Acids Res. 46(6):e35.

300. Stohr JJJM, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Wedema R, Friedrich AW, Kluytmans JAJW, Rossen JWA. 2020. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes and plasmid replicons in *Enterobacteriaceae* using PlasmidSPAdes assembly of short-read sequence data. Microb Genom. 6(7):mgen000400.

301. Berbers B, Ceyssens PJ, Bogaerts P, Vanneste K, Roosens NHC, Marchal K, *et al.* 2020. Development of an NGS-based workflow for improved monitoring of circulating plasmids in support of risk assessment of antimicrobial resistance gene dissemination. antibiotics (Basel). 9(8):503.

302. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, *et al.* 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. Trans R Soc Trop Med Hyg. 110(7):377-80.

303. Humboldt-Dachroeden S, Rubin O, Sylvester Frid-Nielsen S. 2020. The state of One Health research across disciplines and sectors - a bibliometric analysis. One Health. 10:100146.

304. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, *et al.* 2011. Antibiotic resistance is ancient. Nature. 477(7365):457-61.

305. Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PA, Graham DW. 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. Environ Sci Technol. 44(2):580-7.

306. Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. 2006. Antibiotic resistance genes as

emerging contaminants: studies in northern Colorado. Environ Sci Technol. 40(23):7445-50.

307. Grall N, Barraud O, Wieder I, Hua A, Perrier M, Babosan A, *et al.* 2015. Lack of dissemination of acquired resistance to *β*-lactams in small wild mammals around an isolated village in the Amazonian forest. Environ Microbiol Rep. 7(5):698-708.

308. Swift BMC, Bennett M, Waller K, Dodd C, Murray A, Gomes RL, *et al.* 2019. Anthropogenic environmental drivers of antimicrobial resistance in wildlife. Sci Total Environ. 649:12-20.

309. Ramey AM, Ahlstrom CA. 2020 . Antibiotic resistant bacteria in widlife perspectives on trends acquisition and dissemination data gaps and futur directions. J Wildl Dis. 56(1):1-15.

310. Schaufler K, Nowak K, Düx A, Semmler T, Villa L, Kourouma L, *et al.* 2018. Clinically relevant ESBL-producing *K. pneumoniae* ST307 and *E. coli* ST38 in an urban West African rat population. Front Microbiol. 9:150.

311. Marcelino VR, Wille M, Hurt AC, González-Acuña D, Klaassen M, Schlub TE, *et al.* 2019. Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. BMC Biol. 17(1):31.

312. Mathys DA, Mathys BA, Mollenkopf DF, Daniels JB, Wittum TE. 2017. *Enterobacteriaceae* Harboring AmpC (*bla*$_{CMY}$) and ESBL (*bla*$_{CTX-M}$) in migratory and nonmigratory wild songbird populations on Ohio dairies. Vector Borne Zoonotic Dis. 17(4):254-9.

313. Worsley-Tonks KEL, Miller EA, Anchor CL, Bender JB, Gehrt SD, McKenzie SC, *et al.* 2021. Importance of anthropogenic sources at shaping the antimicrobial resistance profile of a peri-urban mesocarnivore. Sci Total Environ.764:144166.

314. Fashae K, Engelmann I, Monecke S, Braun SD, Ehricht R. 2021. Molecular characterisation of extended-spectrum -*β*-lactamase producing *Escherichia coli* in wild birds and cattle, Ibadan, Nigeria. BMC Vet Res.17(1):33.

315. Dolejska M, Literak I. 2019. Wildlife is overlooked in the epidemiology of medically important antibiotic-resistant bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 63(8):e01167-19.

316. Obeng-Nkrumah N, Labi AK, Blankson H, Awuah-Mensah G, Oduro-Mensah D, Anum J, *et al.* 2019. Household cockroaches carry CTX-M-15-, OXA-48- and NDM-1-producing enterobacteria, and share beta-lactam resistance determinants with humans. BMC Microbiol. 19(1):272.

317. Tufa TB, Fuchs A, Wienemann T, Eggers Y, Abdissa S, Schneider M, *et al.* 2020. Carriage of ESBL-producing Gram-negative bacteria by flies captured in a hospital and its suburban surroundings in Ethiopia. Antimicrob Resist Infect Control. 9(1):175.

318. Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Guadeloupe (DEAL). 2020. Assainissement des eaux usées. Available from: http://www.guadeloupe.developpement-durable.gouv.fr/assainissement-des-eaux-usees-r938.html. [Accessed Dec 2, 2020].

319. Solidarités International. 2021. Combattre les maladies hydriques. Available from: https://www.solidarites.org/fr/aider-plus-loin-temoigner/combattre-les-maladies-hydriques/. [Accessed Jan 3, 2021].

320. Rebaudet S, Moore S, Rossignol E, Bogreau H, Gaudart J, Normand AC, *et al.* 2019. Epidemiological and molecular forensics of cholera recurrence in Haiti. Sci Rep. 9(1):1164.

321. World Health Organization. 2021. Population practising open defecation. Available from: https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/population-practising-open-defecation-(-). [Accessed May 25, 2021].

322. Ministère de l'Écologie et du Développement durable et de l'Énergie. 2015. Arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO5. 1-25.

323. Onema, Epnac, Irstea. 2015. Ouvrage de traitement par boues activées - guide d'exploitation. 1-85.

324. Sibony J, Bigot B. 1993. Traitement des eaux usées urbaines. Techniques de l'ingénieur. C4230V1;1-33.

325. Liu W, Zhang J, Liu H, Guo X, Zhang X, Yao X, *et al.* 2021. A review of the removal of microplastics in global wastewater treatment plants: characteristics and mechanisms. Environ Int. 146:106277.

326. Anza I, Vidal D, Laguna C, Díaz-Sánchez S, Sánchez S, Chicote A, *et al.* 2014. Eutrophication and bacterial pathogens as risk factors for avian botulism outbreaks in wetlands receiving effluents from urban wastewater treatment plants. Appl Environ Microbiol. 80(14):4251-9.

327. Calero-Cáceres W, Muniesa M. 2016. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. Water Res. 95:11-8.

328. Rodriguez-Mozaz S, Vaz-Moreira I, Varela Della Giustina S, Llorca M, Barceló D, Schubert S, *et al.* 2020. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. Environ Int. 140:105733.

329. Institut national de recherche et de sécurité. 2013. Station d'épuration des eaux usées - prévention des risques biologiques. ED6152: 1-34.

330. Suez. 2019. Recyclage et valorisation en France, Sita Verde, plateforme de compostage du Moule - rapport annuel d'activité et dossier d'information 2018. V2:1-23.

331. Moulla S, Paul J, Causeret F, Guindé L, Blazy JM, Sierra J. 2018. Perception des agriculteurs sur les composts à base de boues de station d'épuration. Rapport d'étude:1-11.

332. Kindzierski W, Bari MA, Wang X, Wetmore T, Maal-Bared R, Michaels C. 2015. Evidence of wastewater treatment plant worker biohazard exposure and health symptom responses. CSBE/SCGAB, Annual Conference: No15-090:1-21.

333. Fenollar F, Trani M, Davoust B, Salle B, Birg ML, Rolain JM, *et al.* 2008. Prevalence of asymptomatic *Tropheryma whipplei* carriage among humans and nonhuman primates. J Infect Dis. 197(6):880-7.

334. Parlement Européen. 2000. Directive 2000/54/CE concernant la protection des

travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. Journal officiel des Communautés européennes L 26:21-45.

335. Berendes D, Kirby A, Brown J, Wester AL. 2020. Human faeces-associated extended-spectrum *β*-lactamase-producing *Escherichia coli* discharge into sanitation systems in 2015 and 2030: a global and regional analysis. Lancet Planet Health. 4(6):e246-e255.

336. Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. Ecotoxicol Environ Saf. 91:96-102.

337. Lu R, Frederiksen MW, Uhrbrand K, Li Y, Østergaard C, Madsen AM. 2020. Wastewater treatment plant workers' exposure and methods for risk evaluation of their exposure. Ecotoxicol Environ Saf. 205:111365.

338. Vantarakis A, Paparrodopoulos S, Kokkinos P, Vantarakis G, Fragou K, Detorakis I. 2016. Impact on the quality of life when living close to a municipal wastewater treatment plant. J Environ Public Health. 2016:8467023.

339. Zieliński W, Korzeniewska E, Harnisz M, Hubeny J, Buta M, Rolbiecki D. 2020. The prevalence of drug-resistant and virulent *Staphylococcus spp*. in a municipal wastewater treatment plant and their spread in the environment. Environ Int. 143:105914.

340. Larsen DA, Wigginton KR. 2020. Tracking COVID-19 with wastewater. Nat Biotechnol. 38(10):1151-3.

341. Santé publique France, Mission Spares. 2020. Surveillance de l'antibiorésistance en établissement de santé - données 2018, partie 2 : résistance bactérienne aux antibiotiques. 1-54.

342. Sulej-Suchomska AM, Klupczynska A, Dereziński P, Matysiak J, Przybyłowski P, Kokot ZJ. 2020. Urban wastewater analysis as an effective tool for monitoring illegal drugs, including new psychoactive substances, in the Eastern European region. Sci Rep. 10(1):4885.

343. Guyomard-Rabenirina S. 2016. Résistance aux antibiotiques des entérobactéries en Guadeloupe : importance en milieu communautaire et diffusion environnementale. Université des Antilles Ecole doctorale ED589: Faculté des Sciences Exactes et Naturelles. Thesis. 1-247.

344. Lekunberri I, Subirats J, Borrego CM, Balcázar JL. 2017. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. Environ Pollut. 220(Pt B):981-4.

345. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Antibiorésistance et environnement, état et causes possibles de la contamination des milieux en France. Rapport d'expertise collective:1-298.

346. Gao P, He S, Huang S, Li K, Liu Z, Xue G, *et al.* 2015. Impacts of coexisting antibiotics, antibacterial residues, and heavy metals on the occurrence of erythromycin resistance genes in urban wastewater. Appl Microbiol Biotechnol. 99(9):3971-80.

347. Negreanu Y, Pasternak Z, Jurkevitch E, Cytryn E. 2012. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. Environ Sci Technol. 46(9):4800-8.

348. Popa LI, Gheorghe I, Barbu IC, Surleac M, Paraschiv S, Măruţescu L, *et al.* 2021.

Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 clone survival chain from inpatients to hospital effluent after chlorine treatment. Front Microbiol. 11:610296.

349. Office de l'eau Guadeloupe. 2020. Eau et assainissement les chiffres clés 2018. 1-60.

350. Parlement Européen. 2020. Décision d'exécution (UE) 2020/1161 de la Commission du 4 août 2020 établissant une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE. Journal officiel des Communautés européennes L257:32-5.

351. Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement, Parc national de la Guadeloupe. 2014. Atlas de la Biodiversité Commune de Bouillante. 1-101.

352. Fernandes MR, Sellera FP, Cunha MPV, Lopes R, Cerdeira L, Lincopan N, *et al.* 2020. Emergence of CTX-M-27-producing *Escherichia coli* of ST131 and clade C1-M27 in an impacted ecosystem with international maritime traffic in South America. J Antimicrob Chemother. 75(6):1647-9.

353. Furness LE, Campbell A, Zhang L, Gaze WH, McDonald RA. 2017. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. Environ Res. 154:28-34.

354. Doud CW, Scott HM, Zurek L. 2014. Role of house flies in the ecology of *Enterococcus faecalis* from wastewater treatment facilities. Microb Ecol. 67(2):380-91.

355. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DG. 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. Environ Toxicol Chem. 28(12):2522-7.

356. Collins-Fairclough AM, Co R, Ellis MC, Hug LA. 2018. Widespread antibiotic, biocide, and metal resistance in microbial communities inhabiting a municipal waste environment and anthropogenically impacted river. mSphere. 3(5):e00346-18.

357. Conseil Général de l'Alimentation de l'Agriculture et des Espaces Ruraux. 2015. Valorisation de la Biomasse en Guadeloupe. Rapport 14063:1-63.

358. Jechalke S, Broszat M, Lang F, Siebe C, Smalla K, Grohmann E. 2015. Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. Front Microbiol. 6:163.

359. Ben Mordechay E, Mordehay V, Tarchitzky J, Chefetz B. 2021. Pharmaceuticals in edible crops irrigated with reclaimed wastewater: evidence from a large survey in Israel. J Hazard Mater. 416:126184.

360. Sucato A, Vecchioni L, Savoca D, Presentato A, Arculeo M, Alduina R. 2021. A comparative analysis of aquatic and polyethylene-associated antibiotic-resistant microbiota in the mediterranean sea. Biology (Basel). 10(3):200.

361. Insee Guadeloupe. 2020. Recensement de la population en Guadeloupe. Rapport flash 142:1-2.

362. Santé publique France. 2021. Résistance aux antibiotiques. Available from: https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/donnees/. [Accessed Sep 3, 2021].

363. Santé publique France. 2019. Consommation d'antibiotiques en secteur de ville en

France de 2009 à 2018. Synthèse des indicateurs mis en ligne sur Géodes. 1-12.

364. Direction de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt. 2019. Mémento de la statistique agricole - Guadeloupe - eddition 2019. 1-32.

365. Gruel G, Sellin A, Riveiro H, Pot M, Breurec S, Guyomard-Rabenirina S, *et al.* 2021. Antimicrobial use and resistance in *Escherichia coli* from healthy food-producing animals in Guadeloupe. BMC Vet Res. 17(1):116.

366. Direction Régionale de l'Environnement. 2007. Calendrier ornithologique des principaux oiseaux migrateurs de Guadeloupe. Rapport Amazonia 14:1-7.

367. Muñoz MM, Crawford NG, McGreevy TJ Jr, Messana NJ, Tarvin RD, Revell LJ, *et al.* 2013. Divergence in coloration and ecological speciation in the *Anolis marmoratus* species complex. Mol Ecol. 22(10):2668-82.

368. Diez SM, Patil PG, Morton J, Rodriguez DJ, Vanzella A, Robin DV, *et al.* 2019. Marine pollution in the Carribbean: not a minute to waste. World Bank Group Report:1-104.

369. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature. 403(6772):853-8.

370. Conservatoire du litorral - antenne de Guadeloupe. 2019. Etat des lieux de la zone humide de jarry et diagnostic des atteintes au milieu. Synthèse d'étude:1-62.

371. Plaisir ML, Gaydu L. 2020. Les insupportables odeurs de Cailloux au Lamentin. Guadeloupe La 1ère - press.

372. Ministère de la transition écologique. 2020. Portail d'information sur l'assainissement communal. Available from: https://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/. [Accessed Feb 3, 2020].

373. Romain P. 2020. Eau et assainissement : la dure réalité du Sud Basse-Terre. Guadeloupe La 1ère - press.

374. Fadel N. 2020. Eaux usées sur le littoral de Saint-François : la municipalité compte intervenir. Guadeloupe La 1ère - press.

375. Stimpfling E. 2018. Le préfet de Région somme de remettre en service la station d'épuration de Capesterre Belle-Eau. Guadeloupe La 1ère - press.

376. Aristide F. 2019. Baignade interdite à la plage de Petite Anse à Bouillante. Guadeloupe La 1ère - press.

377. Fédération des Associations des Usagers de l'Eau de Guadeloupe. 2020. Lettre ouverte sur le dossier de l'eau en Guadeloupe. 1-4.

378. Bagassien E. 2018. Le projet de plateforme multifilières de traitement des déchets de la Gabarre n'aura pas lieu. Guadeloupe La 1ère - press.

379. Centre Hospitalier Universitaire Pointe-à-Pitre. 2021. Le CHU, présentation et chiffres clés. Available from: https://www.chu-guadeloupe.fr. [Accessed Jan 11, 2021].

380. Haute Autorité de Santé. 2014. Rapport de certification V2010 CHU Point-à-Pitre Abymes. 1-453.

381. Haute Autorité de Santé. 2020. Décision N°2020.0317/CCES/SCES-31952 du 24/11/2020 de la commission de certification des établissements de santé portant sur la

procédure de certification de l'établissement de santé CHU Point-à-Pitre Abymes. 1-2.

382. Rutland Bauer M. 2017. Avian Invasion. WaterWorld - press.

383. Pai HH. 2013. Multidrug resistant bacteria isolated from cockroaches in long-term care facilities and nursing homes. Acta Trop. 125(1):18-22.

384. Degand N, Ruimy R. 2012. Intérêts et les limites actuelles du MALDI-TOF en microbiologie clinique. J des Anti-Infectieux. 14(4):159–67.

385. Pot M, Guyomard-Rabenirina S, Couvin D, Ducat C, Enouf V, Ferdinand S, *et al.* 2021. Dissemination of extended-spectrum-*β*-Lactamase-producing *Enterobacter cloacae* complex from a hospital to the nearby environment in Guadeloupe (French West Indies): ST114 lineage coding for a successful IncHI2/ST1 plasmid. Antimicrob Agents Chemother. 65(3):e02146-20.

386. Criscuolo A, Brisse S. 2014. AlienTrimmer removes adapter oligonucleotides with high sensitivity in short-insert paired-end reads. Commentary on Turner (2014) Assessment of insert sizes and adapter content in FASTQ data from NexteraXT libraries. Front Genet. 5:130.

387. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 29(8):1072-5.

388. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics. 31(19):3210-2.

389. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, *et al.* 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics. 31(22):3691-3.

390. Didelot X, Wilson DJ. 2015. ClonalFrameML: efficient inference of recombination in whole bacterial genomes. PLoS Comput Biol.11(2):e1004041.

391. Stamatakis A. 2014.RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 30(9):1312-3.

392. Letunic I, Bork P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res. 47(W1):256-9.

393. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 3:124.

394. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis - 10 years on. Nucleic Acids Res.;44(D1):D694-7.

395. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, *et al.* 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. 9:75.

396. Waters NR, Abram F, Brennan F, Holmes A, Pritchard L. 2020. Easy phylotyping of *Escherichia coli* via the EzClermont web app and command-line tool. Access Microbiol. (9):acmi000143.

397. Didelot X, Croucher NJ, Bentley SD, Harris SR, Wilson DJ. 2018. Bayesian inference of ancestral dates on bacterial phylogenetic trees. Nucleic Acids Res. 46(22):e134.

398. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 9(4):357-9.

399. Hall TA. 1999. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-8.

400. Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 14(7):1394-403.

401. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, *et al.* 2016. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. Genome Biol. 17(1):132.

402. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. Bioinformatics. 27(7):1009-10.

403. Direction de l'Environnement de l'Aménagement et du Logement Service Ressources Naturelles. 2016. Arrêté DEALRN n°971-2016-12-20-001 portant autorisation de spécimen de l'espèces animale protégée d'*Anolis* de la Guadeloupe (*Anolis marmoratus*). 1-4.

404. Sellin A. 2018. Etude du profil de résistance de bactéries isolées des élevages porcins et bovins en Guadeloupe. Université de Caen Normandie. Report 1-20.

405. Shaïna P. 2018. Etude des *Klebsiella pneumoniae* en Guadeloupe chez l'homme, l'animal et leur environnement. Université des Antilles. Report 1-28.

406. Kämpfer P, Nienhüser A, Packroff G, Wernicke F, Mehling A, Nixdorf K, *et al.* 2008. Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. Int J Hyg Environ Health. 211(3-4):374-84.

407. Pot M, Ducat C, Reynaud Y, Couvin D, Ferdinand S, Breurec S, *et al.* 2021. Draft genome sequence of *Enterobacter oligotrophicus*, isolated from the microbiome of a lizard in the Caribbean. Microbiol Resour Announc. 10(35):e0060221.

408. Pot M, Reynaud Y, Couvin D, Ducat C, Ferdinand S, Gravey F, *et al.* 2021. Wide distribution and specific resistance pattern to third-generation cephalosporins of *Enterobacter cloacae* complex members in humans and in the environment in Guadeloupe (French West Indies). Front Microbiol. 12:628058.

409. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 30(14):2068-9.

410. Wu W, Feng Y, Zong Z. 2019. Characterization of a strain representing a new *Enterobacter* species, *Enterobacter chengduensis* sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek. 112(4):491-500.

411. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. BMC Genomics. 12:402.

412. Kremer A, Hoffmann H. 2012. Prevalences of the *Enterobacter cloacae* complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31(11):2951-5.

413. Moradigaravand D, Reuter S, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. 2016. The dissemination of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* throughout the UK and Ireland. Nat

Microbiol. 1:16173.

414. Gomez-Simmonds A, Annavajhala MK, Wang Z, Macesic N, Hu Y, Giddins MJ, *et al.* 2018. Genomic and geographic context for the evolution of high-risk carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex clones ST171 and ST78. mBio. 9(3):e00542-18.

415. Tetsuka N, Hirabayashi A, Matsumoto A, Oka K, Hara Y, Morioka H, *et al.* 2019. Molecular epidemiological analysis and risk factors for acquisition of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex in a Japanese university hospital. Antimicrob Resist Infect Control. 8:126.

416. Roberts LW, Harris PNA, Forde BM, Ben Zakour NL, Catchpoole E, Stanton-Cook M, *et al.* 2020. Integrating multiple genomic technologies to investigate an outbreak of carbapenemase-producing *Enterobacter hormaechei*. Nat Commun. 11(1):466.

417. Kubicek-Sutherland JZ, Xie G, Shakya M, Dighe PK, Jacobs LL, Daligault H, *et al.* 2021. Comparative genomic and phenotypic characterization of invasive non-typhoidal *Salmonella* isolates from Siaya, Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 15(2):e0008991.

418. Astolfi MCT, Carvalho EBS, de Barros AM, Pinto MV, de Lacerda LB, Nogueira VB, *et al.* 2018. Draft genome sequence of the novel *Enterobacter cloacae* strain *amazonensis*, a highly heavy metal-resistant bacterium from a contaminated stream in Amazonas, Brazil. Genome Announc. 6(22):e00450-18.

419. Paauw A, Caspers MPM, Leverstein-van Hall MA, Schuren FHJ, Montijn RC, Verhoef J, *et al.* 2009. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. Microbiology (Reading). 155(Pt 5):1478-1488.

420. Duval A, Obadia T, Boëlle PY, Fleury E, Herrmann JL, Guillemot D, *et al.* 2019. Close proximity interactions support transmission of ESBL-*K. pneumoniae* but not ESBL-*E. coli* in healthcare settings. PLoS Comput Biol. 15(5):e1006496.

421. Rojas R, Macesic N, Tolari G, Guzman A, Uhlemann AC. 2019. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307 in traveler returning from Puerto Rico to Dominican Republic. Emerg Infect Dis. 25(8):1583-5.

422. Khanna N, Ghosh AK, Huntemann M, Deshpande S, Han J, Chen A, *et al.* 2013. Complete genome sequence of *Enterobacter* sp. IIT-BT 08: a potential microbial strain for high rate hydrogen production. Stand Genomic Sci. 9(2):359-69.

423. Shawa M, Furuta Y, Mulenga G, Mubanga M, Mulenga E, Zorigt T, *et al.* 2021. Novel chromosomal insertions of ISEcp1-*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ and diverse antimicrobial resistance genes in Zambian clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*. Antimicrob Resist Infect Control. 10(1):79.

424. Tchesnokova VL, Rechkina E, Larson L, Ferrier K, Weaver JL, Schroeder DW, *et al.* 2019. Rapid and extensive expansion in the United States of a new multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group, sequence type 1193. Clin Infect Dis. 68(2):334-7.

425. Huang J, Zhang S, Zhang S, Zhao Z, Cao Y, Chen M, *et al.* 2020. A comparative study of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* lineages portrays indistinguishable pathogenicity- and survivability-associated phenotypic characteristics between ST1193 and ST131. Infect Drug Resist. 13:4167-75.

426. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, *et al.* 2003. Effect of

D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. J Antimicrob Chemother. 52(1):29-35.

427. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. J Antimicrob Chemother. 50(6):1031-4.

428. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. 2020. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother. 64(10):e01148-20.

429. Ramdani-Bouguessa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Caniça M. Role of SHV *β*-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to *β*-lactams in an Algerian hospital. J Med Microbiol. 60(Pt 7):983-7.

430. Murphy R, Palm M, Mustonen V, Warringer J, Farewell A, Parts L, *et al.* 2021. Genomic epidemiology and evolution of *Escherichia coli* in wild animals in Mexico. mSphere. 6(1):e00738-20.

431. Leão C, Clemente L, Moura L, Seyfarth AM, Hansen IM, Hendriksen RS, *et al.* 2021. Amaro A. Emergence and clonal spread of CTX-M-65-Producing *Escherichia coli* from retail meat in Portugal. Front Microbiol. 12:653595.

432. Miko A, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N, Krause G, et al. 2009. Assessment of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. Appl Environ Microbiol. 75(20):6462-70.

433. de Carvalho MPN, Fernandes MR, Sellera FP, Lopes R, Monte DF, Hippólito AG, *et al.* 2020. International clones of extended-spectrum *β*-lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in peri-urban wild animals, Brazil. Transbound Emerg Dis. 67(5):1804–15.

434. Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. 2009. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. J Antimicrob Chemother. 63(1):72-9.

435. Guerra JM, Fernandes NCCA, Morales Dos Santos AL, Barrel JSP, Petri BSS, *et al.* 2020. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* as unexpected cause of fatal outbreak in captive marmosets, Brazil. Emerg Infect Dis. 26(12):3039-43.

436. Dods PL, Birmingham EM, Williams TD, Ikonomou MG, Bennie DT, Elliott JE. 2005. Reproductive success and contaminants in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) breeding at a wastewater treatment plant. Environ Toxicol Chem. 24(12):3106-12.

437. Linzey D, Burroughs J, Hudson L, Marini M, Robertson J, Bacon J, *et al.* 2003. Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. Int J Environ Health Res. 13(2):125-48.

438. Dromard CR, Bodiguel X, Lemoine S, Bouchon-Navaro Y, Reynal L, Thouard E, *et al.* 2016. Assessment of the contamination of marine fauna by chlordecone in Guadeloupe and Martinique (Lesser Antilles). Environ Sci Pollut Res Int. 23(1):73-80.

439. Delgado-Blas JF, Ovejero CM, David S, Montero N, Calero-Caceres W, Garcillan-Barcia MP, *et al.* 2021. Population genomics and antimicrobial resistance dynamics of *Escherichia coli* in wastewater and river environments. Commun Biol. 4(1):457.

440. Méric G, Kemsley EK, Falush D, Saggers EJ, Lucchini S. 2013. Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in *Escherichia coli*. Environ Microbiol. 15(2):487-501.

441. Guenther S, Bethe A, Fruth A, Semmler T, Ulrich RG, Wieler LH, *et al.* 2012. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. PLoS One. 7(11):e50331.

442. Furlan JPR, Gallo IFL, de Campos TA, Stehling EG. 2020. Genomic characterization of a multidrug-resistant and hypermucoviscous/hypervirulent *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* ST4417 isolated from a sewage treatment plant. Microb Drug Resist. 26(11):1321-5.

443. Matlock W, Chau KK, AbuOun M, Stubberfield E, Barker L, Kavanagh J, *et al.* 2021. Genomic network analysis of environmental and livestock F-type plasmid populations. ISME J. 15(8):2322-35.

444. Hirvonen JJ, Siitonen A, Kaukoranta SS. 2012. Usability and performance of CHROMagar STEC medium in detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 50(11):3586-90.

445. Passet V, Brisse S. 2015. Association of tellurite resistance with hypervirulent clonal groups of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 53(4):1380-2.

446. Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE. 2006. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. Microbes Infect. 8(3):834-40.

447. Centre Hospitalier Universitaire de la Guadeloupe. 2021. Le nouveau CHU se dévoile. Available from: https://chu-guadeloupe.info. [Accessed Feb 13, 2021].

448. Kolb-Nelson A. 2015. Feral cats take on rodent control duties at South treatment plant in Renton. Wastewater treatment division, King County - Press.

449. Sun J, Liao XP, D'Souza AW, Boolchandani M, Li SH, Cheng K, *et al.* 2020. Environmental remodeling of human gut microbiota and antibiotic resistome in livestock farms. Nat Commun. 11(1):1427.

450. Rodríguez-Molina D, Berglund F, Blaak H, Popa M, Flach CF, Kemper M, *et al.* 2021. Carriage of ESBL-producing *Enterobacterales* in wastewater treatment plant workers and surrounding residents - The AWARE Study. Preprint. 1–28.

451. Wang M, Hu C, Barnes BB, Mitchum G, Lapointe B, Montoya JP. 2019. The great Atlantic *Sargassum* belt. Science. 365(6448):83-7.

452. Cormier B, Gambardella C, Tato T, Perdriat Q, Costa E, Veclin C, *et al.* 2021. Chemicals sorbed to environmental microplastics are toxic to early life stages of aquatic organisms. Ecotoxicol Environ Saf. 208:111665.

453. Agence Régionale de Santé. 2020. Qualité des eaux de baignade de Guadeloupe, Saint Martin, Saint Barthélemy - Bilan de la saison 2020. 1-16.

454. Champion J. 2021. La casse d'une canalisation à Jarry, responsable d'une pollution du plan d'eau de Lauricisque. Guadeloupe La 1ère - press.

455. Ponnet R. 2019. La pollution de la plage de Petite Anse viendrait du Centre Gériatrique

Kalana. Guadeloupe La 1ère - press.

456. Sacramento AG, Fernandes MR, Sellera FP, Muñoz ME, Vivas R, Dolabella SS, *et al.* 2018. Genomic analysis of MCR-1 and CTX-M-8 co-producing *Escherichia coli* ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in Brazil. J Glob Antimicrob Resist. 288-9.

457. Imchen M, Kumavath R. 2021. Metagenomic insights into the antibiotic resistome of mangrove sediments and their association to socioeconomic status. Environ Pollut. 268(Pt A):115795.

458. Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, *et al.* 2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science. 347(6223):768-71.

459. Law KL, Morét-Ferguson S, Maximenko NA, Proskurowski G, Peacock EE, Hafner J, *et al.* 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. Science. 329(5996):1185-8.

460. Sathicq MB, Sabatino R, Corno G, di Cesare A. 2021. Are microplastic particles a hotspot for the spread and the persistence of antibiotic resistance in aquatic systems? Environ Pollut. 279:116896.

461. Carlton JT, Chapman JW, Geller JB, Miller JA, Carlton DA, McCuller MI, *et al.* 2017. Tsunami-driven rafting: transoceanic species dispersal and implications for marine biogeography. Science. 357(6358):1402-6.

462. Silva MM, Maldonado GC, Castro RO, de Sá Felizardo J, Cardoso RP, Anjos RMD, *et al.* 2019. Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil. Mar Pollut Bull. 141:561-8.

Echanges de gènes de résistance entre bactéries de différents biotopes

L'assainissement collectif des eaux usées est une étape cruciale dans le cycle d'utilisation de l'eau par l'homme. Le traitement final en station d'épuration doit répondre à diverses exigences afin de limiter au maximum les perturbations de l'environnement aquatique récepteur. Dans ce cadre, la réglementation nationale et la surveillance des performances des process d'épuration n'impliquent pas la recherche et le suivi des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Ces germes sont pour la plupart inféodés à l'homme et ils représentent aujourd'hui un problème de santé publique mondial. De nombreuses études suggèrent que les eaux usées ont un rôle important dans leur propagation environnementale. Afin de mieux comprendre et décrire cette diffusion, nous avons effectué un suivi de souches infectieuses et multirésistantes des effluents du centre hospitalier de Guadeloupe jusqu'à la station associée. Des prélèvements au sein de la faune sauvage et domestique autour du process d'épuration ont aussi été réalisés pour évaluer ce portage. Par une analyse génomique et phylogénétique nous avons démontré que ce site était un « hot-spot » de la diffusion de résistance. En effet, de nombreux animaux portaient des lignées multirésistantes initialement retrouvées chez l'homme à l'hôpital. De plus, une approche par séquençage « long-reads » a souligné que des plasmides de résistance spécifiques circulaient entre différentes espèces d'entérobactéries. Ce projet de type « One-Health » nous a permis de souligner l'importance de mieux considérer la problématique des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les stations d'épuration et aux alentours.

Mots-clés : BLSE, Caraïbes, eaux-usées, IncHI2, *Enterobacteriaceae*, nanopore, One-Health, phylogénie

Exchanges of resistance genes between bacteria from different biotopes

Wastewater treatment process is an important step in the human water cycle. The final treatment in specific plants meet several requirements in order to reduce as much as possible downstream aquatic environments disruption. National regulations and monitoring of wastewater treatment performance do not imply the search for antibiotic resistant bacteria. Most of these microorganisms represent a global health challenge. Numerous studies have shown that anthropogenic activities and wastewater play a significant role in maintaining and spreading the antibiotic resistance in the environment. In order to better understand and describe this diffusion, we carried out a follow-up of infectious and multidrug-resistant strains in Guadeloupe, from the hospital effluents to the associated treatment plant. Bacterial carriage in wild-fauna and domestic animals living in close proximity to this wastewater treatment plant was also investigated. Thanks to genomic and phylogenetic analysis we demonstrated that this treatment plant is a "hot-spot" for antibiotic resistance diffusion. Indeed, many animals carried multidrug resistant strains initially found at the hospital. In addition, long-reads sequencing approach highlighted that specific resistance plasmids circulated between different enterobacteria species. This "One-Health" project highlighted the importance of better considering the antibiotic resistant bacteria problematic in and around wastewater treatment plants.

Keywords: ESBL, Caribbean, wastewater, IncHI2, *Enterobacteriaceae*, nanopore, One-Health, phylogeny