



**HAL**  
open science

**Effluents hospitaliers : sources de pollution en  
antibiotiques et de résistances bactériennes  
potentiellement transmissibles via un biofilm ? :  
Microbiologie**

Jérôme Ory

► **To cite this version:**

Jérôme Ory. Effluents hospitaliers : sources de pollution en antibiotiques et de résistances bactériennes potentiellement transmissibles via un biofilm ? : Microbiologie. Biochimie [q-bio.BM]. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC111 . tel-02363339

**HAL Id: tel-02363339**

**<https://theses.hal.science/tel-02363339>**

Submitted on 14 Nov 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES*  
*DE LA VIE ET DE LA SANTE, AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT*

N° ordre

*Thèse*

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité

Microbiologie

Soutenue le 9 Octobre 2017

Par

Jérôme ORY

---

**Effluents hospitaliers : source de pollution en antibiotiques et de résistances  
bactériennes potentiellement transmissibles via un biofilm?**

---

**Directeur de thèse : Pr Ousmane Traore**

**Membres :** Pr Estelle Bilak  
Dr Geneviève Bricheux  
Pr Christiane Forestier  
Pr Richard Bonnet  
Pr Christophe Dagot  
Pr Ousmane Traore

**Rapporteurs :** Pr Fabienne Petit  
Pr Xavier Bertrand

Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement UMR CNRS 6023

Faculté de pharmacie, Université Clermont Auvergne

28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand



## Sommaire

<b>Figures</b> .....	4
<b>Tableaux</b> .....	6
<b>Abréviation</b> .....	9
<b>Résumé</b> .....	11
<b>Abstract</b> .....	12
<b>Avant-Propos</b> .....	13

### Introduction bibliographique

<b>1. Carbapénèmes et fluoroquinolones :</b> .....	17
<b>1.1. Historique</b> .....	17
<b>1.2. Evolution de la consommation en antibiotiques en secteurs hospitalier et communautaire</b> .....	18
<b>1.3. Les carbapénèmes</b> .....	19
1.3.1. Structure chimique des molécules.....	19
1.3.2. Spectre d'activité.....	19
1.3.3. Résistance intrinsèque.....	20
1.3.4. Mécanisme d'action .....	21
1.3.5. Pharmacocinétique .....	22
1.3.6. Stabilité de l'imipénème dans l'environnement.....	23
<b>1.4. Les fluoroquinolones (FQ)</b> .....	23
1.4.1. Molécules .....	23
1.4.2. Mécanisme d'action .....	24
1.4.3. Spectre d'action.....	24
1.4.4. Pharmacocinétique .....	25
1.4.5. Stabilité des FQ dans le compartiment aquatique .....	25
<b>2. Antibiotiques et résistance</b> .....	27
<b>2.1. Généralités sur les résistances</b> .....	27
<b>2.2. Mécanismes de résistance spécifiques aux carbapénèmes et FQ</b> .....	27
2.2.1. Carbapénèmes .....	27
2.2.2. Quinolones et fluoroquinolones .....	33



2.3. Résistance par diminution de la perméabilité de la paroi ou augmentation de l'efflux .....	36
2.4. Diffusion de l'antibiorésistance : les éléments génétiques mobiles .....	37
<b>3. Effluent hospitalier et antibiotiques .....</b>	<b>41</b>
3.1. Effluent hospitalier .....	41
3.1.1. Définition.....	41
3.1.2. Volumétrie des effluents hospitaliers .....	42
3.1.3. Caractéristiques physico-chimiques .....	42
3.1.4. Caractéristiques microbiologiques .....	43
3.1.5. Contamination des effluents hospitaliers par les résidus de médicaments et produits toxiques	44
3.2. Risque écotoxicologique des antibiotiques dans les effluents hospitaliers.....	45
3.2.1. Principes généraux de l'évaluation du risque environnemental (ERE).....	45
3.2.2. Définition des Predicted No Effect Concentration (PNEC) ou concentrations prévisibles sans effet des antibiotiques dans les effluents hospitaliers .....	46
3.2.3. Modalités d'estimation de l'exposition aux résidus de médicaments dans l'environnement.....	47
3.3. Quantification des risques environnementaux liés aux résidus médicamenteux .....	50
3.4. Bactéries résistantes aux antibiotiques dans les effluents hospitaliers : rôle des biofilms.....	52
<b>Résultats .....</b>	<b>58</b>
<b>Discussion et Perspectives .....</b>	<b>68</b>



## Figures

<b>Figure 1 :</b> Découverte des antibiotiques et apparition des résistances bactériennes : vers une impasse thérapeutique .....	17
<b>Figure 2 :</b> Evolution de la consommation française d'antibiotiques à l'hôpital de 2000 à 2015)...	18
<b>Figure 3 :</b> Part des différentes classes d'antibiotiques dans la consommation à l'hôpital et comparaison 2000-2015 .....	18
<b>Figure 4 :</b> Structure générale des carbapénèmes .....	19
<b>Figure 5 :</b> Structure de la paroi bactérienne et composition du peptidoglycane .....	21
<b>Figure 6 :</b> Inhibition de la synthèse du peptidoglycane par les bêta-lactamines .....	21
<b>Figure 7 :</b> Analogie de structure entre le D-alanyl-D-alanine et les bêta-lactamines .....	21
<b>Figure 8 :</b> Voie de transformation potentielle de l'amoxicilline .....	23
<b>Figure 9 :</b> Squelette chimique des fluoroquinolones .....	24
<b>Figure 10 :</b> Evolution par mois du nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France entre 2009 et 2015.....	31
<b>Figure 11 :</b> Proportions de carbapénémases selon les principales espèces bactériennes .....	33
<b>Figure 12 :</b> Répartition en Auvergne-Rhône Alpes des épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France entre 2004 et 2015, selon les mécanismes de résistances impliquées .....	33
<b>Figure 13 :</b> Mécanismes de résistances aux quinolones et fluoroquinolones .....	34
<b>Figure 14 :</b> Niveau de résistance par accumulation d'événements mutationnels, avec des mutants de premier niveau, puis de 2 <sup>e</sup> niveau et 3 <sup>e</sup> niveau .....	35
<b>Figure 15 :</b> Dissémination mondiale des gènes de résistances <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapénémase (KPC) - portés par <i>K. pneumoniae</i> et New Delhi metallo-β-lactamase-1-portés par les <i>Enterobacteriaceae</i> . .....	37
<b>Figure 16 :</b> Représentation graphique des principaux gènes des carbapénémases .....	38
<b>Figure 17 :</b> Estimation de la consommation hospitalière d'eau selon l'activité .....	42





<b>Figure 18</b> : Fluctuation journalière du débit et de la température dans l'émissaire d'un hôpital français .....	42
<b>Figure 19</b> : Variation des concentrations de composés pharmaceutiques (AOX (dérivés halogénés), paracétamol, gadolinium et ciprofloxacine) dans les effluents urbains au cours de la journée .....	45
<b>Figure 20</b> : Fluctuation des concentrations de 21 antibiotiques mesurés dans 21 effluents hospitaliers .....	48
<b>Figure 21</b> : Représentation mondiale des plus fortes concentrations de ciprofloxacine (vert), ofloxacine (bleu) et norfloxacine (jaune) détectées dans les effluents hospitaliers (les données de l'ensemble des études sont disponibles en annexe 1) .....	49
<b>Figure 22</b> : Représentation mondiale des plus fortes concentrations de Pénicilline (vert), Céphalosporine (bleu) et Imipénème (jaune) détectées dans les effluents hospitaliers (les données de l'ensemble des études sont disponibles en annexe 1) .....	50
<b>Figure 23</b> : Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) .....	58
<b>Figure 24</b> : Structure générale des POCIS. Les POCIS sont constitués de deux membranes entre lesquelles il y a une phase absorbante .....	58
<b>Figure 25</b> : Résultats préliminaires des proportions de coliformes fécaux résistant au céfotaxime dans les eaux entrantes et sortantes des stations d'épurations dans le monde .....	73



## Tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Valeurs des Concentrations Minimales Inhibitrices à 50 % (CMI <sub>50</sub> ) et à 90% (CMI <sub>90</sub> ) pour quatre carbapénèmes : imipénème, Méropénème, Doripénème et Ertapénème.....	20
<b>Tableau 2 :</b> Effet de combinaisons thérapeutiques avec les carbapénèmes .....	20
<b>Tableau 3 :</b> Paramètres pharmacocinétiques des carbapénèmes administrés par voie intraveineuse.....	22
<b>Tableau 4 :</b> Paramètres pharmacocinétiques des principales fluoroquinolones consommées à l'hôpital (ciprofloxacine, ofloxacine et norfloxacine) .....	25
<b>Tableau 5 :</b> Revue de la littérature du temps de demi-vie des fluoroquinolones dans le compartiment aquatique .....	25
<b>Tableau 6 :</b> Principales carbapénémases acquises et leurs variants et espèces d'entérobactéries les produisant .....	28
<b>Tableau 7 :</b> Variabilité des CMI aux carbapénèmes des souches cliniques d'entérobactéries exprimant une carbapénémase .....	28
<b>Tableau 8 :</b> Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France signalés entre 2004 et 2015 selon les bactéries impliquées .....	32
<b>Tableau 9 :</b> Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France entre 2004 et 2015 selon les mécanismes de résistances.....	32
<b>Tableau 10 :</b> Revue de la littérature des espèces bactéries porteuses de carbapénémases détectées dans les effluents hospitaliers .....	33
<b>Tableau 11 :</b> Revue de la littérature des espèces bactéries porteuses de PMQR détectées dans les effluents hospitaliers .....	36
<b>Tableau 12 :</b> Variation des concentrations des principaux paramètres physiques, chimiques et microbiologiques des effluents hospitaliers .....	42
<b>Tableau 13 :</b> Exemples de concentrations de microorganismes détectés dans les effluents hospitaliers .....	43
<b>Tableau 14 :</b> Concentration moyenne mesurée dans les effluents urbains et les effluents hospitaliers pour les composés pharmaceutiques couramment retrouvés .....	44
<b>Tableau 15 :</b> Facteurs d'extrapolation en fonction des données écotoxicologiques disponibles..	46



<b>Tableau 16 :</b> Données standardisées des bêtalactamines exprimant les concentrations induisant des effets létaux (LC50), des effets toxiques (EC50), des effets d'inhibition (IC50), mais aussi les plus petites concentrations induisant des effets observables (LOEC), ou les concentrations n'induisant pas d'effet observable (NOEC) sur divers espèces .....	47
<b>Tableau 17 :</b> Données standardisées des fluoroquinilones exprimant les concentrations induisant des effets létaux (LC50), des effets toxiques (EC50), des effets d'inhibition (IC50), mais aussi les plus petites concentrations induisant des effets observables (LOEC), ou les concentrations n'induisant pas d'effet observable (NOEC) sur divers espèces.....	47
<b>Tableau 18 :</b> Predicted No Effect Concentration (PNEC) des bêtalactamines et des fluoroquinolones estimées selon les plus faibles Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)..	47
<b>Tableau 19 :</b> Evaluation des concentrations toxiques des mélanges d'antibiotiques sur divers organismes.....	52
<b>Tableau 20 :</b> Liste des antibiotiques induisant à des concentrations sub-inhibitrices, la formation de biofilm par différentes espèces bactériennes .....	53
<b>Tableau 21:</b> Predicted Environmental Concentration (PEC), Predicted No-Effect Concentration (PNEC). Measured Environmental Concentration (MEC) par les POCIS et détermination du Hazard quotient (HQ) pour la norfloxacine et l'ofloxacine.....	60
<b>Tableau 22 :</b> Résultats récapitulatifs des proportions de coliformes fécaux et totaux résistants au céfotaxime sur 5 campagnes .....	73



## Annexes

<b>Annexe 1 :</b> Revue de la littérature des espèces bactéries porteuses de carbapénèmases (BIC, CMY, GES, IMI, IMP, KPC, NDM, OXA, PER, SPM, VIM et association) détectées dans divers environnements aquatiques selon les pays, le mode de sélection avec ou sans antibiotiques (CTX : cefotaxime, MRP : méropénème, CZD : ceftazidime, IMP : imipénème, AMP : ampicilline).....	102
<b>Annexe 2 :</b> Revue de la littérature des espèces bactéries porteuses de gène de résistance aux fluoroquinolones plasmidiques ( <i>aac(6')-lb-cr, oqxAB, qepA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS</i> et association) détectées dans divers environnements aquatiques selon les pays, le mode de sélection avec ou sans antibiotiques (CTX : cefotaxime, , CIP : ciprofloxacine, NOR : norloxacine, OFL : ofloxacine, GAT : gatifloxacine).....	113
<b>Annexe 3 :</b> Concentration des fluoroquinolones détectées dans les effluents hospitaliers.....	122
<b>Annexe 4 :</b> Concentration des bêtalactamines détectées dans les effluents hospitaliers .....	128
<b>Annexe 5 :</b> Communications scientifiques .....	131





## Abréviations

AF	Assessment Factor
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ACT-1	AMPC type betalactamase
BLSE	Bétalactamases à Spectre Etendu
CE50/ CL50	Concentration létale causant 50% de mortalité
CMI	Concentrations Minimales Inhibitrices
CMY-2	Céphamycinase
<i>CphA</i>	Cyanophycin synthetase
CTX-M	Céfotaximase
DBO5	Demande Biochimique en Oxygène sur 5 jours
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DHA-1	Dhahran hospital in Saudi arabia
DHP-1	Déhydropeptidase-1
EPC	Enterobactérie Productrice de Carbapénèmase
EPS	Exopolysaccharides
ERE	Evaluation du Risque Environnemental
ESAC-Net	European Surveillance of Antimicrobial Consumption -Network
FQ	Fluoroquinolone
GES	Guiana Extended Spectrum
HPLC	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
HQ	Hazard Quotient
IMI	Imipénème-hydrolysant les bétalactamases
IMP	Imipenem resistant <i>Pseudomonas</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MBEC	Concentration minimale d'éradication du biofilm
MEC	Measured Environmental Concentration
MS	Matière totale en suspension
NAG	N-acétyl-glucosamine
NAM	N-acétyl-muramique
NDM-1	New Delhi Métallobétalactamase



NMC-A	Non-MétalloCarbapénèmase de la classe A
NOEC	Concentration sans effet observé
OCPs	Pesticides organochlorés
OMPs	Outer Membrane Proteins
ONERBA	Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne
aux Antibiotiques	
OXA	Oxacillinase
PAH	Hydrocarbure polycyclique aromatique
PCB	Polychlorobiphényles
PEC	Predicted Environmental Concentration
PhCs	Produits pharmaceutiques
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
PLP	Protéines de Liaison à la Pénicilline
PMQR	Plasmid Mediated Quinolone Resistance
PNEC	Predicted No Effect Concentration
POCIS	Polar Organic Chemical Integrative Sampler
QR	Quotient Risk
QRDR	Quinolone-Resistance Determining Region
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Mécicilline
SFC	<i>Serratia fonticola</i> Carbapénèmase
SHV	Sulfhydryl-variable
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
SPM-1	Sao Paulo metallo-betalactamase
STEP	Station d'épuration
VIM	Verona integron-encoded metallo-betalactamas



## Résumé

L'anthropisation médicamenteuse des eaux usées favorise l'émergence et la diffusion dans l'environnement de microorganismes résistants aux antibiotiques. Les effluents hospitaliers pourraient être doublement impliqués en véhiculant antibiotiques et bactéries multirésistantes. L'objectif de ce travail est de caractériser les effluents hospitaliers d'un Centre Hospitalo-Universitaire en évaluant simultanément les concentrations d'antibiotiques (fluoroquinolones et imipénème) et la diversité des bactéries résistantes à ces antibiotiques au sein de biofilms constitués *in situ*.

Les concentrations en antibiotiques mesurées par chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse après collecte via un échantillonnage passif pendant 15 jours sont égales à  $2,08 \pm 0,88 \mu\text{g/L}$  (ciprofloxacine),  $101,06 \pm 18,47 \mu\text{g/L}$  (ofloxacine),  $6,43 \pm 0,56 \mu\text{g/L}$  (norfloxacine) et indétectable pour l'imipénème. Comparées aux données de consommation à l'hôpital pendant cette même période, les concentrations estimées sont  $5,84 \pm 1,78 \mu\text{g/L}$  (ciprofloxacine),  $11,22 \pm 1,09 \mu\text{g/L}$  (ofloxacine),  $7,68 \pm 3,7 \mu\text{g/L}$  (norfloxacine) et  $3,61 \pm 0,24 \mu\text{g/L}$  (imipénème). La mesure du risque potentiel écotoxicologique s'est avérée positive pour la ciprofloxacine et la norfloxacine (hazard quotient  $>1$ ).

En parallèle, des bactéries résistantes aux fluoroquinolones ( $n=115$ ) ou aux carbapénèmes ( $n=38$ ) ont été isolées de biofilms formés dans les effluents hospitaliers. 60 % des isolats, constitués majoritairement de bacilles à Gram négatif, notamment *Aeromonas* spp et *Klebsiella* spp, sont résistants à plusieurs familles d'antibiotiques dont certains sont exclusivement utilisés à l'hôpital. La majorité des souches hébergent des éléments génétiques mobiles dont des plasmides conjugatifs porteurs de la résistance à l'imipénème ou aux fluoroquinolones.

La présence combinée de bactéries résistantes aux antibiotiques hébergeant des éléments génétiques mobiles en lien avec ces résistances et de faibles concentrations en antibiotiques permet de qualifier l'interface hôpital-environnement comme un lieu propice au transfert des résistances.

Mot-clefs : Biofilms, Effluent hospitalier, Antibiorésistance, Fluoroquinolone, Carbapénème



## Abstract

The presence of pharmaceutical compounds in waste water favors the emergence and the spreading of antibiotic resistant microorganisms. The hospital effluents could be involved gathering antibiotics and multiresistant bacteria. The aim of this work is to characterize the hospital effluents of a teaching hospital measuring simultaneously the concentrations of antibiotics (fluoroquinolones and imipenem) and the diversity of the bacteria resistant to these antibiotics within hospital effluent biofilms.

The antibiotics concentrations were measured by liquid-phase chromatography - mass spectrometry *via* a passive sampling during 15 days. The measured environmental concentrations were  $2.08 \pm 0.88 \mu\text{g/L}$  (ciprofloxacin),  $101.06 \pm 18.47 \mu\text{g/L}$  (ofloxacin),  $6.43 \pm 0.56 \mu\text{g/L}$  (norfloxacin). Imipenem was not detected. Compared with the data of hospital consumption during the same period, the predicted estimated concentrations are  $5.84 \pm 1.78 \mu\text{g/L}$  (ciprofloxacin),  $11.22 \pm 1.09 \mu\text{g/L}$  (ofloxacin),  $7.68 \pm 3.7 \mu\text{g/L}$ ,  $7.68 \pm 3.7 \mu\text{g/L}$  (norfloxacin) and  $3.61 \pm 0.24 \mu\text{g/L}$  (imipenem). The ecotoxicological risk was confirmed for the ciprofloxacin and the ofloxacin (hazard quotient > 1).

In parallel, fluoroquinolones (n=115) and carbapenem (n=38) resistant bacteria were isolated from hospital effluent biofilm. Sixty % of isolates, mainly composed by Gram negative bacilli in particular *Aeromonas spp* and *Klebsiella spp*, are resistant to several antibiotics among which some are exclusively used at the hospital. The majority of these strains have mobile genetic elements such as conjugative plasmids harboring imipenem or fluoroquinolones resistances.

The presences of both antibiotics resistant bacteria harboring mobile genetic elements in connection with these resistances and low antibiotics concentrations make the hospital effluent a convenient place for the transfer of resistance between the hospital and the environment.

Key words : Biofilms, Hospital effluent, Antibiotic resistance, Fluoroquinolone, Carbapenem





## Avant-propos

Les activités anthropogéniques et industrielles, notamment les systèmes d'évacuation d'eaux usées urbaines et les stations d'épurations (STEP), constituent une source majeure de contamination pour le système aquatique par des micro-polluants organiques et inorganiques tels que les métaux toxiques, les composés organiques hydrophobiques (PCBs, PAHs, OCPs), les bactéries pathogènes multirésistantes et leurs gènes de résistance aux antibiotiques. Dans l'Union européenne (UE), près de 3000 composés pharmaceutiques (PhACs) sont utilisés en médecine humaine, et de nombreuses études ont révélé leur présence dans les eaux usées, ainsi que dans le sol et les eaux potables (P. Verlicchi *et al.*, 2012). Les effluents hospitaliers en sont une source importante, leurs eaux résiduelles sont généralement rejetées directement dans le réseau d'assainissement public avec des charges dangereuses en PhACs - en particulier des antibiotiques - qui par conséquent contribuent à la pollution de l'environnement aquatique (Varela *et al.*, 2013, 2014; Kappell *et al.*, 2015).

En plus des composés PhACs, les effluents hospitaliers sont également une source de bactéries résistantes aux antibiotiques (Slekovec *et al.*, 2012; Bouki, Venieri and Diamadopoulos, 2013; Varela *et al.*, 2013). Dans un environnement hostile, les microorganismes s'organisent généralement sous forme de biofilms. Les biofilms pourraient représenter des environnements extrêmement favorables à la prolifération de souches résistantes aux antibiotiques (Mah and O'Toole, 2001). Au sein du biofilm, le transfert de gènes peut se produire parmi les bactéries d'affiliations taxonomiques différentes par plusieurs mécanismes comme la conjugaison, la transduction, et la transformation naturelle et mobiliser des éléments génétiques tels que plasmides, des transposons, intégrons, îlots génétiques hébergeants des éléments de résistance (Bonot and Merlin, 2010; Merlin *et al.*, 2011). Ceci indique que, une fois qu'ils sont intégrés dans les éléments de transmission avec succès, des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent persister et se propager même en l'absence d'antibiotiques. Les antimicrobiens exercent en continu une pression de sélection sur les bactéries multirésistantes et induisent ou favorisent des transferts horizontaux de gènes entre les membres de la communauté microbienne (Varela *et al.*, 2014; Carraro *et al.*, 2016). Les microorganismes ayant acquis cette résistance peuvent se soustraire du biofilm (Hunt *et al.*, 2004) et se disperser dans l'environnement. En outre, la coexistence d'un nombre élevé de microorganismes d'origine humaine ou environnementale, pourrait augmenter la fréquence des variations génétiques et l'apparition éventuelle de nouveaux mécanismes de résistance introduits



dans l'environnement (Baquero, Martínez and Cantón, 2008). La présence d'antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices faibles pourraient même accélérer le transfert horizontal et la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques (Martinez, 2008).

Les  $\beta$ -lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames) et les fluoroquinolones, constituent les deux familles d'antibiotiques les plus prescrites dans le monde (ECDC). Du fait de l'émergence et la dissémination exponentielle de souches résistantes, toutes ces souches productrices de carbapénèmases ou de résistances aux fluoroquinolones sont également résistantes à d'autres familles d'antibiotiques, que sont le cotrimoxazole, les sulfamides, les aminosides ou encore les tétracyclines.

Une démarche scientifique sur le devenir des effluents hospitaliers ; qui intègre différentes approches (microbiologique, chimique et écotoxicologique) ; est une condition préalable pour estimer le risque global pour la santé et de fournir des indices dans la mise en œuvre d'une politique de prévention. Par conséquent, l'objectif du présent projet est d'analyser le contenu des effluents hospitaliers d'un hôpital public de taille moyenne en ce qui concerne les anti-infectieux plus spécifiquement les carbapénèmes et les fluoroquinolones et la teneur en bactéries résistantes à ces antibiotiques. L'étude de ces effluents hospitaliers comprend trois objectifs principaux : (i) déterminer les concentrations en molécules anti-infectieuses (carbapénèmes/fluoroquinolones) et évaluer les risques écotoxicologiques associés, (ii) caractériser la composition des communautés microbiennes présentes sous forme de biofilms et évaluer les mécanismes de résistance aux carbapénèmes et aux fluoroquinolones, afin d'évaluer leurs capacités de transfert.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous explorons les connaissances actuelles sur les carbapénèmes et les fluoroquinolones. Puis, nous abordons plus précisément les différents mécanismes de résistances à ces antibiotiques et la capacité de diffusion de ces résistances. Enfin, nous caractérisons les effluents hospitaliers en abordant la problématique des biofilms dans ces eaux usées.

La deuxième partie de ce manuscrit expose l'ensemble des travaux réalisés et les résultats obtenus au cours de cette thèse. Un premier travail décrit l'évaluation écotoxicologique des fluoroquinolones dans les effluents hospitaliers et l'étude du biofilm dans ces effluents notamment en caractérisant les bactéries résistantes aux fluoroquinolones. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue « Environmental Pollution ».



Dans le deuxième travail, nous avons recherché la présence de carbapénème et de carbapénèmases dans ces effluents hospitaliers. Ces travaux sont présentés sous la forme d'une publication actuellement en cours de préparation.

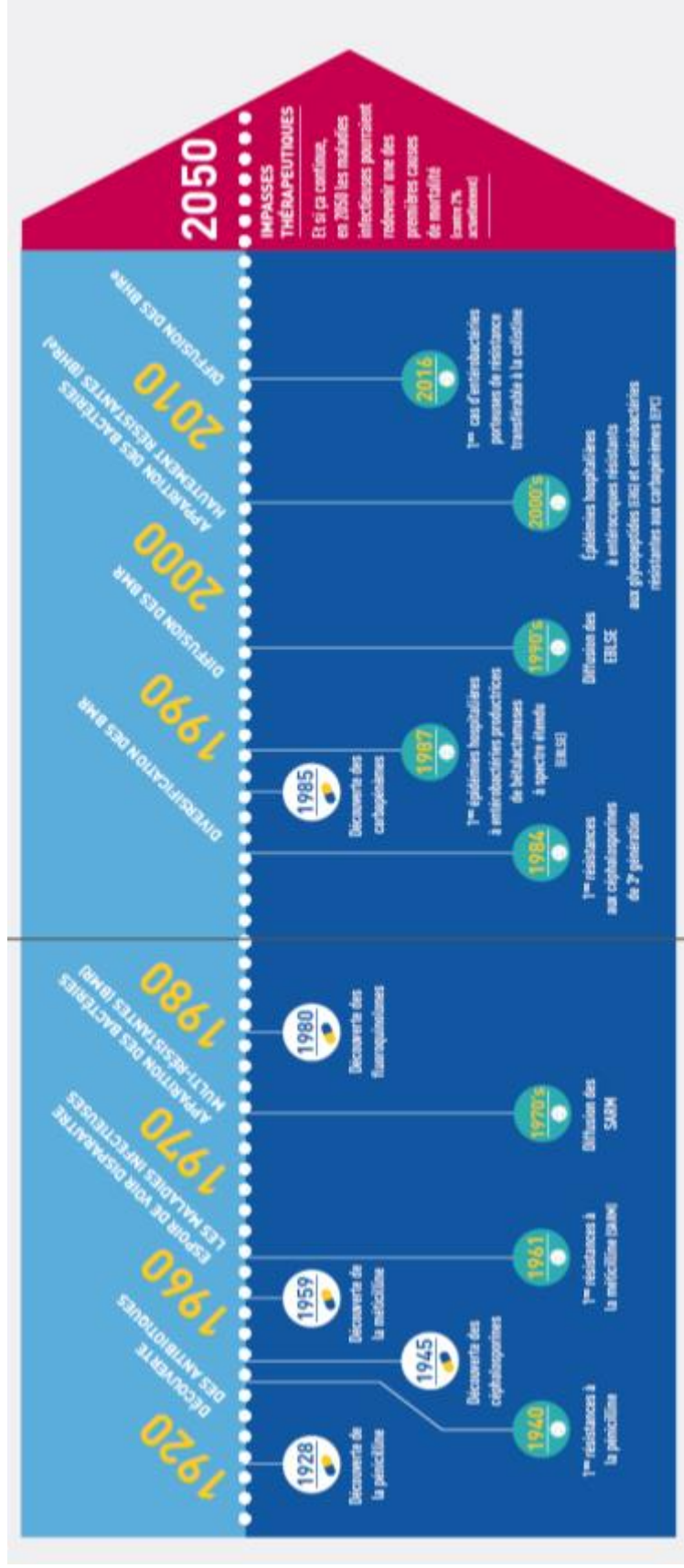
Enfin, la dernière partie du manuscrit est consacrée à une discussion globale de l'ensemble des résultats et à la description des perspectives de ce travail.



# Introduction

## Bibliographique





**Figure 1** : Découverte des antibiotiques et apparition des résistances bactériennes : vers une impasse thérapeutique (InVS, 2014)

# 1. Carbapénèmes et fluoroquinolones :

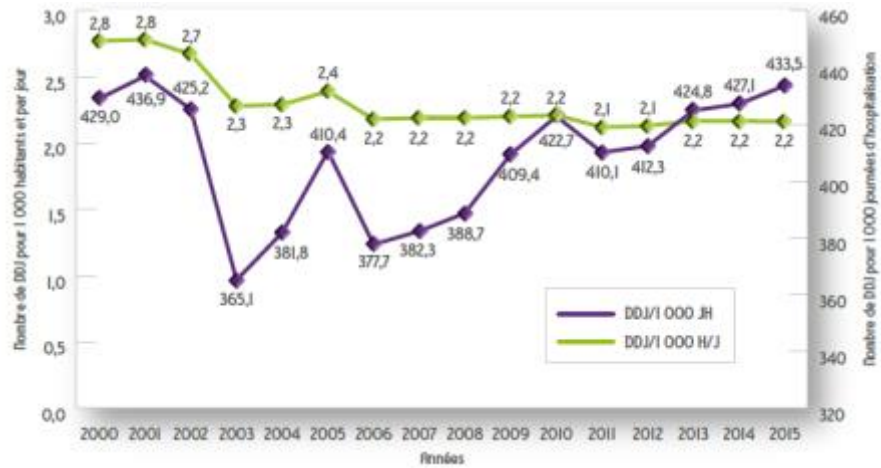
## 1.1. Historique

L'apparition des antibiotiques figure comme la plus grosse avancée thérapeutique de la médecine dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Première cause de mortalité en 1940, les maladies infectieuses sont aujourd'hui responsables de 2 % des décès en France permettant d'augmenter l'espérance de vie d'environ 15 ans.

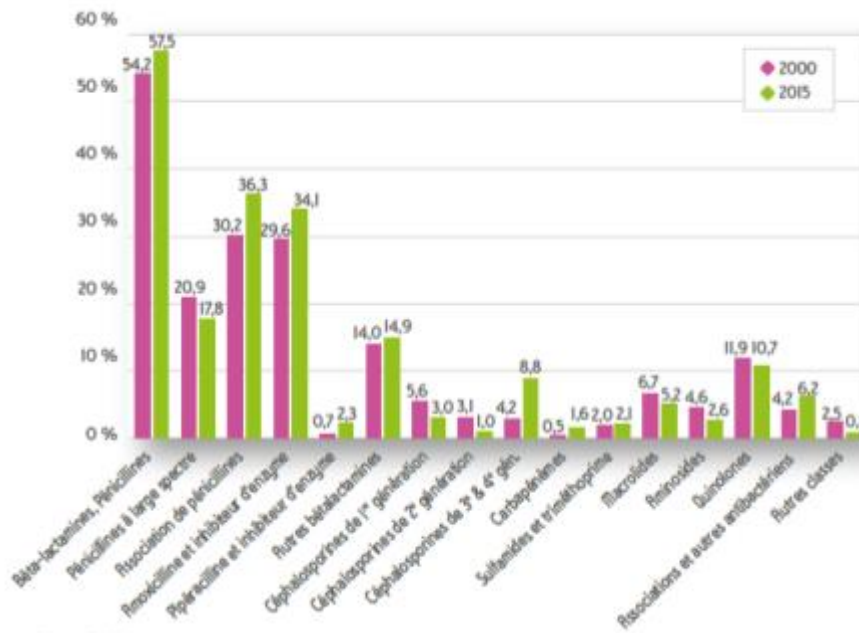
En 1887, le Français Ernest Duchesne fut le premier à remarquer le pouvoir antibactérien des moisissures du genre *Penicillium* et à envisager des possibilités thérapeutiques. Trop avanguardiste, son travail n'eut pas de suite. (Pouillard, 2002) En 1928, à l'hôpital Sainte-Marie de Londres, le docteur Alexander Fleming redécouvrit ce phénomène. Alors qu'il effectuait des recherches sur les staphylocoques, il remarqua dans l'une de ses boîtes de Pétri que les colonies de staphylocoques proches de la moisissure *Penicillium* étaient mortes. Il fut le premier à publier un article sur les effets antibactériens de la pénicilline (Fleming, 1929).

Entre 1941 et 1950, les premiers représentants d'autres familles d'antibiotiques furent découverts : streptomycine, tyrothricine, chloramphénicol, tétracycline. Ces nouvelles molécules ont permis d'élargir le spectre d'activité des antibiotiques et d'améliorer ainsi la lutte contre les maladies infectieuses. Entre 1951 et 1959, environ 40 à 60 nouvelles molécules furent découvertes chaque année.

Dans les années 60, en raison de l'émergence des bactéries productrices de bêtalactamases, la recherche d'inhibiteurs de bêtalactamases devint urgente (Cole, 1980; Reading and Cole, 1986; Rolinson, 1990). C'est seulement en 1976 que le premier inhibiteur de bêtalactamases a été découvert, un acide olivanique produit naturellement par les bactéries à Gram positif du genre *Streptomyces clavuligerus*. Cet acide olivanique possède un « squelette carbapénème » (un carbone en position 1, des substituants en position C2, un C-6 ethoxy et un C3 hybridé) et est actif contre les bêtalactamases (Butterworth et al. 1979; Rolinson 1990). Due à leur instabilité chimique et leur faible pénétration dans les cellules bactériennes, les acides olivaniques n'ont en fait pas été utilisés. Quelques années plus tard, deux autres inhibiteurs de bêtalactamases ont été découverts : l'acide clavulanique provenant de *S. clavuligerus* (Brown et al., 1976; Neu and Fu, 1978), et la thiénamycine provenant de *Streptomyces cattleya* (Kahan et al., 1979). D'autres carbapénèmes ont été aussi identifiés (Papp-Wallace et al., 2011a); cependant la découverte de la thiénamycine a été



**Figure 2 :** Evolution de la consommation française d’antibiotiques à l’hôpital de 2000 à 2015 (exprimée en Dose Définie Journalière pour 1000 habitants et par jour ou pour 1000 journées d’hospitalisation) (ANSM, 2017)



**Figure 3 :** Part des différentes classes d’antibiotiques dans la consommation à l’hôpital et comparaison 2000-2015 (ANSM, 2017)

primordiale. C'est à partir de cette molécule qu'ont été développés les carbapénèmes disponibles aujourd'hui sur le marché.

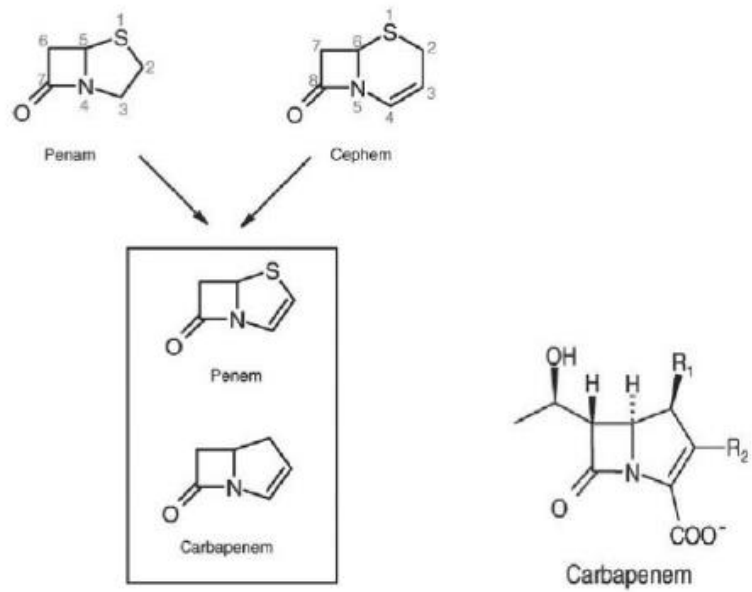
En 1962, Georges Leshner et son équipe, dans un distillat au cours d'une tentative de synthèse de la chloroquine, découvrent les quinolones dérivant de la quinoléine. La première génération des quinolones est apparue sous la forme de l'acide nalidixique utilisé dans le traitement des infections urinaires. Aujourd'hui la majorité des quinolones utilisées en clinique sont des dérivés avec un atome de fluor attaché à la chaîne centrale, en position 6 ou 7 dénommés fluoroquinolones (Van Doorslaer *et al.*, 2014).

Les chercheurs du monde entier n'eurent de cesse de trouver de nouveaux antibiotiques pour améliorer l'efficacité et contrer les phénomènes de résistance qui commençaient à émerger. Cependant, les résistances microbiennes apparaissent plus vite que les nouveaux antibiotiques (figure 1).

## **1.2. Evolution de la consommation en antibiotiques en secteurs hospitalier et communautaire**

Les données de l'agence européenne de surveillance de la consommation antimicrobienne ont montré entre 2011 et 2015 une consommation stable en antibiotiques au niveau du secteur hospitalier (ESAC-Net) n.d.). Une augmentation de la consommation a été constatée pendant cette même période pour deux classes d'antibiotiques : carbapénèmes (dans 6 pays) et polymyxines (dans 8 pays)

En France en 2015, la consommation d'antibiotique se situe au 4<sup>ème</sup> rang européen, très supérieure à la moyenne européenne (ESAC-Net) n.d.). Cette consommation a globalement diminué de 11,4 % entre 2000 et 2015, mais elle est en légère hausse depuis 2010 (Figure 2). Dans le secteur hospitalier, la consommation d'antibiotiques a peu évolué au cours de ces dernières années ; elle représente 7 % de la consommation totale d'antibiotiques. Seule exception notable, les carbapénèmes, dont la consommation reste faible mais a plus que doublé en une dizaine d'années avec une variation de 155%. Il est à noter une diminution de la consommation de quinolones, en progression jusqu'en 2006. Plus de 80% des antibiotiques consommés à l'hôpital appartiennent à deux familles d'antibiotiques, les bêta-lactamines (72.5%) et les fluoroquinolones (10.7%) (figure 3).



**Figure 4** : Structure générale des carbapénèmes (Wolff, Jolyguillou and Pajot, 2008)

### 1.3. Les carbapénèmes

Les bêtalactamines sont divisées en plusieurs sous-groupes : les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes (plus récemment apparus sur le marché) et les inhibiteurs des bêtalactamases.

#### 1.3.1. Structure chimique des molécules

La première molécule apparentée aux carbapénèmes fut la thiénamycine et a servi de structure modèle pour toutes les autres carbapénèmes (Kropp *et al.*, 1980). Elle a démontré un spectre antibactérien large et une activité inhibitrice vis-à-vis des bêtalactamases (Papp-Wallace *et al.*, 2011a). Malheureusement, la thiénamycine est instable en milieu aqueux, sensible aux bases faibles (sous un pH 8), et hautement réactive aux nucléophiles (OH) tels que l'hydroxylamine, cystéine et même les propres amines de la thiénamycine (Kahan *et al.*, 1979). D'autres molécules apparentées à cette première carbapénème ont été développées en raison de cette instabilité chimique (Basker, 1982). La première fut le dérivé *N*-formimidoyl, l'imipénème (Miyadera *et al.*, 1983), un dérivé plus stable que la thiénamycine car moins sensible à l'hydrolyse. S'en suivirent d'autres molécules comme l'ertapénème, le méropénème et le doripénème. Chacune de ces carbapénèmes est constituée d'un noyau bêtalactame fusionné avec un cycle comprenant une liaison insaturée en C2 et C3, et en position 1 un atome de carbone (Figure 4).

La stabilité des carbapénèmes aux  $\beta$ -lactamases est due à la *trans*-orientation des atomes d'hydrogène en C5 et C6 (Basker, Boon and Hunter, 1980) et à la présence d'une chaîne hydroxyethyl en C6 au lieu de la chaîne amino-acyle des pénicillines et des céphalosporines (Dalhoff, Janjic and Echols, 2006; Zhanel *et al.*, 2007). La principale modification structurale pour les plus récentes carbapénèmes ; tel le méropénème, l'ertapénème et le doripénème; est l'ajout d'un groupement méthyl en position Beta 1 et un noyau pyrrolidine en C2 (Papp-Wallace *et al.*, 2011a). Cette modification protège ces carbapénèmes de l'hydrolyse de la déhydropeptidase-1 (DHP-1) (Fukasawa *et al.*, 1992).

#### 1.3.2. Spectre d'activité

Les carbapénèmes possèdent un spectre d'action antimicrobien plus large *in vitro* que les pénicillines, les céphalosporines et les bêtalactamines associées à un inhibiteur des bêtalactamases

**Tableau 1 :** Valeurs des Concentrations Minimales Inhibitrices à 50 % (CMI<sub>50</sub>) et à 90% (CMI<sub>90</sub>) en µg/L pour quatre carbapénèmes : imipénème, méropénème, doripénème et ertapénème (Breilh *et al.*, 2013)

- Tableau 1a : cocci à Gram positif

	Imipenem		Meropenem		Doripenem		Ertapenem	
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i>	≤0.5	≤0.5	0.12	0.12	0.06	0.06	0.12	0.5
Methicillin-susceptible <i>S. epidermidis</i>	.016	0.016	0.12	0.12	0.25	0.25	0.03	0.06
<i>Streptococcus pyogenes</i>	≤0.008	≤0.008	≤0.008	≤0.008	≤0.008	≤0.008	≤0.008	≤0.008
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.016	0.016	0.03	0.06	0.03	0.06	0.016	0.016
<i>Streptococcus pneumoniae</i>								
Penicillin-susceptible	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	<0.08	0.015	0.015
Penicillin-intermediate	0.06	0.12	0.12	0.25	<0.08	0.12	0.12	0.25
Penicillin-resistant	0.5	1	0.5	1	0.5	1	1	2
<i>Enterococcus faecium</i>	1	4	8	16	4	8	8	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	>8	>8	>16	>16	>16	>16	>16	>16

Note: MIC=minimum inhibitory concentration.

- Tableau 1b : bacilles à Gram négatif

	Imipenem		Meropenem		Doripenem		Ertapenem	
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Enterobacteriaceae								
<i>Escherichia coli</i>	≤0.5	≤0.5	0.016	0.03	0.03	0.03	≤0.06	0.06
<i>Escherichia coli</i> ESBL	≤0.5	≤0.5	0.03	0.06	0.03	0.06	≤0.06	0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.25	1	0.03	0.03	0.03	0.06	≤0.06	≤0.06
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	0.5	1	0.03	0.12	0.06	0.12	≤0.06	0.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.5	2	0.03	0.06	0.03	0.06	≤0.015	0.06
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	<0.015	0.03	0.03	0.03	≤0.015	≤0.015
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2	0.06	0.06	0.12	0.25	≤0.06	≤0.06
<i>Serratia marcescens</i>	1	2	0.06	0.06	0.12	0.25	0.03	0.12
<i>Salmonella</i> spp.	≤0.5	≤0.5	0.03	0.03	0.06	0.06	≤0.06	≤0.06
<i>Shigella</i> spp.	≤0.5	≤0.5	0.03	0.3	0.03	0.06	≤0.06	≤0.06
Non-fermenting Gram-negative bacilli								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	>8	0.5	16	0.5	8	>8	>8
<i>Acinetobacter</i> spp.	0.25	0.25	0.25	1	0.25	1	4	>8
Others								
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	4	0.06	0.25	0.12	0.5	0.06	0.12
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0.06	0.12	<0.008	<0.008	0.016	0.03	0.008	0.008

Note: ESBL=extended-spectrum beta-lactamase; MIC=minimum inhibitory concentration.

- Tableau 1c : bactéries anaérobies

	Imipenem		Meropenem		Doripenem		Ertapenem	
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<i>Bacteroides</i> of the <i>fragilis</i> group	0.25	0.5	0.12	0.5	0.5	1	0.25	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0.5	1	0.25	0.5	0.5	1	0.5	2
<i>Prevotella</i> spp.	0.03	0.5	0.12	0.25	0.12	0.25	0.25	4
<i>Fusobacterium</i>	0.12	1	0.03	0.12	0.03	1	0.03	1
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0.03	0.06	0.03	0.12	<0.015	0.06	0.06	0.12
<i>Clostridium perfringens</i>	0.06	0.12	<0.06	<0.06	<0.015	0.03	0.06	0.06
<i>Clostridium difficile</i>	2	4	2	4	0.03	0.06	4	4
<i>Lactobacillus</i> spp.	0.12	8	0.25	>16			2	>16

Note: MIC=minimum inhibitory concentration.

- Tableau 1d : bactéries produisant des bêta-lactamases

	Imipenem		Meropenem		Doripenem		Ertapenem	
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<i>Klebsiella</i> ESBL	0.25	1	0.06	0.06	0.06	0.12	0.06	0.25
<i>Klebsiella</i> AmpC	0.25	0.25	0.03	0.06	0.06	0.06	0.06	0.12
<i>K. oxytoca</i> K1 over-producer	0.25	0.5	0.06	0.06	0.06	0.06	0.03	0.06
<i>Enterobacter</i> repressed AmpC	0.25	0.5	0.06	0.06	0.06	0.12	0.25	1
<i>Enterobacter</i> inducible AmpC	0.5	1	0.03	0.03	0.06	0.06	0.03	0.06
<i>Klebsiella</i> KPC	64	>64	64	>64	16	32	>64	>64
<i>Acinetobacter</i> OXA	>64	>64	32	>64	32	>64	>64	>64

Note: ESBL=extended-spectrum beta-lactamase; KPC=*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MIC=minimum inhibitory concentration; OXA=oxacillinase.



**Tableau 2 :** Effet de combinaisons thérapeutiques avec les carbapénèmes. Une synergie d'action sera indiquée par le signe + et un antagonisme par le signe -. Si aucun effet additif ou délétère n'est démontré le signe +/- est mentionné. (Breilh *et al.*, 2013)

Drug 1	Drug 2	Bacterium (reference[s]) <sup>u</sup>	Effect
Doripenem or imipenem	Vancomycin	MRSA (108, 139)	+
Doripenem	Teicoplanin	MRSA (108)	+
Imipenem	Linezolid	MRSA (94)	+
Imipenem	Teicoplanin	VRSA (76)	+
Meropenem	Levofloxacin	<i>S. pneumoniae</i> (41)	+
Meropenem	Rifampin	<i>S. pneumoniae</i> (60)	-
Imipenem or meropenem	Clavulanic acid	<i>Nocardia brasiliensis</i> (238)	-
Meropenem	Clavulanic acid	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (90)	+
Meropenem	Ciprofloxacin	<i>A. baumannii</i> (54, 169)	+
Imipenem or meropenem	Colistin (and sulbactam)	<i>A. baumannii</i> (54, 169, 188, 198)	+
Meropenem	Sulbactam	<i>A. baumannii</i> (104)	+
Imipenem	Azithromycin	<i>A. baumannii</i> (58)	+
Imipenem	Rifampin	<i>A. baumannii</i> (213)	+
Imipenem	Polymyxin B	<i>A. baumannii</i> (245)	-
Imipenem	Amikacin	<i>A. baumannii</i> (195)	-
Carbapenem	Fluoroquinolone	<i>P. aeruginosa</i> (41, 54, 104, 124, 169, 241)	+
Imipenem	Tachyplesin	<i>P. aeruginosa</i> (37)	+
Meropenem or imipenem	Colistin	<i>P. aeruginosa</i> (37, 54, 169)	+/-
Carbapenem	Aminoglycoside	<i>P. aeruginosa</i> (7, 49, 50, 53, 226)	-
Meropenem	Polymyxin B	<i>P. aeruginosa</i> (75)	-
Imipenem or meropenem	Tobramycin-rifampin	<i>B. cepacia</i> (19)	+
Imipenem or meropenem	Ciprofloxacin	<i>B. cepacia</i> (19)	+
Imipenem	Colistin	MBL <i>K. pneumoniae</i> (215)	+
Imipenem	Tigecycline	ESBL <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i> (32)	-
Imipenem	Gentamicin	ESBL <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. coli</i> (32)	-

(Bassetti *et al.*, 2009). Leurs Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) sont très basses vis à vis de la majorité des bactéries à Gram positif (+), négatif (-) et des bactéries anaérobies, y compris la quasi-totalité des souches productrices de bêtalactamases (Bradley *et al.*, 1999). Les CMI du doripénème et du méropénème sont 4 à 8 fois plus faibles que celles de l'ertapénème et de l'imipénème pour la plupart des bactéries à Gram négatif (Nix, Majumdar and DiNubile, 2004; Bassetti *et al.*, 2009) (Tableau 1). Chez les bactéries à Gram positif, l'imipénème, le panipénème et le doripénème sont de puissants antibiotiques (Rodloff, Goldstein and Torres, 2006; Bassetti *et al.*, 2009; Queenan *et al.*, 2010). Vis à Vis des streptocoques, l'activité du doripénème et de l'imipénème est comparable mais plus élevée pour l'ertapénème (Breilh *et al.*, 2013).

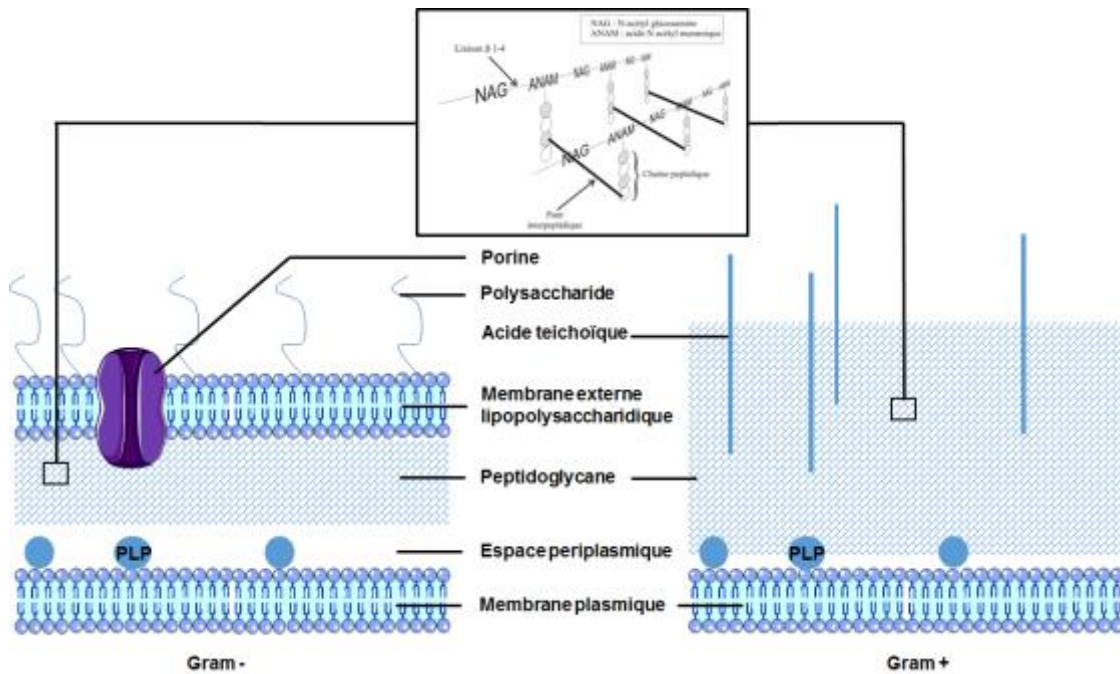
Des différences importantes sont à noter : l'ertapénème a un spectre d'activité plus limité car il n'est pas actif sur *Pseudomonas aeruginosa* contrairement à l'imipénème ou au méropénème (Oliver *et al.*, 2004). Le méropénème et l'ertapénème sont moins puissants que l'imipénème ou le doripénème contre *Acinetobacter baumannii* (Oliver *et al.*, 2004). Par ailleurs, le doripénème est moins sensible à l'hydrolyse des carbapénémases que les autres molécules de cette famille; l'hydrolyse du doripénème est 2 à 150 fois plus faible que l'imipénème (Queenan *et al.*, 2010).

En association avec l'acide clavulanique, le méropénème possède une efficacité clinique sur les infections à *Mycobacterium tuberculosis*. Cette bactérie est habituellement résistante aux bêtalactamines par la production de bêtalactamases chromosomiques (Hugonnet *et al.*, 2009).

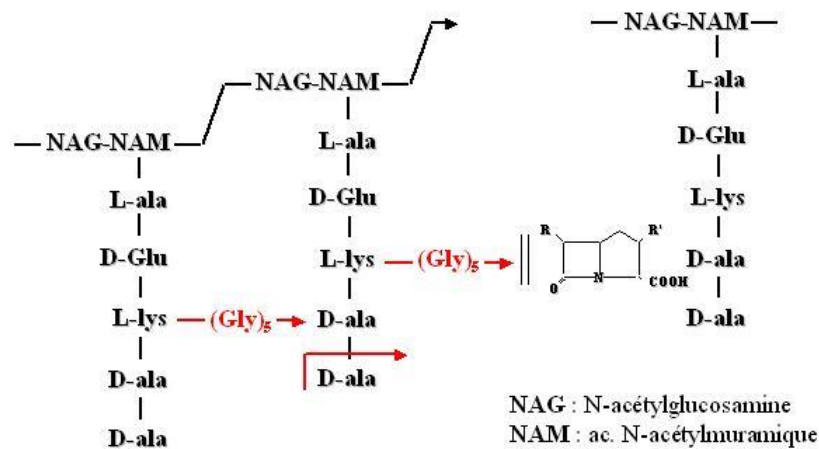
### 1.3.3. Résistance intrinsèque

Les carbapénèmes peuvent être aussi associées à d'autres antimicrobiens dans le traitement d'infections sévères notamment depuis l'émergence de pathogènes résistants à plusieurs familles d'antibiotiques (Papp-Wallace *et al.*, 2011a). Une liste de diverses combinaisons d'antibiotiques testés *in vitro* est présentée sur le tableau 2. Certaines associations démontrent des effets bénéfiques, tels que l'élargissement du spectre d'action ou des effets additifs ou une synergie d'action.

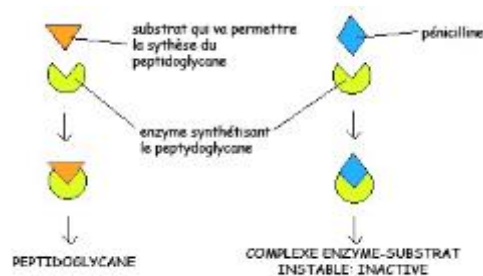
Les carbapénèmes sont inactifs envers plusieurs genres bactériens comme les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas spp*, les Mycobactéries, les bactéries intracellulaires (*Legionella spp*, *Chlamydia spp*,..) et les corynebactéries.



**Figure 5 :** Structure de la paroi bactérienne et composition du peptidoglycane (Cavallo *et al.*, 2004)



**Figure 6 :** Inhibition de la synthèse du peptidoglycane par les bêta-lactamines



**Figure 7 :** Analogie de structure entre le D-alanyl-D-alanine et les bêta-lactamines

Cette inefficacité est due à une résistance naturelle ou intrinsèque. Les mécanismes impliqués sont le plus souvent un défaut de pénétration intrabactérienne ou l'inactivation par des systèmes enzymatiques bactériens. Certaines espèces bactériennes, notamment les non-fermentatives, possèdent des carbapénémases chromosomiques intrinsèques. La plus répandue est la carbapénémase de la classe B, notamment les espèces *Stenotrophomonas maltophilia*, *Myroides (Flavobacterium) odoratum*, *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*, *C. indologenes*, *Aeromonas hydrophilia*, *A. sobria*, *A. salmonicida*, *Legionella gormanii* et *Bacillus cereus* (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Chaque enzyme est différente au niveau structural et donc en terme d'activité. L'enzyme de *S. maltophilia* possède 4 sous unités identiques, tandis que les autres types sont des polypeptides (Rasmussen and Bush, 1997). Les enzymes produites par *Aeromonas spp* (céphalosporinases de classe C (cphA), ou des pénicillinases D actives) entraînent une résistance aux carbapénèmes (imipénème et méropénème) (Rossolini and Walsh, Timothy amicosante, 1996) mais les bactéries restent relativement sensibles aux autres bêtalactamines. La relation entre le portage de carbapénémases chromosomiques et la résistance aux carbapénèmes est souvent imparfaite, spécialement pour les *Aeromonas* qui peuvent apparaître sensibles *in vitro* mais acquérir des résistances *via* des mutations qui dérèglent la régulation des carbapénémases (Shannon, King and Phillips, 1986).

#### 1.3.4. Mécanisme d'action

À l'instar des autres  $\beta$ -lactamines, les carbapénèmes exercent leur activité bactéricide en inhibant la synthèse du peptidoglycane en se liant aux transpeptidases également appelées Protéines de liaison à la Pénicilline (PLP). Ces enzymes participent à l'étape de polymérisation des sous unités du peptidoglycane, la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM) liés par des liaisons osidiques (figure 5). Cette liaison a lieu en raison d'une analogie structurale entre les bêtalactamines et le D-alanyl-D-alanine à l'extrémité du précurseur du NAM/NAG peptide (Figure 6). Ce qui entraîne une liaison irréversible du noyau bêtalactame sur le résidu SER403 des transpeptidases. (Figure 7). La conséquence de cette interaction moléculaire est l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et la dissolution du peptidoglycane existant par des hydrolases (autolysines). Il en résulte une activité bactéricide.

Les différences d'activité des carbapénèmes s'expliquent par leur affinité de liaison avec les différentes PLP. Ainsi, chez *Escherichia coli*, l'imipénème se lie deux à quatre fois plus aux PLP

**Tableau 3 :** Paramètres pharmacocinétiques des carbapénèmes administrés par voie intraveineuse (IV) [[www.theriaque.org](http://www.theriaque.org), [www.drugs.com](http://www.drugs.com), [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca).]

	<b>Dose administrée (mg)</b>	<b>Mode d'administration</b>	<b>Posologie</b>	<b>% urines</b>	<b>% fèces</b>
<b>Imipénème</b>	250	IV	IV :1g / 8H ou	70-80	<1
	500		500 mg / 6h IM :1 à 1.5g/24h		
<b>Méropénème</b>	1000	IV	1g/8h	50-75	2
<b>Ertapénème</b>	100	IV	0.5g/24h	44-52	10
<b>Doripénème</b>	250	IV	0.5g/24h	71-75	<1
	500				

**Tableau 4 :** Paramètres pharmacocinétiques des principales fluoroquinolones consommées à l'hôpital (ciprofloxacine, ofloxacine et norfloxacine) selon deux voies d'administration (Per Os (PO) et Intraveineux (IV)) [www.theriaque.org, www.drugs.com, www.drugbank.ca.]

	<b>Dose administrée (mg)</b>	<b>Mode d'administration</b>	<b>Posologie habituelle</b>	<b>% urines</b>	<b>% fèces</b>
<b>Ciprofloxacine</b>	750	PO	2*750mg	35-50	20-35
	500	PO	2*500mg	35-50	20-35
	200	IV	2*200mg	35-50	20-35
	400	IV	2*400mg	50-70	15-15,20
<b>Ofloxacine</b>	200	IV	2*200 mg	65-80	<1
	200	PO	2*200 mg	65-80	<1
<b>Norfloxacine</b>	400	PO	2*400mg	35-40	60-65

**Tableau 5 :** Revue de la littérature du temps de demi-vie des fluoroquinolones dans le compartiment aquatique et sédimentaire

Molécule	Milieu de biodégradation ou dégradation testé	T <sub>1/2</sub> (jours <sup>-1</sup> )	Références
<b>Ciprofloxacin</b>	En l'absence de lumière	177	(Barra Caracciolo <i>et al.</i> , 2016)
	Eau et lumière	18,4	
	Rivière (bactéries plus lumière)	10,4	
	Eau douce	363	(Baena-Nogueras, González-Mazo and Lara-Martín, 2017)
	Eau salée	212	
	Biotique condition fresh activated sludge	<32	(Girardi, Greve, Lamshöft, <i>et al.</i> , 2011)
	Test de bouteille fermée (Closed Bottle test)	>40	(Kümmerer, Al-Ahmad and Mersch-Sundermann, 2000)
<b>Ofloxacin</b>	Test de bouteille fermée (Closed Bottle test)	>40	(Kümmerer <i>et al.</i> 2000)
	Test de bouteille fermée (Closed Bottle test)	7,5	(Alexy, Kämpel and Kümmerer, 2004)
	<b>Norfloxacin</b>	Eau douce	378
Eau salée		192	

la et1b que les autres carbapénèmes malgré une affinité spécifique du doripénème (Yang, Bhachech and Bush, 1995). L'affinité des PLP2A est élevée pour l'ensemble des carbapénèmes spécialement le doripénème. Pour les PLP3A, le méropénème a l'affinité la plus élevée, suivi du doripénème et de l'imipénème. Pour les PLP5 et les PLP6, leurs affinités de liaison sont les plus fortes avec l'imipénème et le méropénème respectivement (Yang, Bhachech and Bush, 1995; Davies *et al.*, 2008; Nicolau, 2008; El-Gamal *et al.*, 2017).

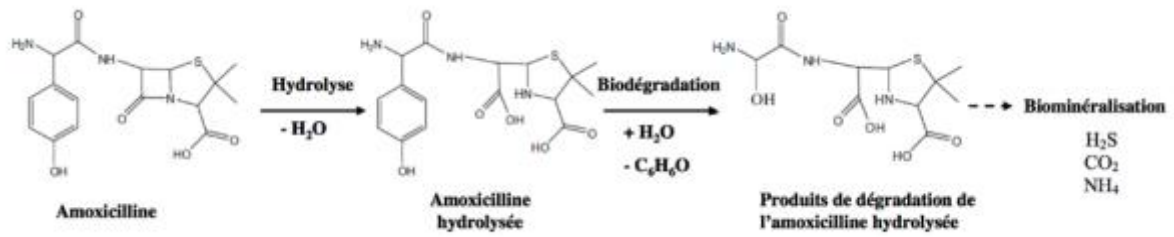
### 1.3.5. Pharmacocinétique

Les carbapénèmes sont des antibiotiques à usage strictement hospitalier (à l'exception de l'hospitalisation à domicile). Leurs posologies sont variables selon les molécules (Tableau 3).

Les carbapénèmes sont tous administrés par voie parentérale (majoritairement par voie intraveineuse, intramusculaire pour l'imipénème ou sous-cutanée pour l'ertapénème (hors AMM)). La phase d'adsorption est donc totale (100%), puisque l'antibiotique se retrouve directement dans la circulation sanguine. Excepté leurs temps de demi-vie, les paramètres pharmacocinétiques sont similaires sans aucune accumulation pour un patient avec une fonction rénale normale (Bradley *et al.*, 1999). La liaison aux protéines sériques est faible (2 à 9%) sauf pour l'ertapénème (92-95%). La demi-vie sérique est courte d'environ 1 heure pour l'imipénème, le méropénème et le doripénème et de 4 heures pour l'ertapénème. Leur diffusion tissulaire est bonne sauf au niveau du liquide céphalorachidien. Les carbapénèmes sont très peu métabolisés au niveau du foie. Certains carbapénèmes, notamment l'imipénème, sont principalement métabolisés par la déhydropeptidase-1 (DHP-1) produite au niveau de l'épithélium des tubules contournés proximaux. C'est pourquoi la cilastatine - un inhibiteur spécifique - est toujours associée à l'imipénème afin de maintenir un taux antibactérien suffisant dans l'urine. Méropénème, ertapénème et doripénème ont un substrat méthyl en position C1, protecteur vis-à-vis de l'action du DHP-1 et ils sont donc administrés sans inhibiteur de la DHP-1 (Papp-Wallace *et al.*, 2011a).

Approximativement 70% du méropénème et de l'imipénème en présence de cilastatine sont excrétés au niveau rénal. A peu près 80% de la dose d'ertapénème est retrouvée dans les urines avec majoritairement l'ertapénème (38%) et ses métabolites (37%). Pour le doripénème, environ 98% des doses administrées sont retrouvés dans les urines dont 80% du composé mère [www.theriaque.org, www.drugs.com, www.drugbank.ca].





**Figure 8 :** Voie de transformation potentielle de l'amoxicilline (Längin *et al.*, 2009)

### 1.3.6. Stabilité de l'imipénème dans l'environnement

Si la stabilité des carbapénèmes est connue dans l'organisme humain, elle est très rarement décrite dans le compartiment aquatique. Plus globalement, les bêtalactamines sont considérées comme des molécules très instables dont l'hydrolyse est le principal responsable de l'inactivation (Deshpande, Baheti and Chatterjee, 2004). Les produits d'hydrolyse sont alors transformés par biodégradation (clivage du groupement phénol) puis biominéralisation (Figure 8). Toutefois, une autre voie de transformation de l'amoxicilline impliquant une hydrolyse et des réactions d'épimérisation seraient possibles lors du traitement des eaux usées en stations d'épuration (Pérez-Parada *et al.*, 2011).

L'étude de Baron (Baron and Hindler, 1984) est une des seules à avoir évalué la stabilité de l'imipénème, plus précisément sa bioactivité, à différentes températures et dans différents milieux de culture. Ainsi, la dégradation complète de l'imipénème est obtenue après seulement 3 jours à 25°C et 7 jours à 35°C. Lorsque l'imipénème est reconstitué dans différentes solutions, sa stabilité est estimée à 4 heures à 25°C et 24 heures à 4°C. Pour le méropénème, le temps de demi-vie est évalué à 52 heures (Al-Ahmad, Daschner and Kümmerer, 1999).

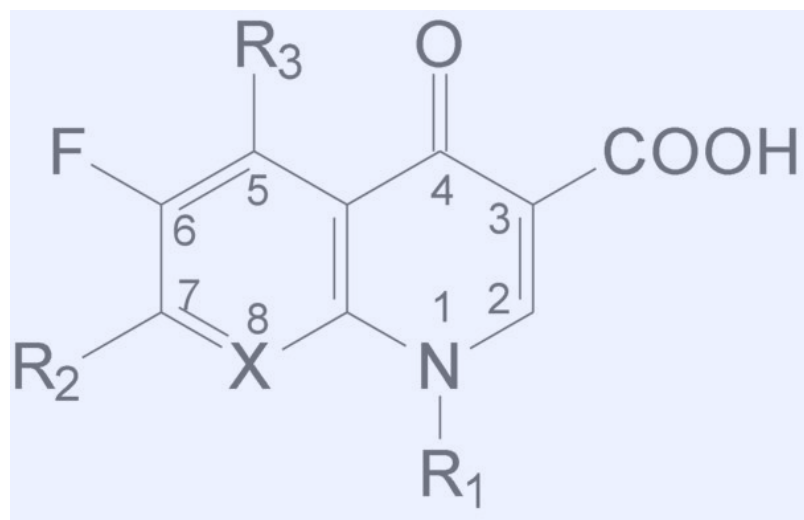
Une autre voie de dégradation possible est la dégradation enzymatique en lien avec la production par certaines bactéries d'enzymes (bêta-lactamases) capables de scinder le cycle bêtalactame. Ces enzymes seront détaillées dans la partie antibiorésistance (Alexander, 1981).

## 1.4. Les fluoroquinolones (FQ)

### 1.4.1. Molécules

La majorité des quinolones et les fluoroquinolones (FQ) sont des dérivés de type bicyclique (Van Doorslaer *et al.*, 2014). Elles possèdent en commun un noyau pyridine B carboxylique dont l'azote en position 1 est substitué par un groupement variable conférant aux molécules leur activité bactéricide et leurs paramètres pharmacocinétiques. Les fluoroquinolones diffèrent des quinolones par le remplacement de l'atome de carbone 8 du squelette par un atome d'azote et l'addition d'un atome de fluor à la position 6, élargissant le spectre d'action (Figure 9).

L'atome de fluor en position 6 sur les quinolones définit les fluoroquinolones. Au niveau des positions 2, 3, et 4, les groupements chimiques définissent le pouvoir antibactérien en influençant l'affinité de ces molécules avec leurs cibles bactériennes.



**Figure 9** : Squelette chimique des fluoroquinolones (Quesada, Paschoal and Reyes, 2013)

Les quinolones historiques “urinaires” (ac. nalidixique, ac. pipémidique, ac. oxolinique...) sont aujourd’hui tombées en désuétude, et ce sont les fluoroquinolones qui sont aujourd’hui majoritairement utilisées. On distingue les FQ de première génération (G1) essentiellement utilisées dans le traitement des infections urinaires dues à des bacilles à Gram négatif (norfloxacin). Les FQ de deuxième génération sont à usage polyvalent ; elles incluent péfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacine... Les FQ de troisième génération ont un spectre d’action plus large, notamment sur les streptocoques et les “atypiques” (lévofloxacine). La dernière lignée apparue est les FQ de quatrième génération avec un spectre d’action étendu aux anaérobies strict (moxifloxacine). Les principales fluoroquinolones prescrites dans les hôpitaux sont la ciprofloxacine, l’ofloxacin, la lévofloxacine et la norfloxacin (ATB-RAISIN, 2008).

#### 1.4.2. Mécanisme d’action

Les fluoroquinolones agissent en inhibant deux enzymes impliquées dans la réplication de l’ADN bactérien, les topoisomérases IV et l’ADN gyrase. Les fluoroquinolones bloquent la réaction catalysée par l’enzyme en piégeant l’ADN gyrase ou la topoisomérase sur l’ADN en formant un complexe létal antibiotique-enzyme-ADN, suivi de la libération consécutive de fragments d’ADN double brin (Drlica et al., 2008). La réplication de l’ADN bactérien est ainsi bloquée par le complexe formé. La bactérie peut alors activer des mécanismes de réparation comme le système SOS, mais quand la concentration en antibiotique est suffisamment élevée, un processus d’autolyse débute et entraîne la mort cellulaire ; l’effet bactéricide est concentration dépendant (Pintilie, 2012).

#### 1.4.3. Spectre d’action

Les quinolones ont une action antimicrobienne limitée aux entérobactéries. Les fluoroquinolones sont des antibiotiques à large spectre. Les fluoroquinolones G1 et G2 ont un spectre d’action plus élargi notamment sur les cocci à Gram +, les bactéries intracellulaires (*L. pneumophila*, *Mycoplasmes*, *Chlamydia spp.* *Coxiella burnetii*) et *P.aeruginosa* (ciprofloxacine). Les fluoroquinolones de G3 et G4 ont quant à elles une action supplémentaire sur les streptocoques (*S. pneumoniae*), les entérocoques (*E. faecium* et *E faecalis*) et les bactéries anaérobies (*Clostridium perfringens* ou *Bacillus fragilis*) (Van Bambeke et al., 2005; Van Doorslaer et al., 2014).



Des résistances naturelles aux fluoroquinolones ont été décrites. Les streptocoques et entérocoques sont naturellement résistants aux fluoroquinolones de première génération. D'autres espèces comme *Stenotrophomonas maltophilia* et *Listeria monocytogenes* présentent aussi des résistances innées aux fluoroquinolones.

#### 1.4.4. Pharmacocinétique

La biodisponibilité des FQ varie selon la voie d'administration (orale ou intraveineuse) et la molécule (Tableau 4). Elle est d'environ de 60% pour la ciprofloxacine et de 90% pour l'ofloxacine. Les fluoroquinolones ont d'excellentes propriétés pharmacocinétiques avec une excellente absorption et diffusion tissulaire, encourageant leur utilisation dans de nombreux syndromes cliniques, de l'infection urinaire à la méningite bactérienne (Ball, 2000; Van Bambeke *et al.*, 2005; Bolon, 2009). Leur liaison aux protéines plasmatiques n'est pas très élevée. Les demi-vies plasmatiques sont en moyenne de 4 heures, mais plus longues pour les fluoroquinolones de dernière génération comme la moxifloxacine (10h) [www.theriaque.org, www.drugs.com, www.drugbank.ca.]. La majorité des fluoroquinolones est éliminée par les reins, sauf la moxifloxacine qui est éliminée majoritairement par la voie hépatique.

#### 1.4.5. Stabilité des FQ dans le compartiment aquatique

Les fluoroquinolones sont considérées comme des structures chimiques stables dans l'environnement. Ces antibiotiques sont qualifiés de contaminants persistants selon la classification de Hollis ; par exemple ils ont été détectés dans une carotte sédimentaire qui date de 50 ans dans un fleuve fortement anthropisé (Seine, France) (Tamtam *et al.*, 2011).

Cette grande stabilité s'explique par une absence de biodégradation. Quelques études ont rapporté que les fluoroquinolones (ciprofloxacine) n'étaient vraisemblablement pas biodégradables, avec une diminution de 50% de la concentration initiale après 100 jours (Al-Ahmad, Daschner and Kümmerer, 1999; Brown *et al.*, 2006; Watkinson *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010). L'ofloxacine est retrouvée jusqu'à environ 3 cm de profondeur dans le sédiment où elle persiste avec un temps de demi-vie de 21,4 jours (Clothilde Boillot, 2008). La photodégradation a été décrite comme la principale voie de transformation de la ciprofloxacine, (Andreozzi, Raffaele and Nicklas, 2003; Sturini *et al.*, 2009, 2012a; Amorim *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2015). En absence de photolyse, l'adsorption devient le processus majoritaire de l'élimination de la ciprofloxacine (Giger *et al.*,



2003; Golet *et al.*, 2003; Lindberg *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2009; Zuccato *et al.*, 2010; Githinji, Musey and Ankumah, 2011).

Les fluoroquinolones sont moins persistantes dans le sol que dans le compartiment aquatique, avec une dégradation de 50% estimée à 32 jours et une légère minéralisation à 93 jours. Il a également été démontré que l'activité antimicrobienne de la ciprofloxacine est plus élevée au niveau aquatique que dans le sol. Ces résultats sont attribués aux phénomènes d'adsorption du sol, qui rend les molécules moins biodisponibles et donc moins toxiques pour les microorganismes (Girardi, Greve, Lamssoft, *et al.*, 2011). La stabilité des principaux antibiotiques est présentée dans le tableau 5:

Quelques études ont montré que certains microorganismes étaient capables de métaboliser les fluoroquinolones (ciprofloxacine). Les bactéries appartenant à l'espèce *Labrys portucalensis* sont capables de dégrader la ciprofloxacine ainsi que d'autres fluoroquinolones comme l'ofloxacine et la norfloxacine (Amorim *et al.*, 2014).





## **2. Antibiotiques et résistance**

### **2.1. Généralités sur les résistances**

Le rapport de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) de 2014 – le premier portant sur la résistance aux antimicrobiens, dont la résistance aux antibiotiques à l'échelle mondiale – indique que l'antibiorésistance est une réelle menace de santé publique dans chacune des régions du monde. Dans les pays où ces médicaments sont délivrés sans ordonnance pour l'homme ou l'animal, le problème de l'émergence et de la propagation des résistances est encore pire. Mais dans les pays pourvus de guides thérapeutiques normalisés, les antibiotiques sont malgré tout souvent prescrits de manière excessive par les agents de santé et les vétérinaires. Cette antibiothérapie favorise l'émergence d'antibiorésistance, que ce soit par défaut de pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, inactivation ou excrétion de l'antibiotique par des systèmes enzymatiques bactériens ou diminution d'affinité entre cible bactérienne et antibiotique (Nordmann *et al.*, 2010). Elle favorise aussi la diffusion de cette antibiorésistance parmi les humains, les animaux et dans l'environnement. Le traitement des maladies infectieuses courantes devient plus difficile, voire impossible parfois, du fait de la perte d'efficacité des antibiotiques (Van Boeckel *et al.*, 2014).

Le 27 février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié une liste «d'agents pathogènes prioritaires» résistants aux antibiotiques, énumérant les 12 familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. Trois familles d'antibiotiques sont clairement identifiées : les fluoroquinolones, les bêtalactamines (carbapénèmes et les céphalosporines de troisième génération) et les aminosides. Nous nous intéresserons aux résistances des fluoroquinolones et aux résistances des bêtalactamines plus particulièrement des carbapénèmes.

### **2.2. Mécanismes de résistance spécifiques aux carbapénèmes et FQ**

#### **2.2.1. Carbapénèmes**

##### **2.2.1.1. Mécanismes de résistances**

Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes intègrent la production de bêtalactamases, l'activation de pompes à efflux, l'expression et/ou les fonctions des porines et la modification des PLPs. Le plus couramment retrouvé est la production de bêtalactamases couplée à un déficit ou une altération de porines. La combinaison de ces mécanismes peut entraîner un haut niveau de

**Tableau 6 :** Principales carbapénèmases acquises et leurs variants et espèces d'entérobactéries les produisant (Tzouveleakis *et al.*, 2012)

Type	Variants	Espèces
KPC	KPC-2 à -15	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Raoultella</i> spp.
VIM	VIM-1, -2, -4, -5, -6, -11, -12, -13, -19, -23, -24, -25, -26, -27, -32	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
IMP	IMP-1, -3, -4, -6, -8, -11, -24, 27	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>M. morganii</i>
NDM	NDM-1, -4, -5, -6, -7	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>K. oxytoca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>M. morganii</i> , <i>Providencia</i> spp.
OXA	OXA-48, -162, -163, -181, -204, -232	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. mirabilis</i>

**Tableau 7 :** Variabilité des CMI aux carbapénèmes des souches cliniques d'entérobactéries exprimant une carbapénèmase (Nordmann and Carrer, 2010)

	CMI (mg/L)		
	Imipénème	Méropénème	Ertapénème
Entérobactéries KPC	0,5 ; >64	1 ; 64	0,5 ; >64
Entérobactéries MBL	0,5 ; >64	0,25 ; >64	0,5 ; >32
Entérobactéries OXA-48	1 ; >64	0,5 ; 64	4 ; >64

résistance dans certaines bactéries, tels que *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, et *A. baumannii* (Nordmann and Carrer, 2010). En fonction du substrat hydrolysé, les bêtalactamases sont des pénicillinases, des céphalosporinases, des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) ou encore des carbapénémases. Les carbapénémases représentent la famille la plus versatile des bêtalactamases, capables d'hydrolyser les carbapénèmes et les autres bêtalactamines, contrairement aux autres bêtalactamases à l'exception de certaines céphalosporinases. Depuis leur découverte, ces enzymes ont été décrites dans de nombreuses espèces bactériennes (Anne Marie Queenan and Bush, 2007; Walsh, 2008, 2010) (Tableau 6). Plusieurs classifications de carbapénémases existent, la plus couramment utilisée est la classification d'Ambler qui les répartit en 4 classes moléculaires A, B, C et D (Ambler, 1980). Les carbapénémases de la classe A, C et D sont des enzymes serine-actives qui forment une liaison estérifiée avec l'enzyme. La serine agit comme le nucléophile qui hydrolyse la liaison C-N du noyau bêtalactame. La classe B regroupe les métallo-bêtalactamases, qui sont activées après liaison avec une molécule d'eau et un cation divalent ( $Zn^{2+}$ ) ce qui permet alors de rompre le noyau bêtalactame.

Les carbapénémases de classe A sont les plus fréquemment isolées parmi les *Enterobacteriaceae* et chez *Pseudomonas aeruginosa*. Les enzymes les plus couramment retrouvées sont KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMI (imipénème-hydrolysant les bêtalactamases), SME (*Serratia marcescens* enzyme), SFC (*Serratia fonticola* carbapenemase), NMC-A (non-métallocarbapénémase de la classe A) et GES (Guiana extended spectrum betalactamases) (Henriques *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006a; Thomson, 2010). Un des attributs unique des carbapénémases de la classe A est la présence de liaisons bisulfites qui modifie la conformation du site actif en altérant la distance entre les résidus du site actif.

La plus fréquemment isolée des carbapénémases de la classe A est la carbapénémase de type KPC avec des variants allant de KPC-2 à KPC-8 (Nordmann, Cuzon and Naas, 2009). La première carbapénémase KPC (KPC-1) fut identifiée dans un isolat clinique de l'espèce *K. pneumoniae* en 1996, aux États-Unis (Yigit *et al.*, 2001). KPC-2 hydrolyse toutes les bêtalactamines bien que les céphamycines et la ceftazidime soient de mauvais substrats. Son activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. En l'absence de mécanisme de résistance associé, cette résistance confère des degrés variables de résistance aux carbapénèmes (Tableau 7). Le plus souvent, les souches productrices de KPC expriment également d'autres bêtalactamases comme des bêtalactamines à spectre étendu (BLSE) (TEM, SHV, CTX-M) et possèdent un certain degré



de résistance par imperméabilité (Nordmann and Carrer, 2010). Les souches KPC apparaissent donc le plus souvent multirésistantes aux bêta-lactamines, l'ertapénème étant la carbapénème vis-à-vis duquel le niveau de résistance est le plus élevé (Nordmann and Carrer, 2010).

Les carbapénèmases GES appartiennent aussi à la classe A. Elles ont été décrites pour la première fois en 2000 dans un IBC-1 (intégron-borne cephalosporinase) de souches d'*E. cloacae* isolées en Grèce (Giakkoupi *et al.*, 2000) et en Guyane Française GES-1 (Poirel *et al.*, 2000). Les enzymes GES-4, GES-5 et GES-6 hydrolysent faiblement les carbapénèmes. GES-2 a une structure similaire à une BLSE nommée GES-1 avec comme différence une simple substitution d'acide aminé modifiant le spectre d'action de l'enzyme. Ces enzymes sont présentes en grande majorité chez les bactéries à Grams négatifs, incluant, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, et *Klebsiella pneumoniae* (Poirel *et al.*, 2000; Anne Marie Queenan and Bush, 2007; Poirel, Pitout and Nordmann, 2007; Bonnin *et al.*, 2011).

Les carbapénèmases appartenant à la classe B sont des métallobêta-lactamases et comprennent les enzymes NDM-1 (New Delhi Métallobêta-lactamase), VIM (verona integro-encoded metallo-bêta-lactamase), IMP (imipenem resistant *Pseudomonas*) and SPM-1 (Sao Paulo metallo-bêta-lactamase). Elles ont été détectées initialement dans des isolats de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (Thomson, 2010). Les carbapénèmases de la classe B requièrent un ou deux ions de zinc ( $Zn^{2+}$ ) pour être actives et hydrolyser le noyau bêta-lactame. Aucune liaison covalente acyl-enzyme n'est formée. La classe B est elle-même subdivisée en 3 groupes B1, B2 et B3, en fonction de l'alignement des séquences et de leur structure. Les enzymes appartenant à ces trois sous-groupes hydrolysent les carbapénèmes, mais les bêta-lactamases du groupe B2 sont strictement des carbapénèmases (Jeon *et al.*, 2015). Les gènes codant les MBL de type *bla<sub>VIM</sub>* ou *bla<sub>IMP</sub>* peuvent présenter des localisations plasmidiques ou chromosomiques. Ils sont habituellement décrits sous forme de gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1, ou plus rarement de classe 3 (Anne Marie Queenan and Bush, 2007) permettant la mobilité de ces gènes de résistance. La présence d'autres gènes cassettes associés au sein de l'intégron, comme des gènes de résistances aux aminosides ou à d'autres bêta-lactamines (OXA-30), confère à ces souches un degré important de multirésistance. (Paulsen *et al.*, 1993; Anne Marie Queenan and Bush, 2007; Walsh, 2008; Mooij *et al.*, 2009).



L'enzyme IMP-1 a été la première MBL identifiée chez une entérobactérie *Serratia marcescens* au Japon en 1991 (Ito *et al.*, 1995). Ces enzymes hydrolysent toutes les bêtalactamines et les carbapénèmes sauf l'aztréonam. Elles sont inhibées par l'EDTA (ethylenediaminetetraacetic), et sont résistantes aux inhibiteurs enzymatiques (acide clavulanique ou tazobactam).

Les gènes NDM-1 ont été retrouvés sur une grande variété de plasmides mais également insérés sur le chromosome bactérien dans quelques cas (Struelens *et al.*, 2010; Poirel, Bonnin and Nordmann, 2011). Le plus souvent, ce gène se trouve sur un plasmide transférable et est enclin aux réarrangements, faisant craindre un fort potentiel de transmission et d'adaptation. Parmi l'ensemble des résistances aux carbapénèmes, chacune d'entre elles possède des variants qui présentent des variations mineures, allant d'une protéine à un gène (Cuzon, Bonnin and Nordmann, 2013).

La classe C des carbapénémases comprend les enzymes ACT-1 (AMPC type betalactamase), DHA-1 (Dhahran hospital in Saudi arabia betalactamase), CMY-2 (cephamycin-hydrolysante les betalactamases) et CMY-10, identifiées parmi les *Enterobacteriaceae* (Bradford *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2007; Mammeri *et al.*, 2010). La plus fréquemment retrouvée est l'enzyme CMY-10 (Kim *et al.*, 2006). Ces résistances sont portées par des plasmides (Hee Lee *et al.*, 2007). Les carbapénémases de la classe C ont une activité d'hydrolyse faible envers les carbapénèmes (Mammeri *et al.*, 2010). Lorsque des mécanismes de résistances sont associés, le niveau de résistance est augmenté (Mammeri *et al.*, 2008). Certaines enzymes de la classe C sont décrites comme résistantes à l'imipénème (Kim *et al.*, 2006a; Poirel, Pitout and Nordmann, 2007; Rodriguez-Martinez, Poirel and Nordmann, 2009; Rodríguez-Martínez, Poirel and Nordmann, 2009).

La classe D des carbapénémases comprend les oxacillinases (OXA) parce qu'elle hydrolyse plus rapidement les oxacillines que les benzylpenicillines (Evans and Amyes, 2014). Le nombre d'enzymes OXA est supérieur à 400 enzymes. Quelques variants ont la capacité d'hydrolyser les carbapénèmes. Basé sur la séquence des acides aminés, les carbapénémases de la classe D sont classées en 12 sous groupes : OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229, et OXA-235 (Evans and Amyes, 2014). L'identité des séquences des membres de chaque sous groupe est supérieur à 90% et entre les sous groupes à 70% (Walther-Rasmussen and Høiby, 2006; Evans and Amyes, 2014). Le premier sous-groupe a été le sous-groupe OXA-23. L'enzyme OXA-23 a été identifiée chez un isolat d'*A.*





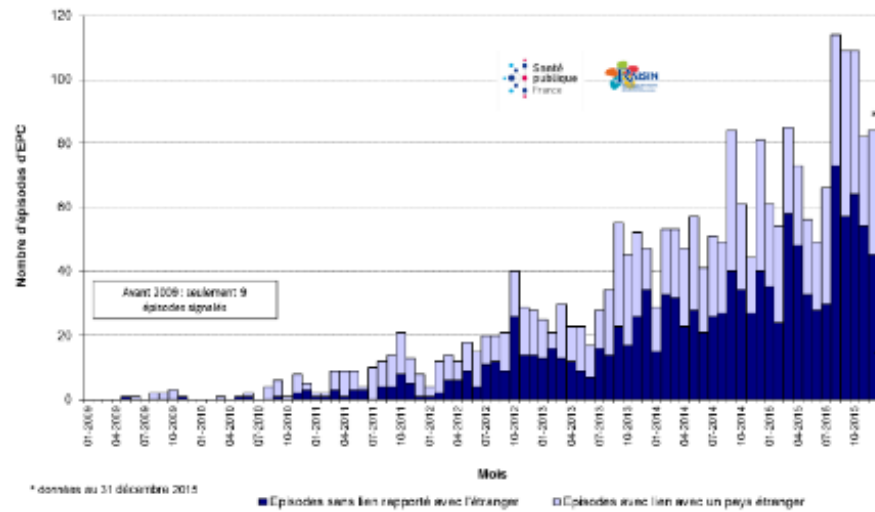
*baumannii* isolé au Royaume-Unis en 1985 (Paton *et al.*, 1993; Donald *et al.*, 2000). Parmi les gènes de carbapénémases de type OXA, seuls les gènes *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>* chez *A. baumannii* et *bla<sub>OXA-48</sub>* chez les entérobactéries ont des supports plasmidiques et présentent un important potentiel de dissémination (Chen *et al.*, 2008; Mugnier *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Magagnin *et al.*, 2017).

Certaines mutations sur les gènes codant les protéines PLPs et/ou diminution de leur niveau de transcription peuvent entraîner un phénotype de résistance aux carbapénèmes. Ainsi l'expression de PLPs chez *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis*, et *Rhodococcus equi* est diminuée, entraînant une résistance aux carbapénèmes (Papp-Wallace *et al.*, 2011). De plus, la substitution de PLPs ou l'acquisition de nouvelles PLPs peuvent entraîner une résistance aux carbapénèmes chez *Haemophilus influenzae*, *B. fragilis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. pneumoniae*, et *P. aeruginosa* (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes sont différents entre les cocci à Gram positif et les bacilles à Gram négatif. Chez les cocci à Gram positif, la résistance aux carbapénèmes est typiquement le résultat d'une substitution de nucléotides au sein des gènes codant les PLP ou de l'acquisition/production de nouvelles PLP (Katayama *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2009). Chez les bacilles à Gram négatif, la résistance est liée à la production de bêtalactamases et de pompes à efflux, à la perte de porine ou l'altération des PLP (Wareham and Bean, 2006; Nordmann *et al.*, 2011; Papp-Wallace *et al.*, 2011).

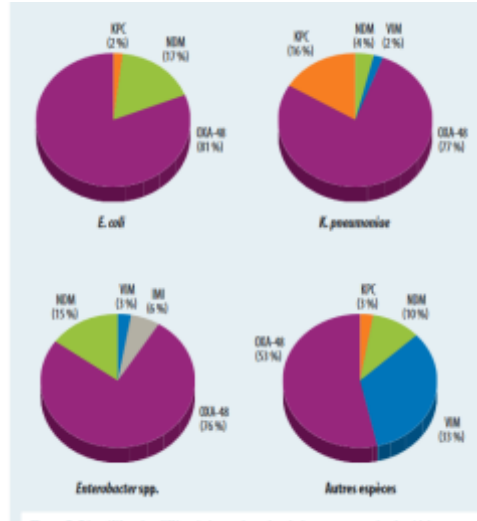
#### 2.2.1.2. [Epidémiologie de la résistance aux carbapénèmes](#)

##### 2.2.1.2.1. [Secteur hospitalier](#)

Les études et publications du Centre Européen pour la Prévention et le Contrôle des Maladies (ECDC) et les données du réseau EARS-Net qui rassemblent les données de résistance aux antibiotiques de souches isolées d'infections invasives permettent d'affirmer que la situation de la France en terme de résistance aux antibiotiques est comparable aux autres pays européens (sauf l'Italie et la Grèce) (Network, 2017). L'ensemble des données concernant l'épidémiologie des Entérobactéries Productrices de Carbapénémases (EPC) en France est recueilli et analysé par Santé publique France (ex Institut de Veille Sanitaire (InVS)) qui définit un cas comme un patient colonisé ou infecté par une EPC, confirmé par un laboratoire de référence ou par expert. Lorsqu'un



**Figure 10 :** Evolution par mois du nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmes en France entre 2009 et 2015 selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger (N=2376) (InVS, 2015)



**Figure 11 :** Proportions de carbapénémases selon les principales espèces bactériennes (Nordmann and Carrer, 2010)

Régions	Mécanismes de résistances (carbapénémases)*													
	OXA-48-like		NDM		KPC		VIM		IMI		IMP		GES	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Auvergne-Rhône-Alpes	136	77	22	12	14	8	4	2	1	<1	0	-	0	-

**Figure 12 :** Répartition en Auvergne-Rhône Alpes des épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France entre 2004 et 2015, selon les mécanismes de résistances impliquées (N=2385 Institut de veille sanitaire, CNR résistance aux antibiotiques, Inserm U914 2015)

**Tableau 8 :** Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmases en France signalés entre 2004 et 2015 selon les bactéries impliquées (N=2385 épisodes) Institut de veille sanitaire, CNR résistance aux antibiotiques, Inserm U914 2015)

Bactéries	Épisodes dans lesquels la bactérie a été décrite pour au moins un cas	
	N *	% **
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 373	58
<i>Escherichia coli</i>	847	36
<i>Enterobacter cloacae</i>	298	12
<i>Citrobacter freundii</i>	147	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	71	3
<i>Citrobacter (autre que freundii)</i>	48	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	44	2
<i>Serratia</i>	18	<1
<i>Proteus</i>	11	<1
<i>Morganella morganii</i>	11	<1
<i>Enterobacter autres</i>	10	<1
Espèces inconnues	8	<1
<i>Raoultella</i>	7	<1
<i>Providencia</i>	5	<1
Autres espèces	5	<1
<i>Salmonella</i>	4	<1

\* Pour un même épisode, plusieurs bactéries différentes peuvent être impliquées  
\*\* Le dénominateur utilisé est le nombre total d'épisodes (N=2 385), le total est supérieur à 100% car pour un même épisode, plusieurs bactéries différentes peuvent être impliquées

**Tableau 9 :** Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmases en France entre 2004 et 2015 selon les mécanismes de résistances (N=2385) Institut de veille sanitaire, CNR résistance aux antibiotiques, Inserm U914 2015)

Mécanismes de résistance (carbapénèmases)	Épisodes dans lesquels le mécanisme de résistance est impliqué	
	N *	% **
OXA-48 et OXA-48-like	1 863	78
NDM	333	14
KPC	132	6
VIM	107	5
IMI	11	<1
IMP	9	<1
GES	1	<1

\* Pour un même épisode, plusieurs mécanismes de résistance différents peuvent être impliqués  
\*\* Le dénominateur utilisé est le nombre total d'épisodes (N=2 385), le total est supérieur à 100% car pour un même épisode, plusieurs mécanismes de résistance différents peuvent être impliqués

lien épidémiologique est mis en évidence entre plusieurs signalements différents, ces signalements sont regroupés dans un même épisode. Un épisode peut donc correspondre à un seul ou plusieurs signalements. De la même façon, un épisode peut se définir par un seul ou bien plusieurs cas infectés ou colonisés par une EPC et reliés par une chaîne de transmission épidémiologique. Le premier épisode impliquant une EPC a été signalé à Santé publique France en 2004. Fin 2015, 2 385 épisodes de ce type ont été signalés par les établissements de santé et/ou le Centre National de Référence. Le nombre d'épisodes impliquant des EPC a connu une augmentation très nette entre 2009 et 2013. Une tendance à la stabilisation a été observée de 2013 à 2014 avec une moyenne d'environ 50 épisodes signalés chaque mois. Une forte augmentation du nombre d'épisodes a été observée pour l'année 2015 (135% entre 2013 et 2015) (Figure 10).

Sur l'ensemble des épisodes signalés, un lien avec l'étranger a été rapporté dans 47% des cas, soit dans le cadre d'un rapatriement sanitaire (33%), soit dans le cadre d'une hospitalisation dans un pays étranger l'année précédant une hospitalisation (40%). Les cas index les moins fréquents sont la notion de voyage sans hospitalisation dans les semaines qui ont précédé l'hospitalisation en France (18%), et les cas index résidant d'un pays étranger sans antécédent d'hospitalisation (6%).

La région la plus fortement impactée en épisodes EPC sur la période 2004 – 2015 est l'Île-de-France avec 1 156 épisodes (48%), suivie de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur avec 290 épisodes (12%) et de la région Auvergne-Rhône Alpes avec 177 épisodes (7%).

Sur la période 2004-2015, l'espèce *Klebsiella pneumoniae* est impliquée dans 58% des épisodes et *Escherichia coli* dans 36% des épisodes (Tableau 8). On peut cependant noter une augmentation des épisodes impliquant l'espèce *Escherichia coli* au cours du temps passant de 24% en 2012 à 42% en 2015. Dans la majorité des épisodes, une seule bactérie est impliquée dans les épisodes EPC (83%).

Dans la majorité des épisodes, seul un type de mécanisme est impliqué, notamment la production des enzymes OXA-48 et OXA-48-like qui représentent 78% des épisodes (Tableau 9). Les données du CNR indiquent une diversification des enzymes de type OXA-48 avec notamment l'émergence du variant OXA-181 (environ 6% des OXA-48-like en 2015). Des différences de proportions peuvent être observées selon l'espèce bactérienne et la carbapénémase exprimée (Figure 11).

La même tendance est observée en Auvergne-Rhône Alpes, avec une prédominance du mécanisme OXA-48 (Figure 12).

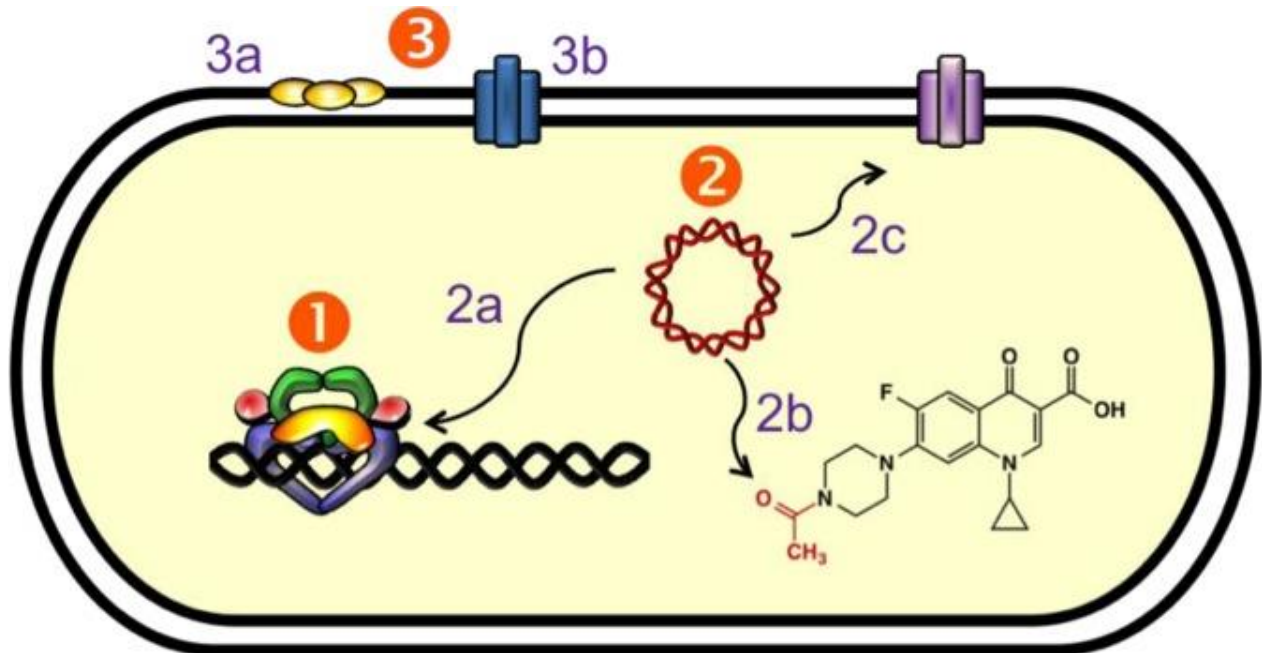
**Tableau 10 :** Revue de la littérature des espèces bactériennes porteuses de carbapénèmases (SPM, VIM, GES, IMP, KPC, NDM et OXA) détectées dans les effluents hospitaliers selon les pays, le mode de sélection avec ou sans antibiotiques (CTX : cefotaxime, MRP : méropénème, CZD : ceftazidime, IMP : imipénème, AMP : ampicilline)

Carbapénèmases	Gènes détectés	Pays	Sélection des espèces	Méthode de détection	Espèce	Référence
SPM	<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	Brésil	Selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Fuentefria et al. 2011)
	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Brésil	Selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Miranda et al. 2015)
VIM	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Enterobacter aerogenes</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Brésil	Selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Miranda et al. 2015)
GES	<i>bla</i> <sub>GES-5</sub>	Brésil	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella oxytoca</i>	(Conte et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>GES-5</sub>	Brésil	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte et al. 2017)
IMP	<i>bla</i> <sub>IMP-4</sub>	Chine	MRP 8µg/ml	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	Zhang et al 2012
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter/Pantoea</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Kluyvera georgiana</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Singapour	CZD 4 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter/Pantoea</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Singapour	CZD 4 µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Picao et al. 2013b)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Picao et al. 2013b)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Brésil	pas précisé	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Chagas et al. 2011)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Picao et al. 2013b)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Kluyvera spp</i>	(Picao et al. 2013b)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Raoultella spp</i>	(Picao et al. 2013b)

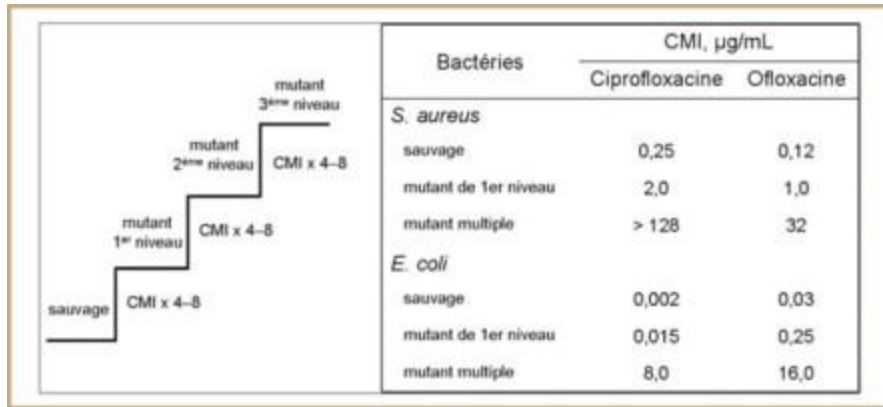
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Brésil	IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Serratia spp</i>	(Picao et al. 2013b)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Chine	MRP 8 µg/ml	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zhang et al. 2013)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Chine	MRP 8 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter cloacae</i>	(Zhang et al. 2013)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Portugal	/	Q-PCR	/	(Subirats et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Brésil	Selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	Miranda et al 2015
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Tunisie	/	Q-PCR	/	Emna Nasri et al 2017
	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Portugal	/	Q-PCR	/	Subirats et al 2017
	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Singapour	CZD 4 µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter jujini</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter/Pantoea</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas spp</i>	(Le et al. 2016b)
	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter jujini</i>	(Le et al. 2016b)
<b>NDM</b>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Comamonas testosteroni</i>	Thai-Hoang Le et al 2016
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Chine	IMP 10 µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter baumannii</i>	(Zhang et al. 2013)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Inde	MacConkey agar plate	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran et al 2014)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Tunisie	/	Q-PCR	/	(Nasri et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Inde	MacConkey agar plate	PCR	<i>Escherichia coli</i>	Chandran et al 2014
	<i>bla</i> <sub>NDM-9</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh et al. 2017)



<b>OXA</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Enterobacter cloacae</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Tunisie	/	Q-PCR	/	(Nasri et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48 like</sub>	Portugal	/	Q-PCR	/	(Subirats et al. 2017)
<b>Association</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh et al. 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Zurfluh et al. 2017)



**Figure 13** : Mécanismes de résistances aux quinolones et fluoroquinolones. (1) Résistance ciblée par mutation de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV (2) Plasmid-mediated resistance. (2a) Protéine qnr (jaune) diminuant la liaison topoisomérase–DNA et protège le complexe ADN-enzyme des quinolones. (2b) aac(6')-Ib-cr est une acétyltransférase qui acétyle l'azote du carbone au niveau du cycle de la ciprofloxacine et norfloxacine, diminuant leur efficacité (2c) Plasmide codant pour des pompes à efflux diminuant la concentration de quinolone dans la cellule. (3) Résistance codée par le chromosome. (3a) Sous expression des porines des espèces à Gram négatif diminuant l'entrée des antibiotiques. (3b) Surexpression des chromosomes codant pour des pompes à efflux diminuant la rétention des drogues dans la cellule (Aldred, Kerns and Osheroﬀ, 2014).



**Figure 14 :** Niveau de résistance par accumulation d'événements mutationnels, avec des mutants de premier niveau, puis de 2<sup>e</sup> niveau et 3<sup>e</sup> niveau (Mérens and Servonnet, 2010).

#### 2.2.1.2.2. Secteur environnemental

La prévalence des bactéries résistantes aux carbapénèmes dans l'environnement est méconnue. Très peu d'études sont consacrées à ce sujet, contrairement au secteur clinique. Le tableau 10 regroupe l'ensemble des données des carbapénémases dans les effluents hospitaliers actuellement disponibles et montre que les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp* et *Enterobacter spp*) et *Pseudomonas spp* sont les plus fréquemment porteuses de carbapénémases. L'annexe 1 regroupe l'ensemble des données des carbapénémases présentes dans l'environnement aquatique.

### 2.2.2. Quinolones et fluoroquinolones

#### 2.2.2.1. Mécanismes de résistance

Le seul support connu de résistances aux quinolones était de type chromosomique, jusqu'à la découverte de différents déterminants de résistance plasmidique (Plasmid Mediated Quinolone Resistant=PMQR) (Courvalin, 1990; Robicsek, Jacoby and Hooper, 2006; Martínez-Martínez *et al.*, 2008). Ces mécanismes d'action sont multiples et peuvent être associés dans une même bactérie (figure 13).

##### 2.2.2.1.1. Résistance par diminution de l'affinité des cibles

Le principal mécanisme de résistance entraînant une diminution d'affinité de la cible des fluoroquinolones est lié à des mutations dans les gènes de structure des topoisomérases « *quinolone-resistance determining region* » (QRDR), le plus souvent *gyrA* ou *parC*, plus rarement *gyrB* ou *parE*. En présence de quinolone ou FQ, ces mutations apparaissent à une fréquence de 1/10<sup>8</sup>. La mutation survient généralement au niveau du gène codant la topoisomérase pour laquelle la quinolone/FQ possède la plus grande affinité. Ces mutations varient selon la cible préférentielle de la molécule et selon l'espèce bactérienne (Cattoir *et al.*, 2006; Cambau *et al.*, 2009). Dans la majorité des cas, une seule mutation dans la QRDR de *gyrA* suffit à entraîner une résistance de haut niveau à l'acide nalidixique. En revanche, la résistance à l'ofloxacine peut nécessiter deux mutations, alors qu'il en faudra trois ou plus pour la ciprofloxacine (Hooper, 2000; De Lastours and Fantin, 2014). La résistance s'établit ainsi par paliers successifs, par accumulation d'événements mutationnels (figure 14). Chez les bactéries à Gram positif, l'ordre d'apparition des



mutations est plus variable, en fonction de la cible préférentielle de l'antibiotique (Mérens and Servonnet, 2010).

#### 2.2.2.1.2. Résistance par protection de la cible

La production de protéine pentapeptidique, nommée qnr, empêche l'accès des FQ à leur cible en interférant avec la formation du complexe ADN gyrase/ADN/quinolones (Courvalin, 1990; Martínez-Martínez *et al.*, 2008). Les fonctions de surenroulement, relâchement, désenchevêtrement de l'ADN gyrase peuvent alors avoir lieu en présence de la protéine qnr. C'est une résistance de bas niveau, puisque les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont multipliées par un facteur 4 à 8. Les déterminants décrits dans la littérature sont au nombre de 5 : qnrA, qnrB, qnrS, qnrC, qnrD (Angela H. A. M. van Hoek 2011). Ces protéines qnr sont codées par des gènes (*qnr*) à support plasmidique chez les entérobactéries, qui auraient été mobilisés à partir de gènes *qnr* chromosomiques présents chez des bactéries de l'environnement hydrique, comme les *Vibrionaceae* (Poirel *et al.*, 2005). Plus spécifiquement, les gènes *qnrA* et *qnrB* sont portés par de grands plasmides de 40-320 kb, au sein d'intégrons de classe 1 de type *sulI*. Plusieurs gènes *qnr-like* chromosomiques ont été décrits chez des bactéries à Gram positif (*E. faecalis*) ou chez les mycobactéries (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis*). Ces qnr sont essentiellement responsables de résistance de bas niveau aux quinolones, mais concourent à une augmentation de la fréquence de sélection des mutants résistants (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2007).

#### 2.2.2.1.3. Résistance par Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Les fluoroquinolones peuvent être partiellement dégradées par une enzyme, l'aminoglycosyltransférase *aac*-(6')-Ib-cr, conférant une augmentation de 2 à 4 fois des concentrations minimales inhibitrices de la ciprofloxacine et de la norfloxacine. Cette enzyme est codée par un gène (*aac*-6'-Ib-cr cassette d'un intégron de classe 1 de type *sul* et de support plasmidique.) (Robicsek *et al.*, 2006). Ce gène est souvent associé sur les mêmes intégrons à des gènes codant les bêta-lactamases OXA-1, CTX-M15 ou SHV-12 ou des céphalosporinases plasmidiques (DHA-1 ou CMY), ou encore de BLSE et en association avec le mécanisme de résistance impliquant des *qnr* (Robicsek *et al.*, 2006).

**Tableau 11** : Revue de la littérature des espèces bactériennes porteuses de gène de résistance aux fluoroquinolones plasmidiques (*aac(6')-lb-cr, oqxAB, qep A, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS* et association) détectées dans les effluents hospitaliers selon les pays, le mode de sélection avec ou sans antibiotiques (CTX : cefotaxime, , CIP : ciprofloxacine, GAT : gatifloxacine)

	Pays	Gènes détectés	Sélection des espèces	Méthode de détection	Espèce	Auteur
<b>aac(6')-lb-cr</b>	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter mori</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela et al 2017)
	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Morganella Morganii</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Proteus mirabilis</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Inde	<i>aac(6')-lb-cr</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran et al. 2017)

	Chine	<i>aac(6)-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>aac(6)-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>aac(6)-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Proteus spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>aac(6)-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Shigella spp</i>	(Xia et al. 2013)
<b>oqxAB</b>	Brésil	<i>oqxAB</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte et al. 2017)
	Chine	<i>oqxAB</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Inde	<i>oqxAB</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran et al. 2017)
	Chine	<i>oqxB</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
<b>qep A</b>	Inde	<i>qep A</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran et al. 2017)
	Chine	<i>qepA</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Chine	<i>qepA</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Xia et al. 2013)
	Espagne	<i>qnrA</i>	/	Q-PCR	/	(Marti & Balcazar 2013)
	Chine	<i>qnrA</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Singapour	<i>qnrA</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Le et al. 2016b)



	Singapour	<i>qnrA</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Le et al. 2016b)
	Chine	<i>qnrA</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>qnrA</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Proteus spp</i>	(Xia et al. 2013)
<b>qnrB</b>	Espagne	<i>qnrB</i>	/	Q-PCR	/	(Marti & Balcazar 2013)
	Chine	<i>qnrB</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Inde	<i>qnrB</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran et al. 2017)
	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Le et al. 2016b)
	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Le et al. 2016b)
	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Le et al. 2016b)
	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Shighella/E. coli</i>	(Le et al. 2016b)
	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Proteus spp</i>	(Xia et al. 2013)

	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Shigella spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Xia et al. 2013)
<b>qnrC</b>	Chine	<i>qnrC</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
<b>qnrD</b>	Chine	<i>qnrD</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Espagne	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Rodríguez-Mozaz et al. 2015b)
	Espagne	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Marti & Balcazar 2013)
	Chine	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Yan et al. 2017)
	Inde	<i>qnrS</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran et al. 2014)
	Chine	<i>qnrS</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Xia et al. 2013)
<b>qnrS</b>	Chine	<i>qnrS</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>qnrS</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia et al. 2013)
	Chine	<i>qnrS1</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>qnrS1</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	(Wen et al. 2016)

	Chine	<i>qnrS1</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter hormaechi</i>	(Wen et al. 2016)
	Portugal	<i>qnrS2</i>	Non précisé	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela et al 2017)
	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Enterococcus faecalis</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas allosacharophila</i>	(Wen et al. 2016)
<b>Association</b>	Chine	<i>qnrS2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Wen et al. 2016)
	Portugal	<i>qnrB</i> et <i>oqxAB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Chine	<i>qnrB2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Wen et al. 2016)
	Chine	<i>qnrB2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	(Wen et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>oqxAB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrB</i> et <i>qnrS</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter ludwigii</i>	(Vaz-Moreira et al. 2016)
	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	Non précisé	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela et al 2017)
	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>oqxAB</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>klebsiella pneumoniae</i>	(Conte et al. 2017)
	Brésil	<i>oqxAB</i> et <i>qnrS</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>klebsiella pneumoniae</i>	(Conte et al. 2017)

## 2.2.2.2. Epidémiologie

### 2.2.2.2.1. Secteur hospitalier

Les pourcentages de sensibilité à la ciprofloxacine en France chez les principales entérobactéries isolées de prélèvements cliniques, quel-que-soit le site ou l'origine (nosocomiale ou communautaire) peuvent être estimés grâce au réseau REUSSIR, qui collecte les données de sensibilité aux antibiotiques de plus de 30 000 souches d'*E. coli* par an ([http://www. onerba.org](http://www.onerba.org)). Entre 2000 et 2005, les taux de sensibilité à la ciprofloxacine sont passés de 95 à 90% chez *E. coli*, de 87 à 80% pour *E. cloacae*, mais sont restés stables pour *P. mirabilis* (78%) et *P. vulgaris* (98%) [(<http://www. onerba.org>)].

Pour *K. pneumoniae*, autre bactérie particulièrement surveillée au niveau européen, cette tendance est également observée au niveau des données françaises EARSS, avec une chute de 93% à 86,5% de sensibilité à la ciprofloxacine entre 2005 et 2007 et s'accompagne d'une diminution de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération. Au niveau européen, l'émergence de *K.pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de troisième génération et aux fluoroquinolones, voire aux carbapénèmes, souligne une urgence de la maîtrise de la prescription des antibiotiques.

La prévalence des gènes *qnr* chez les entérobactéries est très variable selon les études (0,2% à 94%) en fonction de l'origine géographique, mais aussi des critères de sélection des souches (communautaires, nosocomiales, résistantes ou non aux quinolones ou aux céphalosporines de troisième génération) [<http://www. onerba.org>]. Plusieurs études ont montré que les déterminants *qnr*, principalement *qnrA* et *qnrB*, étaient plus fréquents chez les entérobactéries productrices de BLSE ; *qnrS* est moins fréquemment associé à des BLSE, mais plutôt à des bêta-lactamases TEM-1 ou LAP-1.

*Aac-6'-Ib-cr* a également été identifié chez 3% et 9% des souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones et non productrices de BLSE, isolées respectivement d'infections urinaires et de bactériémies au Royaume-Uni entre 2001 et 2005 [<http://www. onerba.org>].

### 2.2.2.2.2. Secteur environnemental

La prévalence des bactéries résistantes aux quinolones ou fluoroquinolones dans l'environnement est inconnue. Le tableau 11 récapitule l'ensemble des études ayant recherché les



gènes PMQR dans les effluents hospitaliers. L'annexe 2 concerne l'ensemble des gènes de résistances aux fluoroquinolones plasmiques détectés dans divers environnements aquatiques.

### **2.3. Résistance par diminution de la perméabilité de la paroi ou augmentation de l'efflux**

L'imperméabilité membranaire entraîne une diminution de la concentration intracellulaire des quinolones et des carbapénèmes. Cette modification est due à la mutation de gènes régulateurs impliqués dans la synthèse des porines, protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ou à l'hyperexpression de pompes d'efflux actif. Ces mécanismes d'efflux confèrent une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones et aux carbapénèmes, variable selon la molécule. Cependant une association de résistances peut conférer une résistance de haut niveau (Poole, 2000, 2007).

Les protéines de la membrane externe (Outer membrane proteins (OMPs)) affectent l'expression de porines entraînant une diminution de la concentration des carbapénèmes, certaines étant plus touchées que d'autres (Riera *et al.*, 2011).

L'altération des OprD, une porine à substrat spécifique impliquée dans le transport des acides aminés, présente chez *P. aeruginosa* diminue la concentration des carbapénèmes dans le périplasme (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Suite à des mutations par substitution, l'expression de porines non-efflux peuvent entraîner une diminution de la concentration en carbapénème dans le périplasme (Huang *et al.*, 1992; Bradford *et al.*, 1997; Oteo *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2010). Cette diminution de la concentration des carbapénèmes atteinte dans le périplasme a été décrite dans de nombreuses souches, notamment chez *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus rettgeri*, *Shigella dysenteriae*, et *Salmonella enterica* (Papp-Wallace *et al.*, 2011)

Parallèlement à la diminution de pénétration, certaines bactéries sont capables d'expulser les antibiotiques intracellulaires via des pompes d'efflux notamment chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Les systèmes d'efflux ne sont pas spécifiques aux antibiotiques et sont hyperproduits sous la pression de sélection de nombreux autres antibiotiques ou antiseptiques (Lomovskaya *et al.*, 2001; Poole, 2001, 2007; Zhang, Li and Poole, 2001; Schweizer, 2003). Chez les cocci à Gram positifs, on retrouve



essentiellement les pompes à efflux de la famille MFS (*major facilitator superfamily*), NorA chez *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (Poole, 2007).

Chez les entérobactéries, il a été découvert une pompe à efflux MFS (QepA1 ou QepA2) codée par un gène à support plasmidique (Rincón *et al.*, 2014) qui confère une diminution de sensibilité aux quinolones hydrophiles (norfloxacin, ciprofloxacine, principalement). À ce jour, les études épidémiologiques concernant QepA sont encore rares, mais sa prévalence est faible (< 1%). QepA est fréquemment associé à la production d'un méthylase RmtB entraînant une résistance aux aminosides (Cattoir, Poirel and Nordmann, 2008). Chez les bacilles à Gram négatifs, comme *E. coli*, le système d'efflux AcrAB-TolC participe également à la résistance de bas niveau aux quinolones. Une mutation dans le répresseur de *acrAB*, *acrR* ou dans le répresseur de *marA*, *marR*, entraîne une hyperproduction de la pompe d'efflux (Touzé *et al.*, 2004).

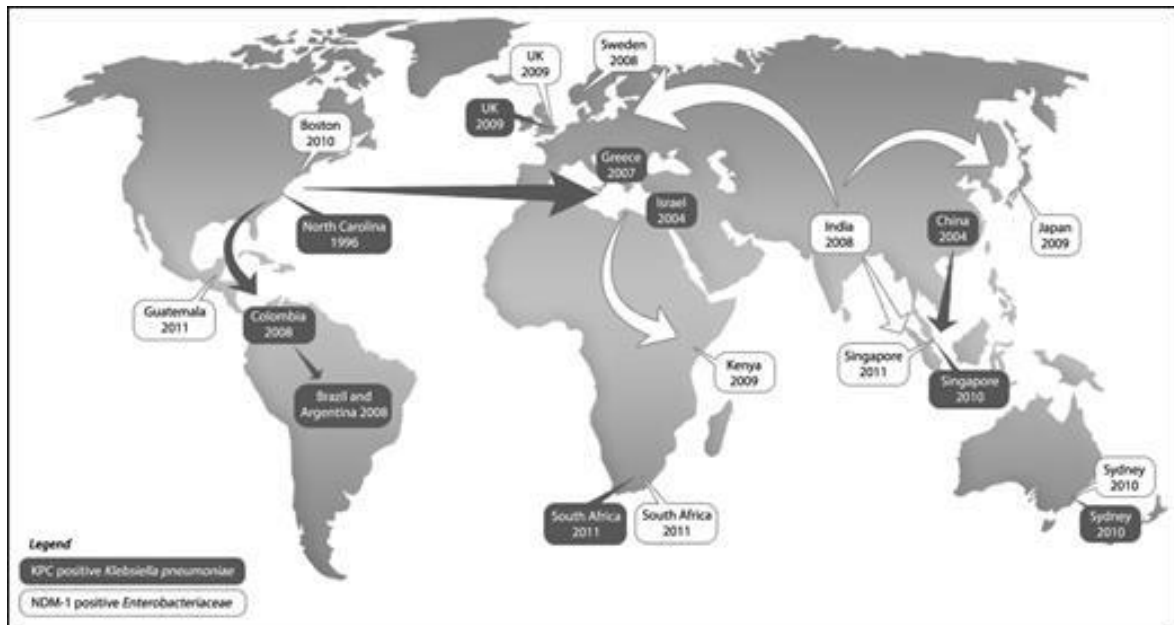
## 2.4. Diffusion de l'antibiorésistance : les éléments génétiques mobiles

L'antibiorésistance des microorganismes existe pour de nombreux agents infectieux interrogeant sur la capacité de diffusion de l'antibiorésistance (WHO, 2014). Les bactéries peuvent être intrinsèquement résistantes aux fluoroquinolones ou aux carbapénèmes mais les problèmes actuels de santé publique sont en lien avec la résistance acquise à ces antibiotiques. La diffusion de l'antibiorésistance est favorisée par des éléments génétiques mobiles. Ces derniers sont des fragments d'ADN codant pour des protéines impliquées dans le mouvement des génomes (mobilité intracellulaire) ou entre bactéries (mobilité intercellulaire). Les mouvements intercellulaires peuvent s'effectuer selon trois mécanismes : la transformation (transfert de gène médié par la capture d'ADN), la conjugaison (transfert de gène médié par certains plasmides et éléments génétiques mobiles avec des gènes appropriés pour le transfert de gène) et la transduction (transfert de gène médié par certains bactériophages). Les éléments génétiques mobiles tels les transposons, plasmides ou intégrons confèrent un pouvoir de dissémination.

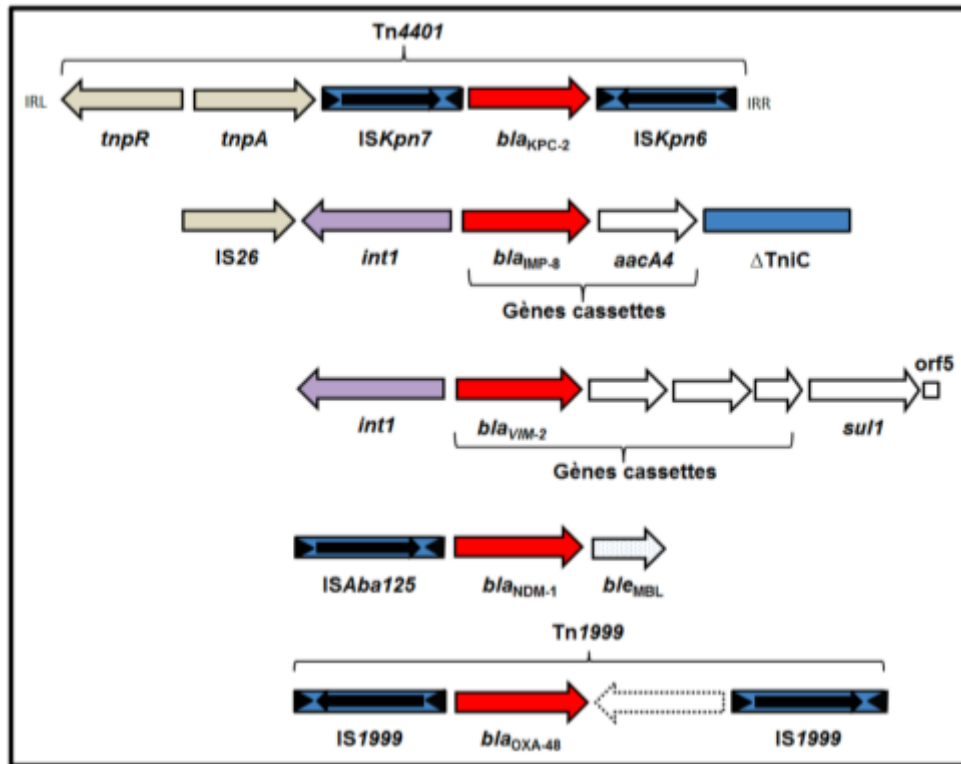
Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont été décrites dans le monde entier en lien avec des gènes codant pour des carbapénémases acquis par des éléments génétiques mobiles. En une dizaine d'années, le nombre de carbapénémases avec les types IMP (Active on imipenem), VIM (Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), OXA-48 (Oxacillinase) et NDM-1 (New Delhi metallo-







**Figure 15 :** Dissémination mondiale des gènes de résistances *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase (KPC) –portés par *K. pneumoniae* et New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1–portés par les *Enterobacteriaceae*. Le premier cas rapporté sur chaque continent est montré avec les flèches indiquant des mouvements internationaux de ces microorganismes. Abréviations: KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase; NDM-1, New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1; UK, United Kingdom. (Molton *et al.*, 2013).



**Figure 16 :** Représentation graphique des principaux gènes des carbapénèmases (Nordmann, Dortet and Poirel, 2012)

b-lactamase) a explosé. La diffusion mondiale des carbapénèmases peut être illustrée par la dissémination de la New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1) d'Est en Ouest et la diffusion de la *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) d'Ouest en Est (Figure 15) (Molton *et al.*, 2013). Les plasmides du groupe IncU ont été isolés de nombreuses souches cliniques et environnementales d'*Escherichia coli* et *Aeromonas spp.* Les plasmides conjugatifs et Broad Host Range sont des membres de ce groupe et sont aussi impliqués dans la dissémination de l'antibiorésistance. Ce groupe de plasmides est largement présent dans le monde et il a été postulé qu'ils partagent une structure de base conservée avec une région variable limitée aux gènes codant pour des résistances (Rhodes *et al.*, 2000; Sørum *et al.*, 2003).

Une facilité de transmission du gène codant pour l'enzyme KPC est démontrée par leurs détections dans différentes espèces d'entérobactéries et différents clones de *K. pneumoniae* (Rasheed *et al.*, 2008). Les gènes  $bla_{KPC}$  sont constamment associés à un transposon de même nature, de type Tn3, Tn4401 (Naas *et al.*, 2008; Cuzon, Naas and Nordmann, 2011), dont quatre isoformes ont été décrits (Kitchel *et al.*, 2010). Au sein du transposon Tn4401, le gène  $bla_{KPC}$  est invariablement flanqué de deux séquences d'insertion, ISKpn6 (en aval) et ISKpn7 (en amont) et de deux gènes codant les enzymes nécessaires à la transposition (*tnpA*, *tnpR*). Au niveau des effluents hospitaliers et des eaux usées de station épuration, les gènes  $bla_{KPC}$  étaient toujours présents sur des transposons Tn 4401 localisés sur des plasmides conjugatifs ou plasmides mobilisables. Picao suspecte que ce transposon soit associé à la dissémination de cette enzyme à travers le monde (Renata C. Picão *et al.*, 2013).

L'analyse des gènes  $bla_{VIM}$  et  $bla_{IMP}$  montre qu'ils sont habituellement localisés au sein d'un intégron de classe 1, une structure génétique d'ADN qui contient souvent des gènes de résistance à d'autres antibiotiques, appelés gènes cassettes, co-exprimés grâce à la présence d'un promoteur unique. Les gènes les plus fréquemment retrouvés dans l'intégron de classe 1 confèrent une résistance aux aminosides (gène *aacA*), au chloramphénicol (gène *catB*) et aux  $\beta$ -lactamines par production d'oxacillinases (gène  $bla_{OXA}$ ). Les intégrons de classe 1 cumulent des gènes de résistance mais ne présentent pas de mobilité propre : c'est leur intégration au sein de plasmides et/ou de transposons qui permet leur diffusion (Zhao and Hu, 2011).

Contrairement aux gènes  $bla_{KPC}$ , le gène  $bla_{OXA}$  a été associé aux chromosomes et à plusieurs types de plasmides (Walther-Rasmussen and Høiby, 2006) (Figure 16). Le gène  $bla_{OXA-48}$  serait constamment porté par le même type de plasmide, InCL/M, dénommé pOXA-48a et ne portant pas



d'autres gènes de résistance (Poirel, Bonnin and Nordmann, 2012). Il a été décrit sur plusieurs transposons (Tn1999 et Tn6237) jouant un rôle dans sa mobilité et faisant craindre des possibilités de transferts à d'autres unités génétiques (Skálová *et al.*, 2016). Le gène *bla<sub>OXA-181</sub>*, codant une enzyme différant d'OXA-48 d'à peine quatre acides aminés, semble pourtant associé à une plateforme génétique complètement distincte puisqu'il est retrouvé sur d'autres plasmides, du groupe ColE, et associé à une autre séquence d'insertion, ISEcp1 (Riethmuller, 2013).

Le gène OXA-23, chez *A. baumannii*, a été décrit sur plusieurs types de transposons (Tn 2006, Tn2007 et Tn2008) localisés au sein du chromosome ou sur différents plasmides, démontrant la grande diversité des voies de dissémination de l'enzyme (Nigro and Hall, 2015).

Les autres résistances associées aux carbapénèmases, notamment les résistances aux aminosides, aux fluoroquinolones (gènes *qnr*) et/ou à d'autres bétalactamines (CTX-M15, DHA-1, par exemple), confèrent à ces souches un niveau élevé de multirésistance et permettent le co-transfert de gènes de résistance (Anne Marie Queenan and Bush, 2007; Naas *et al.*, 2008; Walsh, 2008; Nordmann, Cuzon and Naas, 2009; Nordmann and Carrer, 2010).

Les PMQR ont été identifiés dans de nombreuses entérobactéries (Poirel *et al.*, 2005; Kehrenberg *et al.*, 2006; Pasom *et al.*, 2013) et récemment aussi chez *Pseudomonas spp* (Cayci, Coban and Gunaydin, 2014). Les plasmides portant les gènes *qnr* varient considérablement en taille et en résistance associées mais presque tous confèrent des résistances multiples aux antibiotiques. Les gènes *qnrA* et quelques gènes *qnrB* sont retrouvés sur l'intégron de type *sul1* contenant une recombinase présumée, Orf513. Le gène *qnrB* est aussi associé à l'Orf513 tel qu'une recombinase Orf1005, mais avec des gènes ne codant pas pour des résistances mais semblable au chromosome de bactérie marine (Jacoby *et al.*, 2006). Dans les quelques séquences de plasmides contenant le gène *qnrS*, ce dernier ne faisait pas partie d'un intégron mais d'un seul plasmide, et il était encadré par des séquences d'insertion pouvant être responsables de la mobilisation de ces gènes (Gay *et al.*, 2006). Le gène *qnrS2* a été retrouvé sur plusieurs plasmides de souches d'*Aeromonas punctata* et *Aeromonas media* (Cattoir, Poirel and Nordmann, 2008), d'*A. allasacharophila* (Picão *et al.*, 2008), et d'*Aeromonas spp* (Marti and Balcázar, 2013), et récemment de plasmides non nommés d'*A. sorbia* et *A. hydrophila* (Dobiasova *et al.*, 2014).

Un lien entre les résistances aux céphalosporines et aux quinolones a été souligné par plusieurs investigateurs. Le mécanisme de cette association est la présence sur le même plasmide de *qnr* et des gènes codant pour une BLSE ou AmpC. Le gène *qnrA* a été trouvé avec des bétalactamases



telles que CTX-M-9, CTX-M-14, FOX-5, SHV-5, SHV-7, SHV-12, or VEB-1 tandis que *qnrB* a été localisé sur des plasmides portant des gènes tels que CTX-M-15, SHV-12, or SHV-30 (Robicsek, Jacoby and Hooper, 2006). Bien que les gènes *qnr* et les gènes de bêtalactamases aient été généralement retrouvés sur des intégrons différents suggérant des acquisitions indépendantes, la coexistence de *qnrA* et des gènes d'une bêtalactamase VEB sur le même intégron a été récemment décrite (Cattoir *et al.*, 2006).





### **3. Effluent hospitalier et antibiotiques**

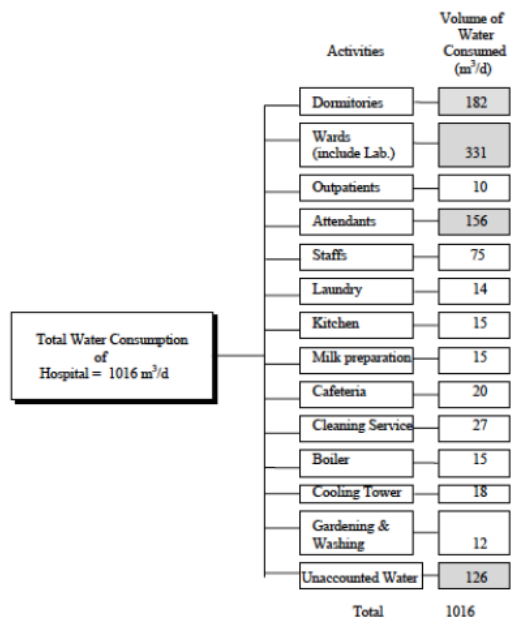
#### **3.1. Effluent hospitalier**

##### 3.1.1. Définition

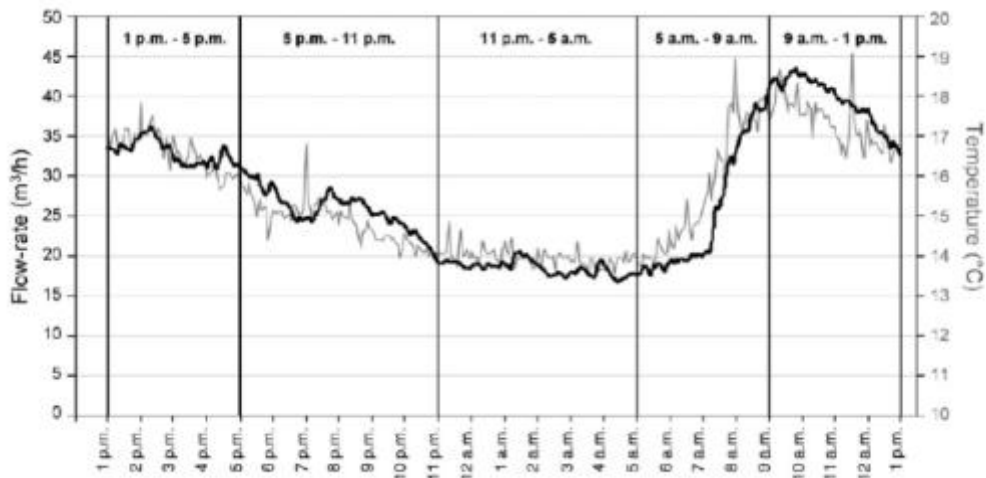
Les effluents hospitaliers sont les eaux usées d'un établissement de santé. Ils correspondent à différentes catégories (Emmanuel, 2004) : les rejets domestiques regroupant les eaux provenant des cuisines et les rejets résultant de l'hygiène des patients non contagieux et du personnel, les rejets assimilables à des effluents industriels générés par certains équipements spécifiques (blanchisseries, chaufferies, ateliers...) et les effluents spécifiques aux établissements de santé générés par les activités de soins, d'analyse et de recherche.

Dans la majorité des établissements de santé français, aucun traitement spécifique n'est actuellement appliqué aux effluents hospitaliers, les effluents hospitaliers sont directement connectés avec les effluents urbains pour être traités par la station d'épuration (Daughton and Ternes, 1999; Kümmerer, 2001; Heberer, 2002; Jjemba, 2006; Joss *et al.*, 2006; P. Verlicchi *et al.*, 2012). Même si le volume d'eaux usées de ces effluents hospitaliers subit une importante dilution, leur déversement dans les effluents urbains ou dans l'environnement naturel génère une contribution significative à la contamination environnementale, plus particulièrement dans le compartiment aquatique. De nombreuses études, notamment le projet SIPIBEL, ont identifié divers médicaments à usage hospitalier au niveau des stations d'épuration soulevant depuis une dizaine d'années des interrogations sur l'impact des effluents hospitaliers sur l'environnement (Thomas *et al.*, 2007; Langford and Thomas, 2009; Ort, Lawrence, Reungoat and Mueller, 2010; Beier *et al.*, 2011; P. Verlicchi *et al.*, 2012). De nombreux travaux ont démontré que les effluents hospitaliers et urbains présentent des caractéristiques qualitatives et quantitatives différentes (Altin, Altin and Degirmenci, 2003; Chang *et al.*, 2010; Kosma, Lambropoulou and Albanis, 2010; Verlicchi, Galletti and Masotti, 2010; Verlicchi, 2016). Les principales différences se situent sur leurs compositions physico-chimique et biologiques. Au niveau de la contamination physico-chimique, la présence de médicaments, notamment d'antibiotiques éliminés par les patients, de réactifs chimiques provenant des laboratoires, et des désinfectants provenant du nettoyage sont remarquables dans les effluents hospitaliers. Autre différence physico-chimique, est la présence de molécule radioactive, pouvant être éliminée par les patients traités dans un but diagnostique ou





**Figure 17 :** Estimation de la consommation hospitalière d'eau selon l'activité. (Wangsaatmaja, 1997)



**Figure 18 :** Fluctuation journalière du débit et de la température dans l'émissaire d'un hôpital français (Boillot *et al.*, 2008)

**Tableau 12 :** Variation des concentrations des principaux paramètres physiques, chimiques et microbiologiques des effluents hospitaliers (Orias and Perrodin, 2014)

<b>Paramètres</b>	<b>Valeurs</b>
Conductivité ( $\mu\text{S/cm}$ )	300-2700
pH	6-9
Potentiel réducteur (mV)	850–950
Graisse et huile (mg/L)	50–210
Chlorures (mg/L)	80-400
Azote total (mg N/L)	60-230
NH <sub>4</sub> (mg NH <sub>4</sub> /L)	10-68
Nitrite (mg NO <sub>2</sub> /L)	0.1-0.6
Nitrate (mg NO <sub>3</sub> /L)	1-2
Phosphate (mg P-PO <sub>4</sub> /L)	6-19
Matière en suspension (mg/L)	116-3260
DCO (Demande Chimique d'Oxygène) (mg O <sub>2</sub> /L)	39-7764
DCO dissous (mg O <sub>2</sub> /L)	380-700
COD (Carbone organique dissous) (mg/L)	120-130
COT (concentration en carbone organique) (mg/L)	31-180
DBO (mg/L)	16-2575
DBO <sub>5</sub> /DCO	0.3-0.4
Halogène organique adsorbable (mg/L)	550-10000

thérapeutique. La contamination biologique est essentiellement due à la charge microbienne notamment aux bactéries potentiellement pathogènes et/ou multirésistantes.

### 3.1.2. Volumétrie des effluents hospitaliers

En France, la consommation d'eau des hôpitaux est importante, on estime qu'un hôpital peut en moyenne consommer jusqu'à 1 m<sup>3</sup> d'eau potable par patient (eau froide 150L/J/lit, eau chaude 400-800L/J/lit). La demande moyenne en eau pour un centre hospitalier universitaire (CHU) est estimée à 750 L/lit/jour alors que celle des ménages est de 151 L/personne/jour (Demouliere, Raphael, Bensaïd Schemba, Joy, Berger, Joshua, Ait Kaci, Ahmed; Rougier, 2012). Le volume d'eau consommé est corrélé au volume d'eau retrouvé dans les effluents hospitaliers. La quantité d'eaux usées dans les effluents hospitaliers dépend de plusieurs facteurs : nombre de lits, vétusté de l'hôpital, services généraux présents dans l'enceinte de l'hôpital (cuisine, blanchisserie et climatisation), nombre et type de services cliniques, politique institutionnelle et de développement durable. La figure 17 représente les tendances des consommations en eaux des établissements de santé. La figure 18 illustre la fluctuation du débit des effluents hospitaliers d'un hôpital français. Le flux moyen est estimé à 27.3 m<sup>3</sup>/H. Cette fluctuation est corrélée à l'activité de soin pour atteindre son maximum entre 7 et 10h et son minimum aux alentours de minuit (Boillot *et al.*, 2008). Une variation du flux est aussi constatée selon les mois de l'année et particulièrement selon les saisons (Mohee, 2005; Joss *et al.*, 2006; Boillot *et al.*, 2008; Coutu *et al.*, 2013).

### 3.1.3. Caractéristiques physico-chimiques

Les paramètres les plus étudiés en routine sont la présence et la charge de matière organique ou inorganique, mesurées par la conductivité, la Demande Biochimique en Oxygène (DBO), la Demande Chimique en Oxygène (DCO), la matière totale en suspension (MS) et l'azote total. Les valeurs moyennes de ces divers paramètres dans les effluents hospitaliers sont collectées dans divers pays depuis une vingtaine d'année et sont résumées dans le tableau 12 (Oliveira, Al Aukidy and Verlicchi, 2017; Wiest *et al.*, 2017).

Les concentrations mesurées démontrent l'importance des effluents hospitaliers comme source de matières organiques et inorganiques en comparaison des effluents urbains pour lesquelles la DBO5 varie entre 100 et 400 mg L<sup>-1</sup>, la DCO entre 43 et 270 mg/L, la MS entre 150 et 500 mg/L, et l'azote total entre 30 and 100 mg/L (El-Ogri *et al.*, 2016). De plus dans les effluents hospitaliers,

**Tableau 13 :** Exemples de concentrations de microorganismes détectés dans les effluents hospitaliers (Oliveira, Al Aukidy and Verlicchi, 2017)

<i>Escherichia coli</i> (bactérie/100mL)	$10^3$ - $10^6$
<i>Entérocoques</i> (bactérie/100mL)	$10^3$ - $10^6$
Coliformes fécaux thermotolérants (bactérie/100ml)	$10^3$ - $10^4$
Coliformes totaux (bactérie/100ml)	$10^4$ - $10^7$ *
Norovirus (copie génomique /L)	$2.4 \times 10^6$
Adenovirus (copie génomique/L)	$2.8 \times 10^6$
Rotavirus (copie génomique/L)	$1.9 \times 10^6$
Virus de l'hépatite A (copie génomique/L)	$10^4$

le pH est élevé principalement en raison des fortes concentrations de détergent/désinfectants utilisées pour l'activité de nettoyage (Boillot *et al.*, 2008).

#### 3.1.4. Caractéristiques microbiologiques

Les effluents hospitaliers recèlent potentiellement de fortes concentrations et une grande diversité d'espèces microbiennes, virales ou parasitaires provenant de la flore digestive des patients ou de leur environnement. La caractérisation bactériologique des effluents hospitaliers inclue la détection des indicateurs classiques de contaminations fécales et des pathogènes. Les coliformes fécaux thermotolérants sont typiquement analysés par la recherche des *E. coli* puisqu'ils représentent 80-90% des coliformes thermo-tolérants (Carraro *et al.*, 2016). D'autres analyses plus spécifiques peuvent être réalisées dans les effluents hospitaliers comme la recherche de spores de bactéries anaérobies, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella spp.*

Diverses études rapportent que les effluents hospitaliers présentent des concentrations bactériennes plus faibles (aux alentours de  $10^8/100$  mL) que les effluents urbains (Leprat, 1998; Tchobanoglous *et al.*, 2003; Boillot *et al.*, 2008). Cette faible proportion de bactéries dans certains effluents hospitaliers serait due à la présence de désinfectants et/ou antibiotiques à forte concentration. A l'inverse, la concentration en microorganismes pathogènes comme *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus* ou en microorganismes antibiorésistants peut être de 2 à 10 fois plus importantes que dans les effluents urbains (Leprat, 1998; Kümmerer and Henninger, 2003; Schwartz *et al.*, 2003; Hartemann, P., Hautemaniere, A., Joyeux, 2005; Pauwels and Verstraete, 2006; Boillot *et al.*, 2008) Chitnis et al ont détecté en 2013 dans les effluents hospitaliers la présence de bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Shigella* et des *Enterobacteriaceae* multirésistants (Chitnis *et al.*, 2013). Dans cette étude, l'analyse des phénotypes de résistance a montré des résistances à l'ampicilline, céphalosporine, aminosides, quinolones, cotrimoxazole, tétracycline et chloramphénicol, qui représentaient la majorité des antibiotiques prescrits dans cet hôpital.

Des marqueurs viraux de pollution fécale comme rotavirus, adenovirus, hépatite A et entérovirus sont aussi communément identifiés dans les effluents hospitaliers. Prado et al a montré que les effluents hospitaliers peuvent contenir des concentrations de virus entériques supérieures de deux log en moyenne à celles des effluents urbains. (Tableau 13) (Prado *et al.*, 2011).



**Tableau 14** : Concentration moyenne mesurée dans les effluents urbains (UWw) et les effluents hospitaliers (HWw) pour les composés pharmaceutiques couramment retrouvés (Clothilde Boillot, 2008).

Therapeutic class	Investigated compounds	Range in HWw ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Range in UWw ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Analgesics/anti-inflammatory	Codeine	0.02–50	0.1–35
	Diclofenac	0.24–15	0.01–28
	Ibuprofen	0.07–43	0.04–84
	Naproxen	9.8–11	0.04–18.78
	Paracetamol	5.4–1,368	0.04–483
Antibiotics	Salicylic acid	23.4–70.1	34–160
	Ciprofloxacin	0.03–125	0.01–5.88
	Clarithromycin	0.2–3	0.1–4.8
	Copropofloxacin	0.85–2	
	Doxycycline	0.1–6.7	
	Erythromycin	27–83	0.04–2.7
	Lincomycin	0.3–2	
	Metronidazole	0.1–90	
	Norfloxacin	0.029–44	0.01–0.96
	Ofloxacin	0.353–35.5	0.01–31.70
	Oxytetracycline	0.01–3.75	
	Penicillin G	0.85–5.2	0.03
	Sulfamethoxazole	0.04–83	0.01–6.0
	Tetracycline	0.01–4.2	0.01–1.30
	Trimethoprim	0.01–15	0.02–7.90
Psychiatric drugs	Carbamazepine	0.54–2	0.02–3.11
Anti-hypertensives	Diltiazem	0.71–1.6	0.01–1.6
Anti-neoplastics	5-Fluorouracil	5–124	
	Methotrexate	1	
	Cyclophosphamide	0.019–4.5	
	Ifosfamide	0.01–1.9	0.01–7.0
Beta blockers	Metoprolol	0.419–25.1	0.03–6.50
Hormones	17 $\beta$ -Estradiol, E2	0.028–0.043	0.0–3.0
	Estriol, E3	0.353–0.502	0.0–0.32
	Estrone, E1	0.017–0.034	0.0–0.8
	Ethinylestradiol, EE2	0.015–0.018	0.001–0.007
Contrast media	Iopromide	0.2–2,500	0.2–22
	Iomeprol	0.01–1,392	
Anti-diabetics	Glibenclamide	0.048–0.113	0.05–0.159

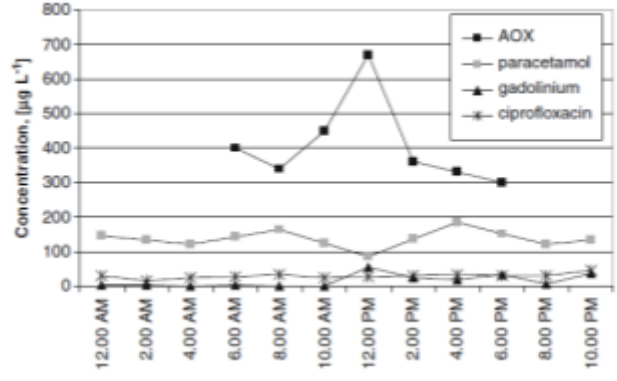
### 3.1.5. Contamination des effluents hospitaliers par les résidus de médicaments et produits toxiques

Les produits pharmaceutiques (PhCs) détectés dans les eaux usées sont dénommés contaminants émergents. Une de leurs caractéristiques est que leur persistance dans l'environnement n'est pas nécessaire pour entraîner des effets néfastes, car leur biodégradation éventuelle est contrebalancée par leur perpétuelle introduction dans l'environnement Barcelo (2003). Ces contaminants émergents incluent un large spectre de composés avec différentes propriétés physico-chimiques en termes de solubilité, adsorption, absorption, biodégradation, polarité et stabilité entraînant des devenir différents et par conséquent des concentrations différentes dans les eaux usées. Leurs concentrations moyennes sont relativement faibles de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  mg L/1, beaucoup plus faibles que les conventionnels macropolluants (DBO5, DCO, azote et composé phosphoré...). (Tableau 14) (Boillot *et al.*, 2008; Duong *et al.*, 2008).

Parmi les PhCs qui ont été administrés aux patients, une grande majorité est éliminée sous forme inchangée, principalement dans les urines pour environ 55-80% du total à quelques exceptions près (Jjemba, 2006; Joss *et al.*, 2006) et partiellement dans les selles. Seule une infime partie est métabolisée dans le corps humain. L'ensemble de ces substances va être éliminé dans les effluents hospitaliers où elles sont alors retrouvées à des concentrations de l'ordre du ng/l ou du microgramme/l. C'est le cas de nombreux antibiotiques, agents cytostatiques, anesthésiques, désinfectants, mais aussi métaux lourds (platine et mercure), éléments rares (gadolinium, indium et osmium) (Kümmerer *et al.*, 1999; Kümmerer\* and Helmers†, 2000; Kümmerer, 2001)

Parmi les médicaments, les scientifiques et les chercheurs portent une attention particulière aux antibiotiques et antinéoplasiques. La première raison de cette attention est la volonté de réduire la diffusion dans l'environnement de grandes quantités d'antibactériens pouvant contribuer au développement de bactéries multi-résistantes (Kümmerer and Henninger, 2003; Hartemann, P., Hautemaniere, A., Joyeux, 2005; Novo and Manaia, 2010), la seconde raison est que la présence de certains cytostatiques mais aussi certains antibiotiques comme les fluoroquinolones, confère aux effluents hospitaliers des propriétés de mutagénèse et de toxicité envers les bactéries (Ferk *et al.*, 2009) (Hartmann, 1998 ;).

Escudero-onate a récemment résumé les études ayant recherché la présence d'antibiotiques dans les effluents hospitaliers (Escudero-Oñate *et al.*, 2017). Leur présence a été détectée sur l'ensemble des continents mais avec des concentrations très variables d'un hôpital à un autre en



**Figure 19 :** Variation des concentrations de composés pharmaceutiques (AOX (dérivés halogénés), paracétamol, gadolinium et ciprofloxacin) dans les effluents urbains au cours de la journée selon (Verlicchi, Galletti and Al Aukidy, 2013)

raison des critères hospitaliers cités plus haut. Les fluoroquinolones, les bêtalactamines, les macrolides, les sulfamides et les lincosamides sont parmi ceux les plus identifiés dans les effluents hospitaliers. Il faut cependant interpréter avec précaution ces résultats car d'une part ils ne donnent que les concentrations des antibiotiques recherchés et d'autre part les techniques de mesures utilisées sont plus ou moins sensibles selon les antibiotiques recherchés. De plus, la politique d'utilisation de certains antibiotiques, différente selon les pays, peut modifier aussi l'interprétation de ces résultats. Par exemple, aux USA, la vancomycine est très utilisée en première ligne de traitement des infections, tandis qu'en Europe, son utilisation est restreinte. D'autres facteurs, comme le type d'échantillonnage, peuvent aussi expliquer des variations de concentrations en médicaments qui ne sont pas constantes au cours de la journée. Ainsi la figure 19 montre que la concentration de ciprofloxacine est constante au cours de la journée contrairement à celle du gadolinium ou d'halogène organique adsorbable pour lesquels un pic à 12H est notée (Boillot *et al.*, 2008).

## 3.2. Risque écotoxicologique des antibiotiques dans les effluents hospitaliers

Du fait de la présence de ces résidus médicamenteux, une évaluation des risques environnementaux est nécessaire afin de pouvoir instaurer des mesures de gestion des risques appropriés. L'évaluation des risques environnementaux vise à comparer les niveaux d'expositions avec des niveaux de dangerosité (valeurs seuils) connus ou estimés, afin d'apprécier si le risque est acceptable ou bien s'il nécessite la mise en place de prévention/protection (gestion des risques). Nous nous focaliserons essentiellement sur le risque écotoxicologique des effluents hospitaliers concernant deux familles d'antibiotiques, les fluoroquinolones et les bêtalactamines.

### 3.2.1. Principes généraux de l'évaluation du risque environnemental (ERE)

L'étude des dangers et des risques liés aux antibiotiques repose sur l'évaluation des risques environnementaux (ERE), qui est une démarche générale codifiée. L'ERE se déroule classiquement en quatre étapes, comprenant :

-l'identification des dangers, qui vise à spécifier les effets indésirables qu'une substance est intrinsèquement capable de provoquer dans l'environnement ; à partir d'études écotoxicologiques, cette étape inclut l'étude du devenir et du comportement de la substance dans l'environnement (métabolisation par des organismes vivants, dégradation dans l'environnement)



**Tableau 15 :** Facteurs d'extrapolation (de sécurité) en fonction des données écotoxicologiques disponibles

données écotoxicologiques disponibles	facteurs d'extrapolation
au moins une C(E)L50 d'un essai court terme pour chacun des trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés et algues)	1000
une NOEC d'un essai long terme (poisson ou invertébrés)	100
deux NOEC d'essais long terme avec deux espèces représentatives de deux niveaux trophiques (poissons et/ou invertébrés et/ou algues)	50
trois NOEC d'essais long terme pour au moins trois espèces représentant trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés, algues)	10
données de terrain ou écosystème modèle	évalué au cas par cas

**Tableau 16 :** Données standardisées des bêta-lactamines exprimant les concentrations induisant des effets létaux (LC50), des effets toxiques (EC50), des effets d'inhibition (IC50), mais aussi les plus petites concentrations induisant des effets observables (LOEC), ou les concentrations n'induisant pas d'effet observable (NOEC) sur divers espèces

Substances	Type d'organisme	Espèces	LC50	EC50	IC50	NOEC	LO EC	Référence	
Ampicilline	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Anabaena cylindrica</i>		140			13	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Anabaena flos-aquae</i>		3300			160	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Bactérie</b>	<i>Vibrio fischeri</i>		163 000				(Backhaus and Grimme, 1999)	
	<b>Bactérie</b>	<i>Vibrio fischeri</i>				2 627 000		(Park and Choi, 2008)	
	<b>Bactérie</b>	<i>Vibrio fischeri</i>				1 056 000		(Park and Choi, 2008)	
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Synechococcus leopoldensis</i>		83			25	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Synechococcus sp.</i>			6.9		0.31	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i>			0.2		0.031	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Microcystis wesenbergii</i>			13		2	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Nostoc sp.</i>		>200 000			100'000	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Algue</b>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		>1 000 000			>1 000 000	(Ando <i>et al.</i> , 2007)	
	<b>Algue</b>	<i>Selenastrum capricornutum</i>		>1 000 000			>1 000 000	(Eguchi <i>et al.</i> , 2004)	
	<b>Algues</b>	<i>Anabaena variabilis</i>		2200			160	Ando and Nagase, 2007	
	<b>Algues</b>	<i>Chlorella vulgaris</i>		>1 000 000			>1 000 000	(Eguchi <i>et al.</i> , 2004)	
	<b>Algue</b>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		>2 000 000				(Magdaleno <i>et al.</i> , 2014)	
	<b>Poisson</b>	<i>Danio rerio</i>						0,00 5	(Oliveira <i>et al.</i> , 2013)
	<b>Poisson</b>	<i>Danio rerio</i>					0,002		(Oliveira <i>et al.</i> , 2013)
	<b>Poisson</b>	<i>Danio rerio</i>						0,00 1	(Oliveira <i>et al.</i> , 2013)
	Amoxicilline	<b>Bactérie</b>	Bactérie aérobie			>100 000			(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)
<b>Bactérie</b>		Bactérie aérobie			>100 000			(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)	
<b>Bactérie</b>		Bactérie					20	(Hartmann <i>et al.</i> , 1998)	
<b>Bactérie</b>		<i>Vibrio fischeri</i>		2423290				(Ortiz de Garcia <i>et al.</i> , 2014)	

	<b>Bactérie</b>	<i>Vibrio fisheri</i>		3597 (15min)		(Park and choi et al.,2008)
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Anabaena</i>	56300 ± 25 00			(González-Pleiter <i>et al.</i> , 2013a)
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	3,7			(Lützhøft, Halling-Sørensen and Jørgensen, 1999)
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Synechococcus leopolensis</i>	2.22		0.78	1.56 (Andreozzi, Raffaele and Nicklas, 2003)
	<b>Algue</b>	<i>Selenastrum capricornutum</i>			250 000	(Lützhøft, Halling-Sørensen and Jørgensen, 1999)
	<b>Algue</b>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>2 000 000			(Magdaleno <i>et al.</i> , 2014)
	<b>Algue</b>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>1500000			(González-Pleiter <i>et al.</i> , 2013a)
	<b>Végétaux</b>	<i>Lemna gibba</i>	> 1000			(Brain <i>et al.</i> , 2004)
	<b>Cryptophytes</b>	<i>Rhodomonas salina</i>	3 108 000			(Lützhøft, Halling-Sørensen and Jørgensen, 1999)
	<b>Cnidaires</b>	<i>Hydra vulgaris</i>				100 (Pascoe, Karntanut and Müller, 2003)
Benzylpenicillin	<b>Bactérie</b>	Bactérie aérobie		>100 000		(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)
	<b>Bactérie</b>	Bactérie aérobie		>100 000		(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	6			(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
	<b>Algue</b>	<i>Selenastrum capricornutum</i>			100 000	(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
Cephalothine	<b>Algue</b>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>600 000			(Magdaleno <i>et al.</i> , 2014)
Cephazoline	<b>Algue</b>	<i>Selenastrum capricornutum</i>	>1 000 000		>1 000 000	(Eguchi <i>et al.</i> , 2004)
Ceftriaxone	<b>Bactérie</b>	Bactérie aérobie		>100 000		(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)
	<b>Bactérie</b>	Bactérie aérobie		>100 000		(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)
Imipénème	<b>Bactérie</b>	Bactérie aérobie		1000-10 000		(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)
	<b>Bactérie</b>	Bactérie aérobie		>100 000		(Kümmerer <i>et al.</i> , 2004)
Meticillinam	<b>Bactérie</b>	Sludge bacteria	62100 000			(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	60 000			(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)



---

<b>Algues</b>	<i>Selenastrum capricornutum</i>	300 000	(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
<b>Crustacée</b>	<i>Daphnia magna</i>	300 000	(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
<b>Poisson</b>	<i>Brachydanio rerio</i>	100 000	(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)

---

**Tableau 17** : Données standardisées des fluoroquinolones exprimant les concentrations induisant des effets létaux (LC50), des effets toxiques (EC50), des effets d'inhibition (IC50), mais aussi les plus petites concentrations induisant des effets observables (LOEC), ou les concentrations n'induisant pas d'effet observable (NOEC) sur divers espèces

Organismes	Espèces	EC50 µg/L	NOEC µg/L	IC 50	LOEC	Références
Ciprofloxacine	Activated sludge bacteria	610.0				(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Vibrio fisheri</i>	11500 (30 min)				(Martins <i>et al.</i> , 2012)
	<b>Bactérie</b>	<i>Vibrio fisheri</i>	5600000 (15 min)			(Ji <i>et al.</i> , 2013)
		<i>Pseudomonas putida</i>	80.0			(Kümmerer, Al-Ahmad and Mersch-Sundermann, 2000)
		<i>Selenastrum capricornutum</i>	2970.0			(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	29700.0			(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)
	<b>Algue</b>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	18700 (16200;21200)			(Robinson, Belden and Lydy, 2005)
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	6700.0	<5000		(Yang <i>et al.</i> , 2008)
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	11300±700			(Magdaleno <i>et al.</i> , 2014)
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Microcystis aeruginosas</i>	5.0			(Halling-Sorensen <i>et al.</i> , 2000)

<b>Norfloxacine</b>		<i>Microcystis aeruginosas</i>	17 (14;20)		(Robinson, Belden and Lydy, 2005)	
		<i>Anabaena flos-aquae</i>	10.2	5,65 (Ec10)	(Ebert et al., 2011)	
	<b>Plante</b>	<i>Lemna minor</i>	203 (41-364)			(Robinson, Belden and Lydy, 2005)
		<i>Lemna minor</i>	62.5	10.0		(Ebert et al., 2011)
		<i>Myriophyllum spicatum</i>		980.0		(Ebert et al., 2011)
	<b>Crustacée</b>	<i>Daphnia magna 48h</i>		60000.0		(Halling-Sorensen et al., 2000)
	<b>Poisson</b>	<i>Danio rerio</i>		100000.0		(Halling-Sorensen et al., 2000)
	<b>Bactérie</b>	<i>Vibrio fisheri</i>		5.2		Cemagref
		<i>Vibrio fisheri</i>		11.5		Cemagref
		<i>Vibrio fisheri</i>	22.0	10.4		(Backhaus and Grimme, 1999)
	<b>Cyanobactérie</b>	<i>Anabaena sp</i>	5600 ± 500			(González-Pleiter et al., 2013a)
	<b>Algue</b>	<i>Chlorella vulgaris</i>	10400.0	4020.0		(Eguchi et al., 2004)
		<i>Selenastrum Capricornutum</i>	16600.0	4010.0		(Eguchi et al., 2004)
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	18000.0	2000.0		(Yang et al., 2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i>		50180.0			(Nie et al., 2009)	

<b>Ofloxacin</b>		<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	>80000		(González-Pleiter <i>et al.</i> , 2013a)		
	<b>Bactérie</b>		<i>Vibrio fisheri</i>	13.6	1.1	(Backhaus and Grimme, 1999)	
			<i>Vibrio fisheri</i>	223000 (15min)		(Tobajas <i>et al.</i> , 2016)	
			<i>Pseudomonas putida</i>	10.0		(Kummerer K. <i>et al.</i> , 2000)	
			<i>Pseudomonas putida</i>	1000 (16h)		(Tobajas <i>et al.</i> , 2016)	
			<i>Vibrio fisheri</i>	>90 000		(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)	
	<b>Cyanobactérie</b>		<i>Microcystis aeruginosas</i>	21 (18;24)		(Robinson, Belden and Lydy, 2005)	
	<b>Plante</b>		<i>Lemna minor</i>	126 (52-201)		(Robinson, Belden and Lydy, 2005)	
	<b>Crustacée</b>		<i>Brachionus calyciflorus</i>	530.0		(Isidori <i>et al.</i> , 2005)	
			<i>Daphnia magna 48h</i>	31500.0		(Isidori <i>et al.</i> , 2005)	
			<i>Daphnia magna 48h</i>	76580.0		(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)	
			<i>Ceriodaphnia dubia</i>	26700.0	10000.0		(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)
			<i>Ceriodaphnia dubia</i>	3130.0			(Isidori <i>et al.</i> , 2005)
	<b>Algue</b>		<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	1440.0		(Isidori <i>et al.</i> , 2005)	
		<i>Pseudokirckneriella subcapitata</i>	4740.0	2500.0		(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)	

	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	12100 (10400-13700)		(Robinson, Belden and Lydy, 2005)
	<i>Synechococcus leopolensis</i>	16.0	5.0	(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)
<b>Rotifère</b>	<i>Brachionus calyciflorus</i>		12500.0	(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)
<b>Diatomée</b>	<i>Cyclotella Meneghiniana</i>	90.6	31.2	(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)
<b>Poisson</b>	<i>Danio rerio</i>		>16000	(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)

- La caractérisation des dangers, qui a pour but de préciser le rapport dose-réponse, et qui se traduit par l'évaluation de la Predicted no effect concentration (PNEC) ou concentration prévisible sans effet pour l'environnement

-l'évaluation de l'exposition, qui correspond à l'estimation des concentrations de la substance et de ses métabolites auxquelles un écosystème (biotope et biocénose) est susceptible d'être exposé ; elle est traduite par la Predicted environmental concentration (PEC) ou concentration prévisible dans l'environnement.

-la caractérisation du risque, qui consiste en l'estimation de l'incidence et des effets indésirables susceptibles de se produire dans l'environnement compte tenu de l'exposition à la substance et à ses métabolites, est défini à l'aide du rapport PEC/PNEC, appelé Hazard quotient (HQ).

### 3.2.2. Définition des Predicted No Effect Concentration (PNEC) ou concentrations prévisibles sans effet des antibiotiques dans les effluents hospitaliers

Les antibiotiques peuvent avoir deux effets écotoxicologiques sur l'environnement ; ils peuvent être toxiques ou mutagènes à une certaine dose ou bien favoriser l'apparition de résistance. Deux modes de calculs de PNEC ont donc été élaborés dans l'évaluation des risques environnementaux des antibiotiques dans les effluents hospitaliers.

Une PNEC peut être calculée à partir des données écotoxicologiques. La détermination des concentrations prédites sans effet (PNEC) est basée sur les recommandations de l'EMEA sur l'Environmental Risk Assessment (EAR)(EMEA, 2006). Elle repose dans un premier temps sur trois tests de toxicité chronique effectués sur trois espèces de niveaux trophiques différents (algue, daphnie et poisson) et d'un test de toxicité sur bactérie pour les substances ayant une activité antimicrobienne (test d'inhibition de la respiration des boues activées).

La PNEC est alors obtenue en divisant la concentration sans effet observé (NOEC) minimale de ces trois tests par un facteur de sécurité (AF ou assessment factor). Le tableau ci-joint (Tableau 15) énumère les valeurs possibles de l'AF.

Des recherches complémentaires sont souvent nécessaires afin de quantifier et prédire les effets toxiques des résidus médicamenteux sur l'environnement. En l'absence de NOEC, nous devons utiliser d'autres données d'écotoxicologie comme la CE50/CL50 (Concentration létale causant 50% de mortalité). Les tableaux 16 et 17 recensent l'ensemble des résultats PNEC disponibles sur les FQ et les bêtalactamines.

**Tableau 18 :** Predicted No Effect Concentration (PNEC) des bêta-lactamines et des fluoroquinolones estimées selon les plus faibles Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016)

Famille	Antibiotiques	Nombre de souches testées	Plus faible CMI observée	Plus faible CMI ajustée	PNEC (sélection de la résistance)
Pénicilline et inhibiteur associé	Amoxicilline	29	4	2	0.25
	Amoxicilline–acide clavulanique	4	1000	64	8
	Ampicilline	64	4	4	0.25
	Ampicilline–sulbactame	3	500	32	2
	Ampicilline–sulbactame (ratio)	23	125	64	4
	Benzylpenicilline	47	4	4	0.25
	Phenoxymethylpenicilline	8	4	0.5	0.064
	Piperacilline	30	8	4	0.5
	Piperacilline–tazobactam	43	4	4	0.25
	Oxacilline	24	32	16	1
	Ticarcilline	16	250	64	8
	Ticarcilline–acide clavulanique	14	64	16	2
	Cloxacilline	1	64	1	0.125
Céphalosporine	Cefaclor	11	32	8	0.5
	Cefalexine	10	250	32	4
	Cefaloridine	1	2000	32	4
	Cefalotine	13	64	16	2
	Cefazoline	18	32	8	1
	Cefepime	41	8	8	0.5
	Cefepime–clavulanate	1	1000	16	2
	Cefixime	11	4	1	0.064
	Cefoperazone	13	16	4	0.5
	Cefotaxime	33	2	1	0.125
	Cefotaxime–clavulanate	2	8	0.25	0.032
	Cefoxitine	26	250	125	8

Les bactéries résistantes peuvent être sélectionnées par des antibiotiques présents dans les effluents hospitaliers. Les faibles concentrations d'antibiotiques (concentrations sub-CMI) peuvent notamment jouer un rôle dans la sélection de bactéries multirésistantes et favoriser le transfert génétique entre certaines bactéries (Gullberg *et al.*, 2011, 2014; Andersson and Hughes, 2012; Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Récemment, une PNEC évaluant la capacité de l'antibiotique à sélectionner des bactéries résistantes a été définie. D'après Bengtsson, ces PNEC sont établies à partir des plus petites Concentrations Minimales Inhibitrices de l'antibiotique quel que soit l'espèce bactérienne sensible à l'antibiotique. Ces données sont extraites des données de l'EUCAST (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016). Chaque CMI a été ajustée en fonction du nombre d'espèces bactériennes testées. Les PNEC ont été fixées en utilisant un facteur de 10 pour tenir compte de la différence entre la CMI et la concentration minimale sélective (Tableau 18). Cette PNEC de sélection des bactéries résistantes peut-être comparable à la PNEC déterminée en écotoxicologie (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016).

### 3.2.3. Modalités d'estimation de l'exposition aux résidus de médicaments dans l'environnement

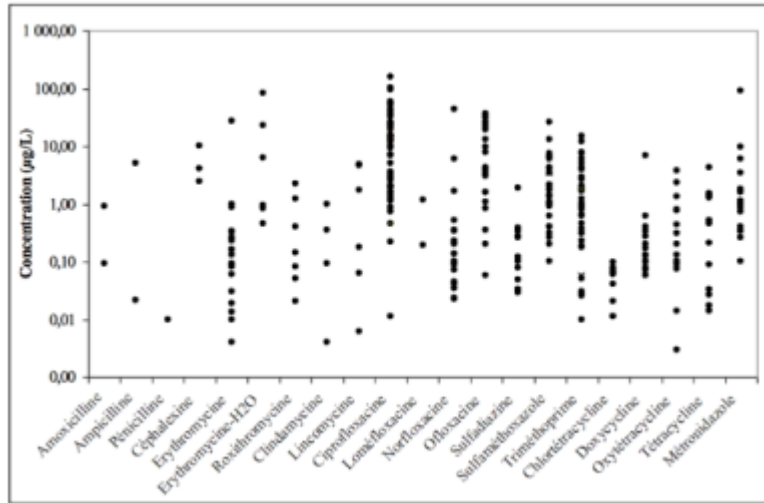
Afin d'évaluer les risques liés à la présence des résidus médicamenteux, et plus globalement des substances chimiques, dans l'environnement, il est nécessaire d'estimer les niveaux d'expositions des sujets d'intérêt. Il faut pour cela d'une part identifier les voies d'exposition des sujets et d'autre part évaluer les concentrations dans les différentes matrices relatives à ces voies de contamination.

Dans l'environnement aquatique, les niveaux d'expositions sont *stricto sensu* les concentrations et teneurs de résidus pharmaceutiques dans les différents compartiments du milieu (eaux de surface, sédiments...)

Deux approches sont couramment adoptées pour déterminer les concentrations dans les milieux : faire des mesures analytiques ou faire des estimations par le biais de modélisations. Ces deux méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients qui ont été listés (Liebig, Moltmann and Knacker, 2006; Johnson *et al.*, 2008; Guillén *et al.*, 2012).

Le développement rapide des méthodes analytiques est en grande partie responsable de la mise en évidence de la contamination ubiquitaire de l'environnement par les résidus médicamenteux. En





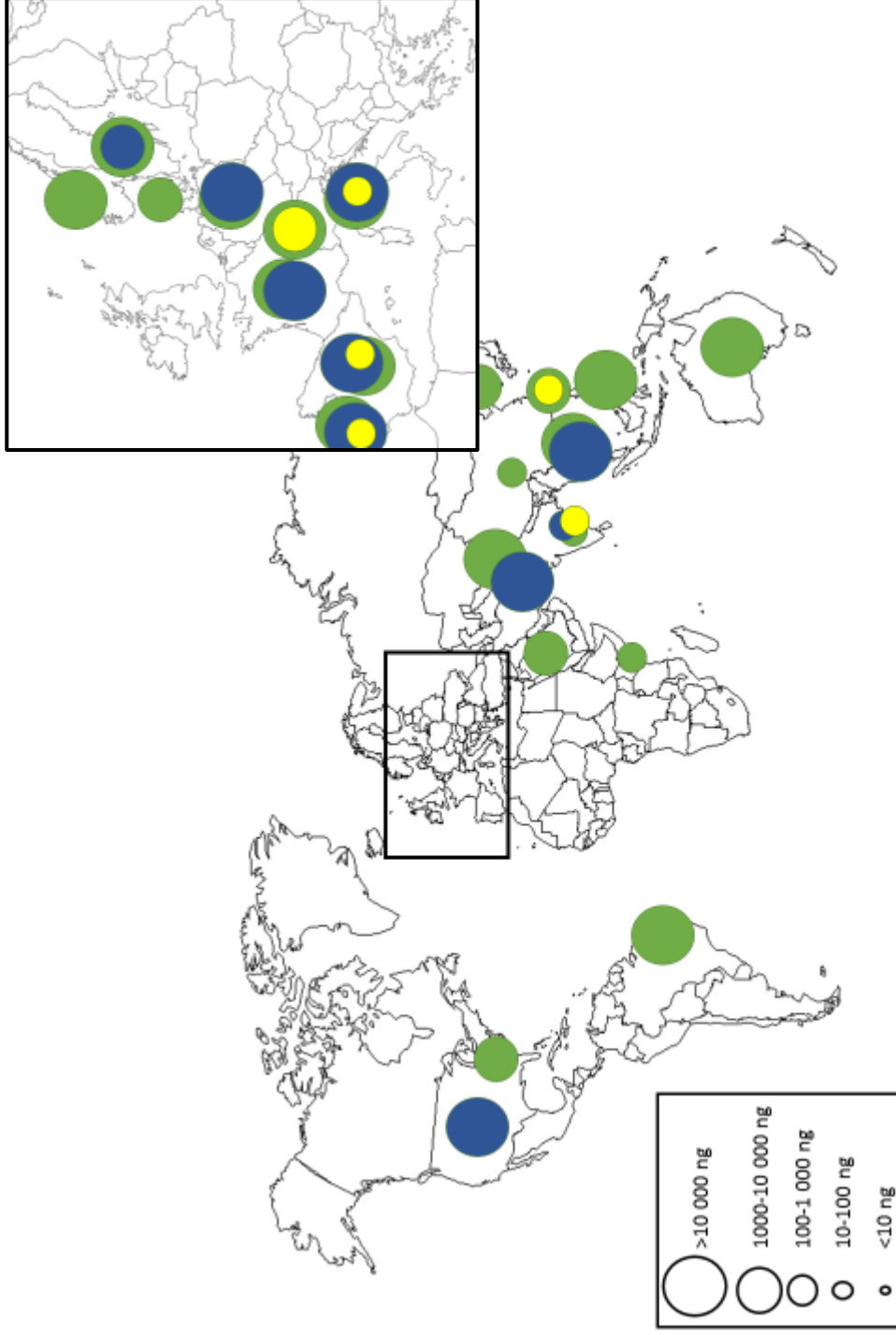
**Figure 20** : Mesures de concentrations de 21 antibiotiques issus de 21 effluents hospitaliers  
(Clotilde Boillot, 2008)

effet, le développement de méthodes d'analyses « multirésidus », basées sur l'association de méthode chromatographique (en phase gazeuse et surtout liquide, plus adaptée aux substances polaires) et de spectrométrie de masse a permis de chercher des éléments à l'état de trace (ng/l voir pg/l) et en mélange dans l'environnement. Ces déterminations analytiques permettent de définir le paramètre Measured Environmental Concentration (MEC), utilisé dans l'évaluation du risque environnemental.

Cette approche mesure les concentrations effectivement présentes dans l'environnement (à l'incertitude près de la méthode d'analyse), et sa fiabilité ne dépend pas de la qualité de données (au contraire des modélisations). De plus, la précision et l'exactitude des mesures sont normalement assurées lorsqu'un système d'assurance qualité adéquat est mis en place dans les laboratoires effectuant les analyses. Cette approche présente cependant un certain nombre d'inconvénients ou de contraintes. Le premier, et le plus trivial, est qu'elle ne permet de trouver que les molécules que l'on recherche. Les campagnes analytiques se focalisent souvent sur un nombre restreint de molécules, allant de quelques-unes à quelques dizaines, et peuvent donc omettre des contaminations importantes. Le second inconvénient majeur est l'incertitude liée aux méthodes d'échantillonnages. En effet, les concentrations de résidus médicamenteux peuvent varier considérablement temporellement et spatialement, c'est pourquoi la mise au point et la validation de la méthode d'échantillonnage sont primordiales (fréquence de prélèvement, point de prélèvement, condition de conservation...).

Malheureusement ces aspects ne sont pas toujours respectés, ce qui peut mener à des biais importants dans les résultats. La figure 20 nous permet de constater que les valeurs des concentrations sont très dispersées quel que soit l'antibiotique recherché, variant du centième à la centaine de  $\mu\text{g/L}$ . Les valeurs les plus élevées correspondent à la ciprofloxacine (155  $\mu\text{g/L}$ , Brésil), au métronidazole (90  $\mu\text{g/L}$ , Suède) et à l'erythromycine (83  $\mu\text{g/L}$ , Allemagne) (Ohlsen *et al.*, 2003; Lindberg *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2009). A noter que les trois antibiotiques les plus recherchés sont la ciprofloxacine (une cinquantaine de données), le sulfaméthoxazole et le triméthoprime (une quarantaine de données) (Clotilde Boillot, 2008).

Un autre inconvénient de l'approche analytique est la disponibilité limitée des techniques analytiques pour certaines molécules et/ou certaines matrices environnementales comme les sols ou sédiments. Enfin les méthodes analytiques sont onéreuses, ce qui constitue peut-être le frein



**Figure 21** : Représentation mondiale des plus fortes concentrations de ciprofloxacine (vert), ofloxacine (bleu) et norfloxacine (jaune) détectées dans les effluents hospitaliers (les données de l'ensemble des études sont disponibles en annexe 3)

principal à leur utilisation plus systématique pour rechercher et quantifier les contaminants de l'environnement.

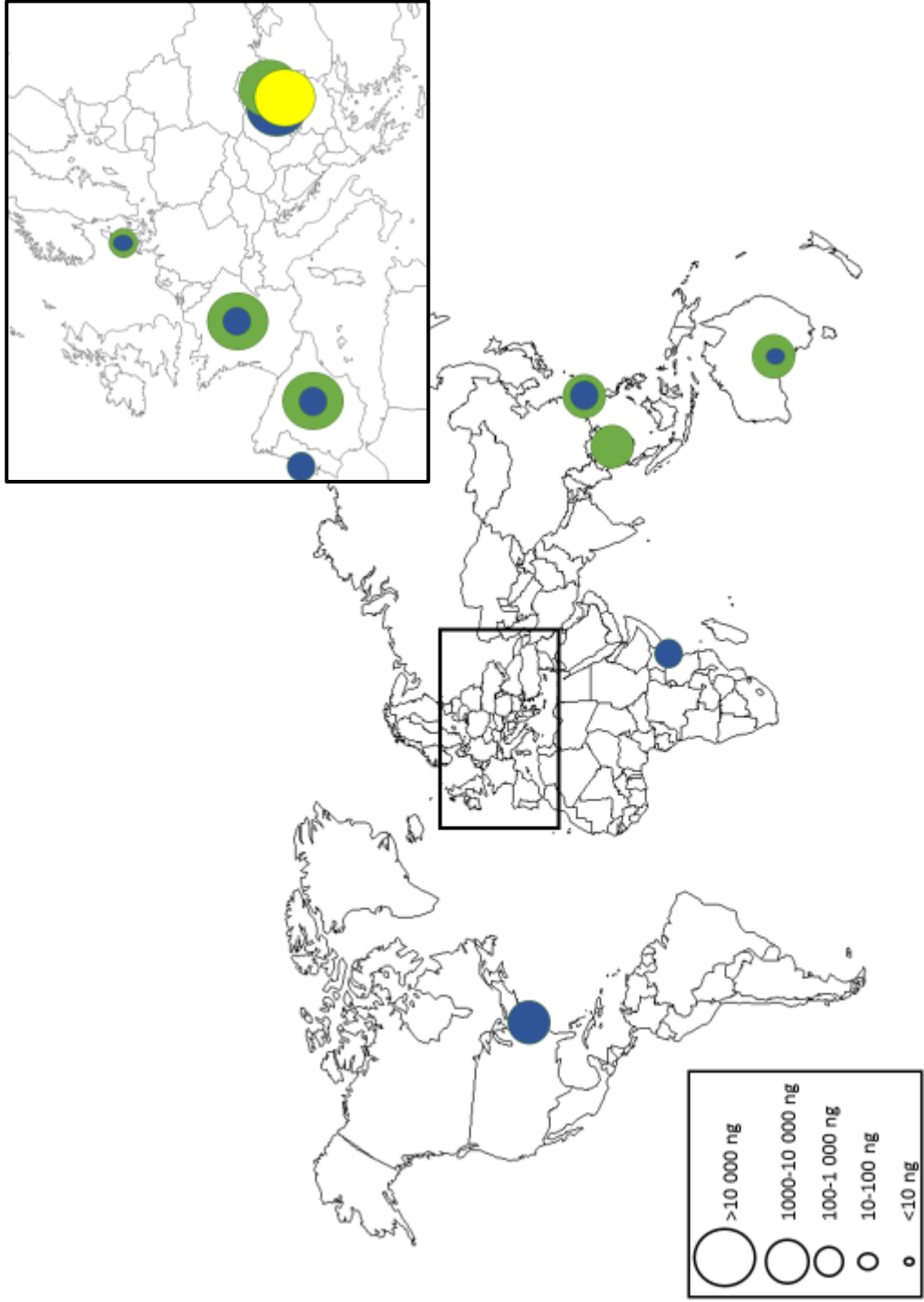
Une revue de la littérature permet de rassembler les MEC des bêta-lactamines et des principales fluoroquinolones dans les effluents hospitaliers. Les fluoroquinolones sont une des familles les plus fréquemment détectées dans les effluents hospitaliers. Leur présence a été rapportée en Europe, Amérique du Nord et Asie. Ciprofloxacine, ofloxacine et norfloxacine sont détectées à des concentrations entre 38 ng/l et 101 µg/l ; 26 ng/l et 37 µg/l ; et 23ng/l et 44µg/l respectivement (Figure 21 et annexe 3).

La détection des bêta-lactamines dans les effluents hospitaliers distingue généralement les pénicillines et les céphalosporines. Malgré la forte consommation de bêta-lactamines dans le monde, leur fréquence de détection dans les effluents hospitaliers est relativement faible et elles ont été détectées seulement dans un petit nombre de pays comme l'Espagne, Danemark, USA, Taiwan et Vietnam. Leur dégradation rapide dans les effluents comme expliqué précédemment en est probablement la raison. La concentration maximale de bêta-lactamines détectée dans les effluents hospitaliers a été de 5 µg/L pour les pénicillines (pénicilline G) et les céphalosporines (ceftazidime). Pour les carbapénèmes, une seule étude rapporte la détection d'imipénème dans un effluent hospitalier à une concentration de  $14420 \pm 390$  ng/L (figure 22 et annexe 4).

Une estimation des concentrations environnementales des résidus pharmaceutiques est calculable à l'aide des données de consommation et des paramètres décrivant leur devenir dans les systèmes d'assainissement et l'environnement naturel qui tient lieu d'exutoire (Pourcentage de dégradation en STEP, dégradation biotique et abiotique dans l'environnement, caractéristique environnementale, caractéristique de la molécule...). Cette estimation constitue la PEC (Predicted Environmental Concentration).

Le modèle le plus couramment utilisé pour calculer la PEC est le modèle déterministe à l'état stationnaire, adapté du guideline EMEA publié en 2006. Il tient compte d'un nombre restreint de paramètres, variable en fonction de la précision recherchée (consommation, paramètres pharmacocinétiques, paramètre d'élimination dans les STEP,...) qui suivent une relation de la forme :

$$PEC = (\text{consommation} * (1 - \text{taux de métabolisation}) * (1 - \text{taux d'élimination en STEP})) / (\text{volume d'eau usée} * \text{facteur de dilution cours d'eau})$$



**Figure 22 :** Représentation mondiale des plus fortes concentrations de Pénicilline (vert), Céphalosporine (bleu) et Imipénème (jaune) détectées dans les effluents hospitaliers (les données de l'ensemble des études sont disponibles en annexe 4)

Les résultats sont exprimés soit par des PEC uniques, obtenues en prenant en compte une seule valeur par paramètre, soit des intervalles de PEC [min-max] résultant de l'utilisation des valeurs les moins conservatives et les plus conservatives pour chaque paramètre. Elles sont calculées à l'équilibre et sont donc considérées comme stables temporellement.

Le recours à la PEC est utile afin de réduire le coût d'échantillonnage des campagnes de prélèvement qui sont cependant nécessaires quand une grande précision est exigée. Cette approche est notamment mise en oeuvre pour certaines substances pour lesquelles aucune méthode analytique n'est disponible ou lorsque la limite de quantification n'est pas assez basse (Ort, Lawrence, Reungoat, Eaglesham, *et al.*, 2010), mais aussi dans des situations où il serait difficile d'échantillonner des eaux usées en raison des systèmes d'égouts complexes et/ou inaccessibles, finalement, dans certains cas où un échantillonnage représentatif est impossible (Ort, Lawrence, Reungoat and Mueller, 2010; Escher *et al.*, 2011; Le Corre *et al.*, 2012).

Il est important de connaître les limites de ce calcul pour estimer une concentration d'antibiotiques dans les effluents hospitaliers. La PEC correspond à la valeur moyenne des consommations d'antibiotiques de l'hôpital, n'incluant pas les fluctuations des traitements des patients. Cette PEC intègre la consommation brute des antibiotiques, or le traitement est très rarement consommé entièrement. Par ailleurs, les patients peuvent prendre leurs traitements ou terminer de prendre leurs traitements hors de l'hôpital. Les antibiotiques ne sont donc pas totalement excrétés dans les effluents hospitaliers. Le manque de compliance des patients peut avoir une importance dans l'estimation de la PEC. Bianchi *et al.* a montré que pour les antipsychotiques, la compliance était aux alentours de 64% (Bianchi, Bianchini and Scanavacca, 2011). De plus, dans le calcul de la PEC, la stabilité des molécules n'est pas prise en compte. Malgré toutes ces limites, ces PEC donnent des résultats relativement fiables avec peu de données (Heberer and Feldmann, 2005; Bound and Voulvoulis, 2006; El and Roig, 2008; Ort, Lawrence, Reungoat, Eaglesham, *et al.*, 2010; Ter Laak *et al.*, 2010; Le Corre *et al.*, 2012; Oosterhuis, Sacher and Ter Laak, 2013).

### **3.3. Quantification des risques environnementaux liés aux résidus médicamenteux**

Comme vu précédemment les antibiotiques sont considérés comme un groupe thérapeutique très présent dans les effluents hospitaliers et parmi les principaux contributeurs au risque environnemental élevé de ces effluents (P Verlicchi *et al.*, 2012; Al Aukidy, Verlicchi and



Voulvoulis, 2014; Mendoza *et al.*, 2015). Ce risque environnemental est évalué en calculant le HQ ou quotient de risque pour les différents antibiotiques, ce quotient étant le rapport entre la PEC ou la MEC et la PNEC. Les critères communément utilisés pour juger du risque environnemental sont  $HQ < 0.1$  risque minimum pour les organismes aquatiques ;  $0.1 < HQ < 1$  Risque faible ;  $1 < HQ < 10$  Risque modéré ;  $HQ > 10$  risque élevé (Hernando *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2009; J.-L. Zhao *et al.*, 2010).

Comme vu précédemment, trois niveaux trophiques peuvent être utilisés pour établir la PNEC (algue, daphnie et poisson). Les algues s'avèrent être l'espèce la plus sensible aux antibiotiques, néanmoins les antibiotiques peuvent entraîner une toxicité à tous les niveaux trophiques, représentant un danger pour le système aquatique entier (Santos *et al.*, 2013). Les antibiotiques comme l'ofloxacin, la clarithromycine et le triméthoprime ont été fréquemment identifiés comme des substances à haut risque pour les organismes aquatiques ( $HQ > 1$ ) (Santos *et al.*, 2013; Orias and Perrodin, 2014; Mendoza *et al.*, 2015) ainsi que l'érythromycine, le sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine (Thomas *et al.*, 2007; P Verlicchi *et al.*, 2012; Daouk *et al.*, 2016).

Une étude de Orias et Perrodin montrée que le HQ était supérieur à 1000 pour l'ofloxacin, la norfloxacine, le triméthoprime et le sulfapyridine (Orias and Perrodin, 2014), tandis que Mendoza et al ont trouvé des HQ supérieurs à 10 pour l'ofloxacin, le triméthoprime et la clarithromycine dans un hôpital de Valence (Espagne)(Mendoza *et al.*, 2015).

Une étude réalisée dans un hôpital brésilien s'est intéressée au devenir de 21 antibiotiques, représentant 7 classes différentes (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, aminosides, macrolides, quinolones, et sulfamides). 14 antibiotiques avaient un risque environnemental élevé, 5 un risque environnemental modéré et seulement deux un risque environnemental faible (Benzylpenicilline et sulfaméthoxazole) (De Souza *et al.*, 2009). Ce sont les céphalosporines, macrolides, et triméthoprimés qui présentaient le risque environnemental le plus élevé.

Une des principales limites de nombreuses études est qu'elles ne prennent pas en compte la présence simultanée de plusieurs molécules dans les matrices étudiées (« effet cocktail »). Certaines publications commencent à explorer ces situations (Castiglioni *et al.*, 2008; González-Pleiter *et al.*, 2013a) et montrent que l'effet cumulatif des toxicités devrait être prise en compte, notamment dans le cas d'exposition à la molécule mère et à ses métabolites/produits de dégradation, ou dans le cas de molécules ayant des mécanismes d'actions similaires. Une étude a ainsi testé la toxicité individuelle ou combinée de 5 antibiotiques sur des organismes aquatiques



**Tableau 19** : Evaluation des concentrations toxiques des mélanges d'antibiotiques sur divers organismes

Substances	Type d'organisme	Espèces	LC50	EC50	IC 50	NOEC	LOE C	Références
Céphalotine + Ciprofloxacine	Algues	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		900±150				(Magdaleno <i>et al.</i> , 2014)
Amoxicilline + Norfloxacine	Cyanobactérie	<i>Anabaena sp</i>		33100 ± 3300				(González-Pleiter <i>et al.</i> , 2013a)
Erythromycine + Levofloxacine + Norfloxacine + Tetracycline + Amoxicilline	Cyanobactérie	<i>Anabaena sp</i>		12400 ± 800				(González-Pleiter <i>et al.</i> , 2013a)
Mixture FQ	Bactérie	<i>Vibrio fisheri</i>		237				(Backhaus, Scholze and Grimme, 2000)

(González-Pleiter *et al.*, 2013b). Les cyanobactéries étaient en général beaucoup plus sensibles aux antibiotiques testés que les algues. L'association des antibiotiques provenant de diverses familles avaient un effet synergique sur la toxicité pour des organismes testés (Magdaleno *et al.*, 2014) Le tableau 19 récapitule les données de toxicité de mélanges d'antibiotiques. Cependant ces associations pharmaceutiques peuvent avoir des effets synergiques ou agonistes (De Souza *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013; Daouk *et al.*, 2016) mais des effets antagonistes peuvent aussi être constatés. La présence de l'ensemble de ces ATB dans les effluents hospitaliers pourrait augmenter le risque de sélection ou d'émergence de bactéries résistantes.

### **3.4. Bactéries résistantes aux antibiotiques dans les effluents hospitaliers : rôle des biofilms**

Le potentiel rôle de réservoir des effluents hospitaliers constitue un autre risque associé dans le développement ou l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et dans la circulation de gènes de résistances (Verlicchi, Al Aukidy and Zambello, 2015). De nombreuses études ont recherché la présence de ce type de contamination dans les effluents hospitaliers et ont détecté des bactéries multirésistantes à plusieurs familles d'antibiotiques (Jakobsen *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010; Fuentesfria, Ferreira and Corção, 2011; Korzeniewska, Korzeniewska and Harnisz, 2013; Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Maheshwari *et al.*, 2016). La majorité des études s'intéresse aux bactéries planctoniques mais très peu s'intéressent aux bactéries sous forme biofilms. Dans les effluents hospitaliers, la forme biofilm serait un mode de vie particulièrement adapté à la survie des bactéries dans les conditions environnementales. Costerton définit le biofilm comme une communauté bactérienne structurée et englobée dans une matrice hydratée de substances exopolymériques produites par les bactéries elles-mêmes et adhérentes à une surface inerte ou biotique (Costerton, Stewart and Greenberg, 1999). De Beer et al. mais aussi Stewart observent que les biofilms sont constitués d'agrégats séparés par du liquide interstitiel qui transporte les nutriments pour les cellules et les déchets produits par les bactéries (De Beer, Stoodley and Lewandowski, 1996; Stewart, 2003). Le biofilm est un système complexe qui a une densité cellulaire élevée allant de  $10^8$  à  $10^{11}$  cellules par gramme de masse humide (Stickler and Morgan, 2008; Balzer *et al.*, 2010). Il est composé de différents microorganismes comme des bactéries, protozoaires ou algues (Kesaano and Sims, 2014). Certains antibiotiques à des concentrations sub-CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) ; peuvent induire la formation de



**Tableau 20** : Liste des antibiotiques induisant à des concentrations sub-inhibitrices, la formation de biofilm par différentes espèces bactériennes ((Kaplan, 2011)

Class	Antibiotic	Bacterium
Aminocoumarin	Novobiocin	<i>S. epidermidis</i>
Aminoglycoside	Gentamicin Various Tobramycin Tobramycin	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
b-lactam	Ampicillin Imipenem Imipenem Nafcillin Oxacillin Various	<i>S. intermedius</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
Cefalosporin	Cefalexin Cefalotin Cefazolin Cefamandole Cefotaxime	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. typhimurium</i>
Chloramphenicol	Chloramphenicol	<i>E. coli</i>
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin Ciprofloxacin Moxifloxacin Various	<i>S. intermedius</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>E. coli</i>
Glycylcycline	Tigecycline	<i>S. epidermidis</i>
Glycopeptide	Vancomycin Vancomycin Vancomycin	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. lugdunensis</i>
Lipopeptide	Daptomycin	<i>S. lugdunensis</i>
Macrolide	Azithromycin Clarithromycin Clarithromycin Erythromycin Various	<i>S. epidermidis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>
Oxazolidone	Linezolid Linezolid Linezolid	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>
Rifamycin	Rifampin Rifampin Rifampin	<i>S. epidermidis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>E. coli</i>
Streptogramin	Quinupristin-dalfopristin Quinupristin-dalfopristin	<i>S. epidermidis</i> <i>S. lugdunensis</i>
Sulfonamide	Trimethoprim/sulfamethoxazole	<i>S. lugdunensis</i>
Tetracycline	Tetracycline Tetracycline Tetracycline Tetracycline Tetracycline	<i>S. epidermidis</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>

	<b>Cefpodoxime</b>	15	8	2	0.25
	<b>Cefpodoxime–clavulanique acide</b>	3	250	16	1
	<b>Ceftaroline</b>	8	4	0.5	0.064
	<b>Ceftazidime</b>	23	16	8	0.5
	<b>Ceftazidime–clavulanate</b>	1	8	0.125	0.016
	<b>Ceftiofur</b>	4	8	0.5	0.064
	<b>Ceftobiprole</b>	39	4	2	0.25
	<b>Ceftriaxone</b>	29	2	0.25	0.032
	<b>Cefuroxime</b>	29	8	4	0.5
<b>Monobactame</b>	<b>Aztreonam</b>	11	32	8	0.5
	<b>Mecillinam</b>	9	64	8	1
<b>Carbapénème</b>	<b>Imipeneme</b>	53	2	2	0.125
	<b>Doripeneme</b>	39	2	1	0.125
	<b>Ertapeneme</b>	36	2	1	0.125
	<b>Faropeneme</b>	1	8	0.125	0.016
	<b>Meropeneme</b>	50	2	0.5	0.064
<b>Fluoroquinolones</b>	<b>Acide Nalidixique</b>	17	500	125	16
	<b>Ciprofloxacin</b>	70	2	1	0.064
	<b>Ofloxacin</b>	26	8	4	0.5
	<b>Levofloxacin</b>	43	4	4	0.25
	<b>Norfloxacin</b>	15	16	4	0.5
	<b>Pefloxacin</b>	1	4000	64	8
	<b>Sparfloxacin</b>	23	2	1	0.064
	<b>Trovafloxacin</b>	3	8	0.5	0.032
	<b>Enrofloxacin</b>	4	8	0.5	0.064
	<b>Gatifloxacin</b>	21	4	2	0.125
	<b>Gemifloxacin</b>	16	2	0.5	0.064
	<b>Moxifloxacin</b>	53	2	2	0.125

biofilms notamment dans les effluents hospitaliers. En 2005, Hoffman et al ont démontré que des concentrations sub-CMI de tobramycine induisaient la formation de biofilm par *P aeruginosa* via des mécanismes impliquant la régulation de la concentration cellulaire de guanosine monophosphate dimérique cyclique (c-di-GMP)(Hoffman, Lucas; D'argenio, David; MacCoss, Michael; Zhang, Zhaoying; Jones, Roger; Miller, 2005). De nombreuses autres études ont confirmé les mêmes effets sur le biofilm pour d'autres antibiotiques à des concentrations sub-CMI (Tableau 20).

Les exopolymères, principaux constituants du biofilm, sont composés majoritairement de polysaccharides, de protéines et de lipides (Lazarova, 1995; Liang *et al.*, 2010; M. Simões, Simões and Vieira, 2010). Chacun de ces composés possède un rôle bien déterminé dans le biofilm. Ils définissent les propriétés morphologiques et physico-chimiques des biofilms comme la porosité, la densité, la rugosité, l'élasticité, la stabilité mécanique, l'architecture et l'activité des biofilms (Evans, 2000; Klapper *et al.*, 2002; Flemming, Neu and Wozniak, 2007; Kokare *et al.*, 2009; J.-L. Zhao *et al.*, 2010). Dans les biofilms des eaux usées, la proportion d'EPS est estimée entre 70-98% de la biomasse (Ivleva *et al.*, 2008; L. C. Simões, Simões and Vieira, 2010; Sheng, Yu and Li, 2010).

Les bactéries sont le composant constitutif essentiel du biofilm en adhérant par interactions entre elles et/ou avec les surfaces (Costerton, Stewart and Greenberg, 1999). La nature des microorganismes d'un biofilm est très variée. Elle peut être homogène avec une seule espèce de bactérie (eg *Vibrio cholerae*) (Teschler *et al.*, 2015), ou hétérogène, renfermant plusieurs espèces microbiennes. Dans les eaux usées, la composition microbienne des biofilms est très diversifiée, majoritairement composée de protéobactéries mais aussi de gammaprotéobactéries comme *Aeromonas* spp et *Acinetobacter* spp (Marti, Variatza and Balcazar, 2014) et cyanobactéries. Dans d'autres études, les biofilms des effluents hospitaliers sont composés majoritairement d'*Enterobacteriaceae* mais aussi de d'*Enterococci* et *Sstreptococci* spp (Schwartz *et al.*, 2003).

Outre un rôle structurant, par ses EPS, le biofilm a un rôle protecteur en déterminant une barrière réactive contre les agents antimicrobiens et les biocides (M. Simões, Simões and Vieira, 2010). Les bactéries antibiorésistantes et les éléments porteurs de résistances présents dans les effluents hospitaliers peuvent intégrer le biofilm (Donlan and Costerton, 2002). Le biofilm fournit un environnement adéquat pour les transferts horizontaux de gènes (Sørensen *et al.*, 2005; Gillings



*et al.*, 2009). La matrice fournit un environnement physique stable pour le contact de cellule à cellule requis pour les mécanismes de transferts de gènes et est source d'ADN sous la forme de eDNA (Madsen *et al.*, 2012). Un des principaux mécanismes de transferts horizontaux de gènes à l'intérieur du biofilm est la conjugaison plasmidique. Par exemple, les plasmides de gènes qui confèrent une résistance à plusieurs antibiotiques ont été transférés dans des biofilms de *P.putida* et *E. coli* (Van Meervenne *et al.*, 2014). Il a été montré que la conjugaison était 700 fois plus efficace dans un biofilm qu'en condition planctonique. Ainsi, une étude de *S. aureus* a montré que le transfert de plasmide était possible dans le biofilm mais pas en état planctonique (Savage, Chopra and O'Neill, 2013). La fréquence de transfert au sein de biofilms semble bien plus importante qu'en suspension pour des concentrations bactériennes comparables.

Toutefois cette fréquence de transfert au sein de biofilms est dépendante du milieu dans lequel il s'effectue, la température, la présence de nutriments, la densité des cellules bactériennes, le rapport bactéries donatrices / bactéries réceptrices, les souches bactériennes utilisées, ... Une alternative pour les transferts horizontaux de gène est le système de sécrétion de type IV comme cela a été démontré dans un biofilm de *Vibrio cholera* (Borgeaud *et al.*, 2015). Ce système de sécrétion requiert un contact inter-cellule.

L'activité bactérienne n'est pas homogène au sein même du biofilm. L'analyse de la diffusion de l'oxygène dans les biofilms a déterminé un gradient d'oxygène de la surface du biofilm aux couches inférieures. Les bactéries des couches basales adoptent alors une activité anaérobie (Costerton, Stewart and Greenberg, 1999; Evans, 2000; Donlan, 2002; Kokare *et al.*, 2009). Une communication intercellulaire existe dans le biofilm, assurée par la régulation et l'expression de gènes « Quorum sensing ». Ce terme recouvre les mécanismes de contrôle des signaux cellule-cellule, qui permettent aux bactéries de réguler leur densité et de s'adapter à tout changement et fluctuation des conditions environnantes (Costerton, Stewart and Greenberg, 1999; Donlan, 2002; Kokare *et al.*, 2009). Le Quorum sensing se trouve à son tour dépendant des conditions environnantes, et en particulier, de la concentration en nutriments dans le liquide (Purevdorj-Gage and Stoodley, 2004).

Quand le biofilm atteint le stade de maturation, le manque de nutriments, l'âge du biofilm, les stress physiques, chimiques, et biologiques, ainsi que les conditions hydrodynamiques sont les facteurs responsables du détachement des biofilms et de leur dispersion dans le milieu ambiant (Abrahamson *et al.*, 1996; Andersson and AlbaNova universitetscentrum., 2009). Ainsi l'âge du





biofilm, la quantité de biomasse fixée, et les conditions environnementales, jouent un rôle très important sur la structure et l'épaisseur du biofilm, et donc, sur son activité (Lazarova, 1995).



# Résultats

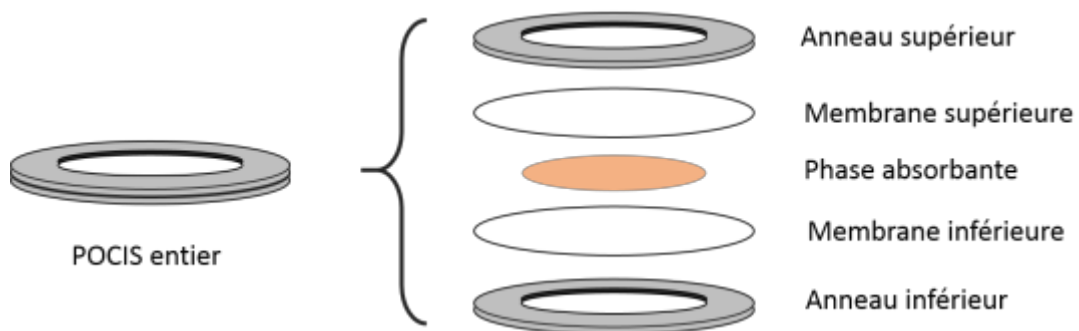


### **Avant propos d'article 1**

Les effluents hospitaliers sont l'ensemble des eaux usées des hôpitaux par lequel s'acheminent des microorganismes issus des patients (notamment de leurs excréta) et de leur environnement. Des études antérieures portant sur la contamination bactérienne des effluents hospitaliers ont montré la présence d'*Enterobacteriaceae* notamment dans la flore gastro-intestinale (Schwartz *et al.*, 2003). Les membres de cette famille sont connus pour souvent porter des gènes d'antibiorésistance comme ceux codant pour les bêtalactamases à spectre étendu (BLSE). Leurs rejets dans les eaux usées peuvent favoriser leur transmission à d'autres bactéries présentes dans les eaux usées et dans l'environnement (Tuméo *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2013). Dans le compartiment aquatique, la majorité des bactéries est fixée sur des supports organiques ou inorganiques et constitue des biofilms. Ces communautés bactériennes facilitent le transfert horizontal de gènes (Molin and Tolker-Nielsen, 2003), notamment les gènes de résistances aux antibiotiques, et peuvent accélérer l'émergence et la diffusion des souches résistantes aux antibiotiques (Macfarlane and Macfarlane, 2006). Par ailleurs, il a été démontré qu'à de faibles concentrations sub-inhibitrices, certains antibiotiques comme les fluoroquinolones créent une pression de sélection entraînant alors des transferts génétiques horizontaux entre bactéries, permettant l'acquisition de mécanismes de résistances aux antibiotiques (Bañuelos-Vazquez, Torres Tejerizo and Brom, 2017). De plus, les biofilms sont connus pour concentrer certains polluants chimiques comme les métaux lourds (Ricart *et al.*, 2009). Les effluents hospitaliers ne contiennent pas seulement des microorganismes mais aussi des molécules pharmaceutiques comme les antibiotiques en contact perpétuel avec le biofilm. Les antibiotiques sont largement utilisés chez l'homme et l'animal et une grande proportion de ces molécules est éliminée inchangée et active dans les eaux usées. Les fluoroquinolones et les carbapénèmes sont majoritairement utilisées à l'hôpital. Ces antibiotiques après administration vont donc rejoindre les effluents hospitaliers contribuant à leur dissémination dans l'environnement. Ainsi si plusieurs études ont rapporté la présence de fluoroquinolones dans les eaux usées urbaines et les eaux de surface en Suisse ( $72 \pm 14 \text{ ng L}^{-1}$  ciprofloxacine and  $57 \pm 12 \text{ ng L}^{-1}$  norfloxacine)(Golet *et al.*, 2003), et en Suède ( $17 \pm 12 \text{ ng/L}$  ciprofloxacine and  $20 \pm 017 \text{ ng/L}$  nofloxacine)(Lindberg *et al.*, 2007) relativement peu d'études ont, en parallèle du dosage, détecté des microorganismes. L'échantillonnage des effluents hospitaliers est complexe, il doit tenir compte de la fluctuation des concentrations en polluants et de la variation du débit des effluents hospitaliers au cours de la journée, de la semaine ou des



**Figure 23 :** Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS)



**Figure 24 :** Structure générale des POCIS. Les POCIS sont constitués de deux membranes entre lesquelles il y a une phase absorbante (adapté de Cecile Miegé)

saisons (Clotilde Boillot, 2008; Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013a). Ainsi, un échantillonnage passif ou intégratif est souhaitable pour ce compartiment aquatique. Il s'effectue par un dispositif recevant les eaux usées se basant sur les mécanismes de distribution des polluants dans les eaux.

Parmi les échantillonneurs passifs, le Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) (Figure 23) est principalement utilisé pour les échantillonnages d'eaux de surface afin d'évaluer leur contamination par des composés organiques. Il est composé d'une phase adsorbante retenue par deux membranes (Figures 24) capable de capter les composés polaires la traversant. Cet échantillonneur déjà utilisé pour détecter des herbicides, des hormones, des antibiotiques, des anti-inflammatoires, et des benzodiazepines (Togola, 2006; Ibrahim, Togola and Gonzalez, 2013) est considéré comme le meilleur échantillonneur passif pour les molécules hydrophiles (Miège *et al.*, 2012; Bailly, Levi and Karolak, 2013).

L'objectif de notre étude a donc été d'investiguer au cours d'une même période la présence des antibiotiques (fluoroquinolones) et de bactéries résistantes aux fluoroquinolones sous forme de biofilms dans les effluents hospitaliers. Les concentrations de fluoroquinolones ont été recueillies par des POCIS et les résultats des dosages ont été comparés aux concentrations prédites à partir des consommations hospitalières. Avec ces données, le risque écotoxicologique des fluoroquinolones a pu être estimé. En parallèle, l'isolement, l'identification et la caractérisation partielle des bactéries résistantes à la ciprofloxacine issus de biofilms formés dans les effluents hospitaliers pendant la même période ont été effectués.







Contents lists available at ScienceDirect

## Environmental Pollution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envpol](http://www.elsevier.com/locate/envpol)Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent<sup>☆</sup>

Jérôme Ory<sup>a, d, e, f</sup>, Geneviève Bricheux<sup>b, e</sup>, Anne Togola<sup>c</sup>, Jean Louis Bonnet<sup>a, d, e</sup>,  
 Florence Donnadiou-Bernard<sup>a, b, e</sup>, Laurence Nakusi<sup>a, d, e</sup>, Christiane Forestier<sup>a, d, e</sup>,  
 Ousmane Traore<sup>d, e, f, \*</sup>

<sup>a</sup> Université Clermont Auvergne, Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> Bureau de recherches géologiques et minières (BRGM), 3 avenue Claude Guillemin, F-45100, Orléans, France

<sup>d</sup> Université Clermont Auvergne, Université d'Auvergne, Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup> CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63170, Campus Universitaire des Cézeaux, France

<sup>f</sup> Service d'hygiène, CHU de Clermont-Ferrand, rue Montalembert, 63003, Clermont-Ferrand, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 February 2016

Received in revised form

6 April 2016

Accepted 9 April 2016

Available online 29 April 2016

## Keywords:

Antibioresistance

Biofilm

Effluent hospital

POCIS

fluoroquinolones

## ABSTRACT

Discharge of antimicrobial residues and resistant bacteria in hospital effluents is supposed to have strong impacts on the spread of antibiotic resistant bacteria in the environment. This study aimed to characterize the effluents of the Gabriel Montpied teaching hospital, Clermont-Ferrand, France, by simultaneously measuring the concentration of ciprofloxacin and of biological indicators resistant to this molecule in biofilms formed in the hospital effluent and by comparing these data to ciprofloxacin consumption and resistant bacterial isolates of the hospital. Determination of the measured environmental concentration of ciprofloxacin by spot sampling and polar organic chemical integrative (POCIS) sampling over 2 weeks, and comparison with predicted environmental concentrations produced a hazard quotient >1, indicating a potential ecotoxicological risk. A negative impact was also observed with whole hospital effluent samples using the *Tetrahymena pyriformis* biological model.

During the same period, biofilms were formed within the hospital effluent, and analysis of ciprofloxacin-resistant isolates indicated that *Gamma-Proteobacteria* were numerous, predominantly *Aeromonadaceae* (69.56%) and *Enterobacteriaceae* (22.61%). Among the 115 isolates collected, plasmid-mediated fluoroquinolone-resistant genes were detected, with mostly *aac(6)-Ib-cr* and *qnrS*. In addition, 60% of the isolates were resistant to up to six antibiotics, including molecules mostly used in the hospital (aminosides and third-generation cephalosporins).

In parallel, 1247 bacteria isolated from hospitalized patients and resistant to at least one of the fluoroquinolones were collected. Only 5 of the 14 species identified in the effluent biofilm were also found in

**Abbreviations:** BOD<sub>5</sub>, Biochemical Oxygen Demand five days; CFU, Colony Forming Unit; CIP, ciprofloxacin; COD, Chemical Oxygen Demand; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DOC, Dissolved Organic Carbon; ESBLs, Extended-Spectrum-Beta-Lactamases; FQs, Fluoroquinolones; HGT, Horizontal Gene Transfer; HQ, Hazard Quotient; IC, Inorganic Carbon; MEC, Measured Environmental Concentration; MIC, Minimum Inhibitory Concentration; NOEC, No Observed Effect Concentration; NT, Total Nitrogen; PEC, Predicted Environmental Concentration; PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis; PhACs, Pharmaceutically Active Compounds; PI, Propidium Iodide; PMQR, Plasmid Mediated Quinolone Resistance; PNEC, Predicted No Effect Concentration; POCIS, Polar Organic Chemical Integrative Samplers; SEM, Scanning Electron Microscopy; TSS, Total Suspended Solid; TOC, Total Organic Carbon; WWTP, Waste Water Treatment Plant.

<sup>☆</sup> This paper has been recommended for acceptance by Klaus Kummerer.

\* Corresponding author. Université Clermont Auvergne, Université d'Auvergne, Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France.

E-mail address: [otraore@chu-clermontferrand.fr](mailto:otraore@chu-clermontferrand.fr) (O. Traore).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.033>

0269-7491/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.



the clinical isolates, but PFGE typing of the Gram-negative isolates found in both compartments showed there was no clonality among the strains.

Altogether, these data confirm the role of hospital loads as sources of pollution for wastewater and question the role of environmental biofilms communities as efficient shelters for hospital-released resistance genes.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The presence of pharmaceutically active compounds (PhACs) in wastewater has become a major concern for human health and the environment. In the European Union (EU), around 3000 different PhACs are used in human medicine, and many studies have shown their presence in wastewater and surface, ground and drinking water (Kümmerer, 2009; Petrovic et al., 2009; Stackelberg et al., 2004). Hospitals are large consumers of PhACs and use a wide variety of chemical substances such as pharmaceuticals, radionuclides, disinfectants and detergents for health care, diagnostic procedures, disinfection and research (Emmanuel et al., 2005; Kümmerer, 2001; Lindberg et al., 2007). After administration, the active substances, whether metabolized or not by the organism, are excreted, mainly in urine and partially in feces. Consequently, hospital effluents can contain high concentrations of pharmaceutical product, which are generally discharged directly into the public sewer network.

Since the discovery of penicillin by Sir Alexander Fleming 100 years ago, thousands of tons of antibiotics a year are administered to humans and animals. Beta-lactams and fluoroquinolones (FQ) are the most frequently prescribed families of antibiotics (80% of the molecules), and amongst the FQs, ciprofloxacin (CIP) and ofloxacin are the fourth and fifth most prescribed antibiotics in French hospitals (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé, 2014; RAISIN, 2012). Unlike beta-lactam molecules, FQs are able to persist in the environment (Al-Ahmad et al., 1999; Halling-Sørensen et al., 2000; Kümmerer et al., 2000), and several monitoring studies have reported their presence in urban wastewater and surface waters in Switzerland (Alder et al., 2004; Golet et al., 2002), Sweden (Lindberg et al., 2007) and Vietnam (Duong et al., 2008). It is likely that hospital effluents contribute largely to the load of antibiotics in waste water treatment plants (WWTP), where evidence shows that they are incompletely removed (Santos et al., 2013; Verlicchi et al., 2015, 2014, 2012).

Hospital effluents contain not only pharmaceutical molecules but also microorganisms from medical care units (patients' excreta and surfaces cleaning). Hospitals are characterized by high bacterial density and diversity, and studies on the bacterial load of hospital wastewaters have reported the presence of several species, mostly from the *Enterobacteriaceae* family (Harris et al., 2014; Tuméo et al., 2008), *Enterococci*/*Streptococci*, *Staphylococci* and heterotrophic bacteria (Schwartz et al., 2003). The effluents discharged by hospitals and clinics have a lower microbial load than urban wastewater but potentially contain pathogens and/or multidrug-resistant bacteria (Emmanuel et al., 2005; Leprat, 1998; Stalder et al., 2014; Czekalski et al., 2014). In aquatic systems the major fraction of bacterial communities are found in structurally organized surface associated aggregates called biofilms, where bacterial cells are embedded in an extracellular matrix. Owing to the proximity between bacteria, biofilms are considered as ideal reaction chambers for horizontal gene transfer, notably of antibiotic resistance genes (Cattoir et al., 2008; Costerton et al., 1987; Stalder et al., 2014), which results in accelerated evolution and spread of antibiotic

resistance (Hausner and Wuertz, 1999; Hennequin et al., 2012). It has also been shown that weak concentrations of antibiotics (sub-MICs) could favor the transfer of resistance in biofilms (Lindberg et al., 2005; Savage et al., 2013). The biofilm matrix itself acts as a barrier against surrounding environmental stress such as antimicrobial agents (Costerton et al., 1987). Paired with the presence of pharmaceutical products, hospital effluent biofilms represent efficient exchange places between bacteria, whatever their origin, clinical or environmental.

In this study, we investigated the presence of ciprofloxacin in hospital effluent over 2 weeks and measured its ecotoxicological potential. In parallel, biofilms were formed *in situ* during this period and we looked for ciprofloxacin-resistant bacteria within these communities. All these data were compared with the quantity of ciprofloxacin consumed by the hospital's patients and to the ciprofloxacin-resistant bacteria isolated from hospitalized patients during the same period.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Hospital effluent sampling and characterization

The samples were realized within the effluent of the Gabriel Montpied hospital, Clermont-Ferrand (139,500 inhabitants) France (latitude 45.7589632; longitude 3.0941279). It is a medium-size hospital with 1,100 beds that operates 24 h a day with a peak of activity from 7a.m to 1p.m. Water consumption is 13,500–16,000 m<sup>3</sup> monthly, between 409 and 478 L/bed/day. The hospital effluent is directly discharged into the urban sewage network without any external connection and then into the municipal WWTP, "Les Trois Rivières", which receives and treats about 1,700,000 m<sup>3</sup> a month.

The experimental sampling tank (110 cm–50 cm–50 cm) was located on a line receiving exclusively wastewater from the hospital, upstream of the connection with the pipe recovering rainwater and public network wastewater. The water samples were pointwise collected three times a day, at 9am, 2pm and 4pm, from Monday to Friday for two weeks (04/9-23/2014), gathered in pre-rinsed polypropylene bottles (total volume, 2 L), and immediately transported to the laboratory under cooled conditions (4 °C). Over the same period, the pH, conductivity, temperature and oxygen level of the effluents were measured three times a day *in situ*. Temperature, pH and conductivity were detected with an Orion Star™ apparatus previously calibrated with standard solutions for pH (4.01 and 7.00 at 25 °C) and KCl (0.01 mol/L i.e. 1413 uS/cm and 12.9 mS/cm at 25 °C) for conductivity. The dissolved oxygen level was measured with an oximeter (Sonde oxygène Pro Oda, Ysi). Total suspended solid (TSS) was measured by evaporation of 30 mL of sample at 65 °C for 48h. Photometric test kits (Spectroquant COD cell Test<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Germany) were used to determine chemical oxygen demand (COD) according to the standard ISO 15705 established by the Deutsches Institut for Normung. The BOD OxiTop method was used to measure the level of organic oxygen for five days (BOD<sub>5</sub> Biochemical Oxygen Demand five days). Samples were filtered (150 µm) and frozen (–20 °C) for further ion and



carbon analyses and toxicological assays. Water analyses (total organic carbon [TOC], dissolved organic carbon [DOC], total nitrogen [NT], inorganic carbon [IC]) were performed in triplicate with a TOC-VCPN Shimadzu. Ion concentrations were measured by ion chromatography (Dionex [DX] 320) with a column AS11 and ICS 1500 with a column CS12 (Thermo Scientific, USA), respectively, for anions and cations. Ion concentrations were determined by calibration curves with a limit of quantification of 0.1 mg.

## 2.2. Characterization of the environmental risk of fluoroquinolones

### 2.2.1. Determination of the measured environmental concentration (MEC)

Measured environmental concentrations (MECs) of ciprofloxacin in the effluent were determined with spot samples ( $T_0 = 04/09/2014$ ,  $T_1 = 04/16/2014$  and  $T_2 = 04/23/2014$ , three samples a day) and six polar organic chemical integrative samplers (POCIS) containing 200 mg Oasis HLB<sup>®</sup> (Exposmeter, Taveksjö, Sweden). The POCIS were fixed in the effluent tank for 15 days. To avoid potential saturation of the membrane, three POCIS were collected after 7 days of exposure and replaced by three new ones.

After recovery, all the POCIS were cleaned with water to reduce the deposit of particles and kept at 4 °C in the dark before analysis. Ciprofloxacin was extracted after the solid phase of the POCIS was recovered in a column, and then eluted with 10 mL of acetonitrile. The eluted solution was then concentrated by evaporation.

Quantitative analysis of ciprofloxacin was performed by mass spectrometry coupled with high performance liquid chromatography. Water samples were filtered (0.45 µm) and directly injected after the addition of standard solutions.

For the POCIS data, the amounts of ciprofloxacin in the effluent were determined by the sampling rate obtained for ofloxacin: 0.1 L/Day by (Bailly et al., 2013).

### 2.2.2. Determination of the predicted environmental concentration (PEC)

The consumption of ciprofloxacin by patients in Gabriel Montpied hospital during the study period was assessed with PHARMA software (Computer Engineering). The amount of ciprofloxacin potentially released in the hospital effluent was calculated by pharmacokinetics parameters [[www.theriaque.org](http://www.theriaque.org), [www.drugs.com](http://www.drugs.com), [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)] (Table S1) and the following formula without taking into account the sedimentary compartment, which is absent in the hospital effluent:

$$Q = q(f + u)$$

with Q = quantity of unchanged drug eliminated by organisms, q = quantity consumed, f = % fecal excretion unchanged, u = % urinary excretion unchanged.

Predicted environmental values (PEC) were calculated by the following formula:

$$PEC_{hospital} = \frac{Q}{O \times T}$$

with O = average outflow and T = period of time.

### 2.2.3. Ecotoxicological risk assessment: hazard quotient (HQ)

The environmental risk assessment of ciprofloxacin was defined according to its hazard quotient (HQ) with three different trophic levels representative of the aquatic ecosystem (algae, daphnia and fish). EU guidelines (European Commission, 2003) state that HQ is the quotient between MEC or PEC and the predicted no effect concentration (PNEC). The PNEC value used in this study (1 µg/L)

was previously established taking into account the no observed effect concentration (NOEC *Lemna minor* = 10 µg/L (Ebert et al., 2011)) and a safety factor (F = 10) defined by the European Directives (Technical Guidance Document on Risk Assessment, European Parliament).

### 2.2.4. Ecotoxicological risk assessment: ecotoxicological measurement with *Tetrahymena pyriformis*

The ecotoxicological risk of the hospital effluent was assessed with the biological model, *Tetrahymena pyriformis* (Bonnet et al., 2007). The ciliated cell amiconucleated *T. pyriformis* strain GL was grown axenically without shaking at 28 °C in a proteose-peptone yeast salt (PPYS) complex medium (pH = 6.8) containing 0.75% proteose-peptone (Difco, Detroit, MI, USA), 0.75% yeast extracts (Difco, Detroit, MI, USA), and inorganic salts (Plesner et al., 1964). The cells were maintained in exponential growth phase by reseeded in PPYS liquid medium. The toxicity of the tested samples was determined by measuring *T. pyriformis* population growth impairment (kinetic growth method). Several concentrations of the tested effluent samples (dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) and of ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L) were used. Two controls (*T. pyriformis* in culture with and without 0.5% DMSO) were assessed as previously described (Bonnet et al., 2007). Briefly, *T. pyriformis* growth was monitored by measuring the OD<sub>535</sub> every hour for 9 h. For a given experiment, four parallel replicates were established for each sample. The reduction of cell growth in relation to an untreated control was regarded as a measure of toxicity. The relative toxicity of the tested samples was quantified by determining inhibitory concentration (IC<sub>20</sub>), which is the concentration required to induce a 20% decrease in cell growth (corresponding to 20% increase in the relative generation time). At least three independent experiments were carried out to determine an average IC<sub>20</sub> value.

### 2.3. In situ biofilm formation, microbial content analysis and characterization of ciprofloxacin-resistant isolates

Biofilms were formed on glass slides stuck on a rectangular granite slab placed at the bottom of the hospital effluent wastewater tank. The slides were disposed in the direction of the flow and were constantly submerged without any drying period during 15 days to allow the development of substantial biofilm biomass. Each glass slide was collected in Falcon tubes filled with 50 mL of saline to rinse the biofilm and remove planktonic cells. Glass slides were then scratched with a razor blade and sonicated for 5 min in a total volume of 50 mL saline to disrupt the biofilm.

For fluorescence microscopic observation, biofilm formed on the slides was fixed with paraformaldehyde (4%) in 1X PBS for one hour, washed with 1X PBS and then stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) before mounting in PBS-Glycerol medium. Observations were performed with a Leica DMR fluorescence microscope.

For scanning electron microscopy observation, the biofilm formed on the slides was fixed with glutaraldehyde 1.6% in sodium cacodylate buffer 0.2 M-pH 7.4 overnight at 4 °C and then rinsed with the same buffer (3\*10 min at 25 °C). After post fixation with 1% Osmium tetroxide (1 h at 25 °C) the biofilm was rinsed with distilled water (20 min) and dehydrated with alcohol. Finally, gold/palladium plating was done for 60 s.

Total biofilm cells were counted by flow cytometry with the suspensions obtained after biofilm disassembly. SYBR<sup>®</sup>Green was used to stain 500 µL of the suspension. The cells were pre-heated at 37 °C for 3–4 min and SYBR<sup>®</sup>Green (10,000X) was then added to 1X final concentration and the cells incubated again for 10 min at 37 °C. To evaluate cell viability, the samples were counter-stained



with Propidium Iodide (PI) 1 mg/mL diluted 1/500 for 10 min at room temperature. The analyses were performed with a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Ciprofloxacin-resistant bacteria were isolated by spreading serial dilutions (from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ) of the biofilm suspension onto R2A-agar medium with and without ciprofloxacin at 1  $\mu\text{g/mL}$  and incubated at 30 °C for 24 h/48 h in aerobic conditions. The resulting colonies were further isolated and identified by Gram staining and mass spectrometer analysis (MALDI-TOF technology bioMérieux) or 16S DNA sequencing.

The percentage of cultivable bacteria was determined by comparing the total amount of CFU obtained on non-selective agar with the flow cytometry counts. The percentage of ciprofloxacin-resistant isolates among the cultivable bacteria was determined by comparing the number of CFU/mL obtained after growth with and without antibiotics in the medium.

The isolate's antibiotic resistance pattern was determined by the Vitek2 method with the Gram-negative card (AST-N233[ref 413 117] standard 2 Gram negative, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) containing the following antibiotics: nalixidic acid, amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cefalotin, ceftazidim, cefotaxim, ceftazidim, ciprofloxacin, ertapenem, imipenem, gentamicin, nitrofurantoin, ofloxacin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, tobramycin, and trimethoprim/sulfamethoxazole; and the Gram-positive card (AST N234 standard 2 Gram positive, bioMérieux) containing the following antibiotics: benzylpenicillin, ceftazidim screen, clindamycin, erythromycin, fosfomycin, fusidic acid, gentamicin, kanamycin, lincomycin, linezolid, nitrofurantoin, ofloxacin, oxacillin, pristnamycin, rifampicin, teicoplanin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazol, tobramycin, vancomycin. For some isolates, the antibiotic resistance pattern was determined by agar diffusion susceptibility testing.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of Ciprofloxacin were determined by the dilution method in Mueller-Hinton medium as recommended by the guidelines of the Société Française de Microbiologie (Société Française de Microbiologie, 2014).

All ciprofloxacin-resistant isolates were screened by multiplex PCR for the presence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants, with primers specific for *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *aac(6')-Ib* genes according to Su et al. (Su et al., 2014). The *aac(6')-Ib-cr* amplicons were distinguished by digestion with *BstF5I* (New England Biolabs, Ipswich, MA). PCRs were carried out in 10  $\mu\text{L}$  volume containing 1  $\mu\text{L}$  of template DNA (10 ng) with the KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (KAPA Biosystems, CliniSciences, Nanterre, France). The temperature profile for amplification was as follows: 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 15 s, annealing temperature of 60 °C for 30 s, 72 °C for 20 s, and a final extension step at 72 °C for 3 min. The PCR products were subjected to gel electrophoresis on 2% (w/v) agarose gel.

#### 2.4. Recovery of the hospital data regarding the FQ-resistant clinical isolates

Data regarding FQ resistant bacteria isolated from hospitalized patients (species identification and antibiotic resistance pattern) between 03/01/2014 and 04/30/2014 were collected from hospital software (Inlog, Braintree, England).

Clinical bacterial isolates showing common phenotypic characteristics with effluent isolates were further compared by genomic pulse field gel electrophoresis (PFGE). All PFGE reagents used were from Bio-Rad (CHEF Genomic DNA Plug Kits). The chromosomal DNA present in each plug was digested overnight at 37 °C with restriction enzymes, *XbaI* for *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii* and *SpeI* for *Enterobacter cloacae*. Treated plugs were loaded into 1% electrophoretic agarose

gel and run with the CHEF-DR II system (Bio-Rad), with a specific program for each bacterium (voltage, pulse time, and electrophoretic time), 2.2–54.2 s, 22 h, 6 V/cm for *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* and *C. freundii*; and 5.3–49.9 s, 20 h, 6 V/cm for *E. cloacae*. Following electrophoresis, the gels were stained with Gel Star<sup>®</sup> (Lonza, Rockland, ME USA). Dendrograms were determined with FPQuest<sup>®</sup> software (BioRad, Marne la Coquette, France).

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of the hospital effluent

The physicochemical and biological parameters of the effluent measured once a day during the 15-day period of sampling (04/09–23/2014) are presented in Table 1. The height of the hospital effluent at the sampling site fluctuated from 7 to 15 cm and the outflows from 1.59 L/s to 9.28 L/s, at an average of 4.23 L/s.

Ciprofloxacin concentration (MEC) was detected in the hospital effluent by two technics, POCIS and spot sampling, at concentrations ranging from  $0.97 \pm 1.25$  to  $3.39 \pm 0.04$   $\mu\text{g/L}$  and below the quantification limit ( $<5$   $\mu\text{g/L}$ ) to 17  $\mu\text{g/L}$ , respectively (Fig. 1). The PEC was determined taking into account the total prescription of ciprofloxacin at Gabriel Montpied hospital from 04/09/2014 to 04/23/2014. The resulting  $\text{HQ}_{\text{POCIS}}$  was equal to  $2.08 \pm 0.88$  and the  $\text{HQ}_{\text{predictive}}$  equal to  $5.84 \pm 1.35$  (Table 2). Both HQ values were greater than 1, which indicated a potential ecotoxicological risk.

To further estimate the ecotoxicological impact of the hospital effluent, the *T. pyriformis* model was used and showed a decrease in the growth capacity of the ciliate with  $\text{IC}_{20}$  values of  $0.36 \pm 0.04$ ,  $0.34 \pm 0.02$  and  $0.29 \pm 0.04$  at  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ , respectively (see Figs. S1 and S2). When using pure ciprofloxacin molecule (up to 500 mg/L), no effect was observed on the *T. pyriformis* growth, indicating no ecotoxicological risk of the antibiotic molecule itself.

#### 3.2. Biofilm analysis and characterization of ciprofloxacin-resistant isolates

As illustrated in Fig. 2a, fluorescent microscopic observations of the biofilms stained with DAPI showed relatively uniform aggregates all over the surfaces with microorganisms embedded in a thick matrix. Several bacterial morphologies were observed with vibrio and cocci shapes, but rods were predominant; Fig. 2b is an example of the observations performed by SEM (Fig. 2b).

Cytometry analysis of the biofilm population after PI and SYBR<sup>®</sup>green staining identified a total of  $1.10 \times 10^8$  organisms. Two main populations were characterized, with living ( $5.40 \times 10^7$ –49.09%) and damaged ( $4.50 \times 10^7$ –40.91%) cells (data not shown). Culture of biofilm suspension on non-selective medium led to the isolation of  $2.85 \times 10^5$  CFU/mL corresponding to 0.259% of the total cells detected by flow cytometry. The addition of ciprofloxacin to the medium resulted in the selection of about  $9.6 \times 10^4$  CFU/mL, i.e. 0.085% of the total bacterial cells and 33.7% of the cultivated bacteria. We selected 115 isolates on the basis of colony characteristics (size, color, aspect). Their identification indicated that they belong to 14 different bacterial species, mostly within *Gamma-Proteobacteria* (Table 3). Members of the *Aeromonadaceae* family were the most prevalent (69.56%), mostly of the *Aeromonas spp* genus. *Enterobacteriaceae* was the second most prevalent family (22.61%), with *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* and *Citrobacter spp*.

Antibiotic susceptibility testing performed with all Gram-negative bacilli indicated that most showed multi-resistant phenotypes, as shown in Fig. 3. Resistance to ampicillin was observed in 62.83% of the isolates, of which 60% had resistance to up to six antibiotics. Ertapenem- and imipenem-resistant strains were detected at rates of 16.81% and 5.31%, respectively.

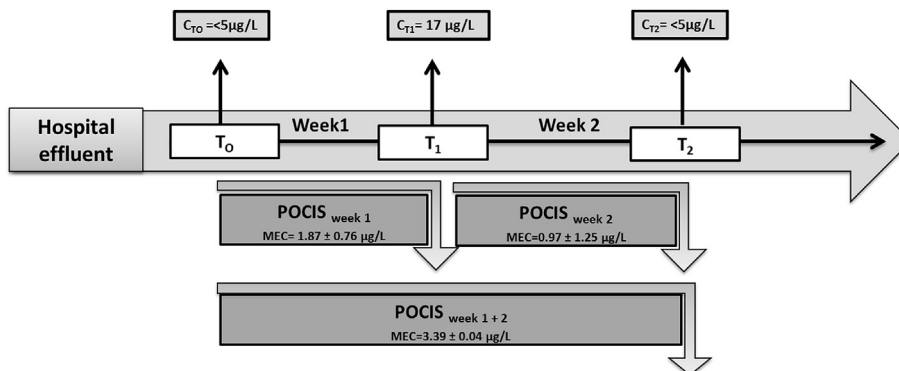




**Table 1**  
Chemical and physical parameters of the hospital effluent.

		Analysis	M ± SD	
Laboratory measurements	mg/L	TOC	216.8 ± 47.5	
		DOC	193.6 ± 42.4	
		TC	229.7 ± 40.9	
		IC	36.1 ± 6.2	
		TN	77.8 ± 11.3	
		Ions in mg/L	Cl <sup>-</sup>	149.7 ± 64.5
			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	18.1 ± 3.6
			SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	42.5 ± 3.0
			PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	81.5 ± 41.6
			Na <sup>+</sup>	92.1 ± 28.1
			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	30.7 ± 3.5
		Others in mg/L	K <sup>+</sup>	42.8 ± 5.2
			TSS	900.0 ± 239.1
COD	1818.9 ± 580.7			
Site measurements	pH	BOD <sub>5</sub>	217.5 ± 41.9	
		T	8.0 ± 0.2	
		Cond (µSm/Cm)	26.2 ± 0.7	
		Oxy (mgO <sub>2</sub> /L)	873.2 ± 66.2	
			6.3 ± 0.7	

TOC, Total Organic Carbon; DOC, Dissolved Organic Carbon; TC, Total Carbon; IC, Inorganic Carbon; TN, Total Nitrogen; Cl<sup>-</sup>, chlorite; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrite; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, sulfite; PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, phosphate; Na<sup>+</sup>, sodium; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ammonium; K<sup>+</sup>, potassium; TSS, Total Suspended Solid; COD, Chemical Oxygen Demand; BOD<sub>5</sub>, Biological Oxygen Demand for 5 days; pH; T, temperature; Cond, conductivity; oxy, oximetry; SD, Standard Deviation and M, median of the 15 samples.



**Fig. 1.** Flow chart illustrating ciprofloxacin measurements in the hospital effluent over two weeks by POCIS and spot sampling (T<sub>0</sub>: 04/09/2014, T<sub>1</sub>: 04/16/2014 and T<sub>2</sub>: 04/23/2014).

**Table 2**  
Predicted Environmental Concentration (PEC), Predicted No-Effect Concentration (PNEC). Measured Environmental Concentration (MEC) by POCIS and determination of the Hazard quotient (HQ) for ciprofloxacin (CIP).

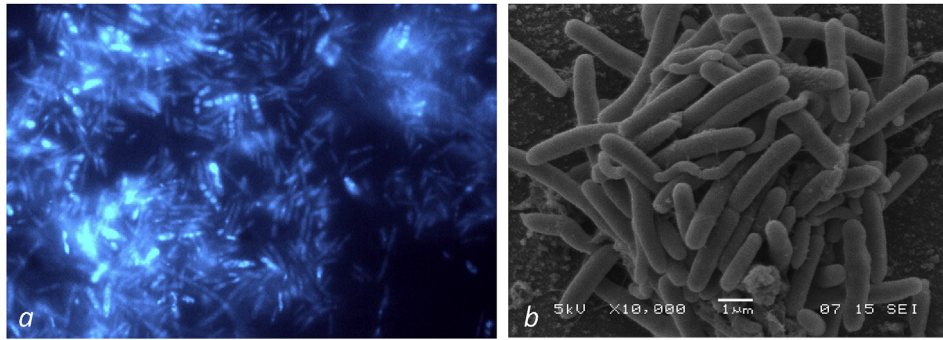
		Values	Standard deviation	
Quantity (µg)	q = Quantity consumed	4.60 × 10 <sup>7</sup>		
	Q = Quantity of unchanged drug eliminated by organism	3.22 × 10 <sup>7</sup>	9.76 × 10 <sup>6</sup>	
Concentration (µg/L)	PEC <sub>hospital</sub>	5.84	1.78	
	MEC <sub>POCIS</sub>	2.08	0.88	
	MEC <sub>punctual</sub>	T <sub>0</sub> < 5		
		T <sub>1</sub> 17		
		T <sub>2</sub> < 5		
		PNEC	1.00	
		PEC/MEC <sub>POCIS</sub>	2.14	1.53
	HQ <sub>POCIS</sub> = MEC <sub>POCIS</sub> /PNEC	2.08	0.88	
	HQ <sub>PEC</sub> = PEC/PNEC	5.84	1.78	

Regarding the FQ resistance of the isolates, the MIC of most bacteria was greater than 2 µg/mL with a value of ≥10 µg/mL for 23.48% (Fig. 4).

Detection of the PMQR genes by multiplex PCR showed that among the 115 isolates, *aac(6′)-Ib* was present in 95.60% and that 68.70% carried the *cr* variant, which is responsible for low-level ciprofloxacin resistance. *qnrB* and *qnrS* were less frequent (32.17% and 40.9%, respectively) and *qnrA* was not detected (Fig. 5). In 26.3%

and 31.6% of isolates, the *aac(6′)-Ib-cr* sequence was associated with *qnrB* or *qnrS*, respectively, and 7% of isolates harbored the three sequences. There was no relationship between the presence of multiple PMQR and the level of MIC in the isolates.

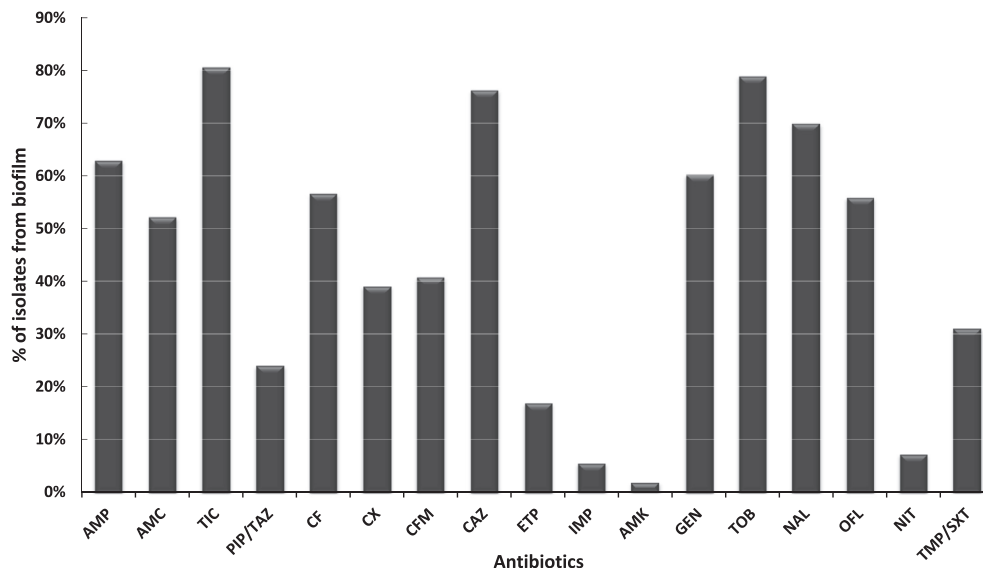




**Fig. 2.** Microscopic observations of the hospital effluent biofilm by a) fluorescent microscopy and b) scanning electron microscopy. Rods were predominant among the thick biofilm observed on the substrate.

**Table 3**  
Genus and species identification of the ciprofloxacin resistant isolates from hospital effluent biofilm and hospitalized patients. Identification indicated that *Aeromonadaceae* and *Enterobacteriaceae* were prevalent. *Aeromonas spp* was the most common genus (85/115; 69.30%), followed by *Klebsiella spp* (22/115; 19.30%).

Phyla	Genus	Species	Isolates	
			From hospital effluent biofilms	Clinical
			Total	Total
Beta-proteobacteria	<i>Acidovorax spp</i>	<i>A. temperans</i>	3	0
	<i>Comamonas spp</i>	<i>C. denitrificans</i>	1	0
Gamma-proteobacteria	<i>Aeromonas spp</i>	<i>A. hydrophila / caviae</i>	63	0
		<i>A. media</i>	5	0
		<i>A. veronii/sobria</i>	10	0
		<i>A. allosaccharophila/veronii</i>	2	0
	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>P. alcaligenes</i>	1	0
		<i>P. oleovorans</i>	1	0
		<i>P. toyotomiensis/alcaliphila/mendocina/oleovorans</i>	2	0
	<i>Citrobacter spp</i>	<i>C. freundii</i>	2	8
	<i>Enterobacter spp</i>	<i>E. cloacae complex</i>	2	27
	<i>Klebsiella spp</i>	<i>K. pneumoniae</i>	1	22
<i>K. oxytoca</i>		21	3	
<i>Staphylococcus spp</i>		<i>S. epidermidis</i>	1	129
Firmicutes			115	189
Total				



**Fig. 3.** Antibiotic resistant profiles of Gram-negative bacilli isolates from biofilm suspension selected on ciprofloxacin medium (resistance up to 1 µg/mL). AMP, ampicillin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; TIC, ticarcillin; PIP/TAZ, piperacillin/tazobactam; CF, cefalotin; CX, cefoxitin; CFM, cefotaxim; CAZ, ceftazidim; ERT, ertapenem; IMP, imipenem, AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TBM, tobramycin; NAL, nalidixic acid; OFL, ofloxacin; NIT, nitrofurantoin; TMP/SXT, trimethoprim/sulfamethoxazol.



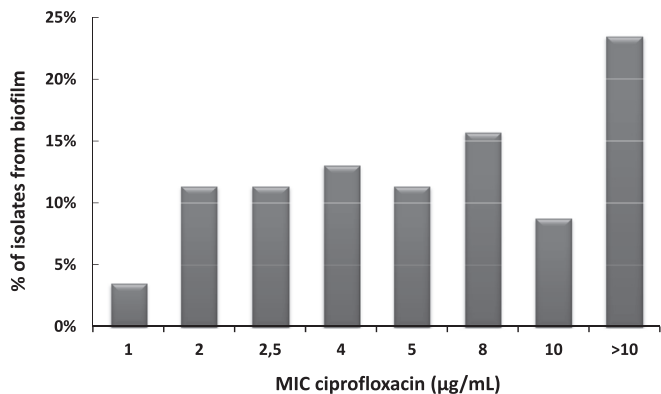


Fig. 4. Distribution of the ciprofloxacin MICs among the effluent biofilm isolates initially selected with 1 µg/mL of ciprofloxacin.

indicating there was no clonality among the strains whatever their origin (Fig. 6).

#### 4. Discussion

This study was conducted to assess the quality of a hospital effluent with regard to its pharmaceutical (antibiotics) and microbiological biofilm content. As environmental conditions can influence the bioavailability and toxicity of molecules, the chemical and physical parameters were determined during the study. Whatever the parameter, the variations were low, which indicates a relative constancy of the effluent during the sampling period. In addition, the measured concentrations were equivalent to those commonly found in hospital effluents (Boillot et al., 2008; Verlicchi et al., 2015) except for two elements, PO<sub>4</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, which were unusually high. The local use of protective treatment for water pipes containing

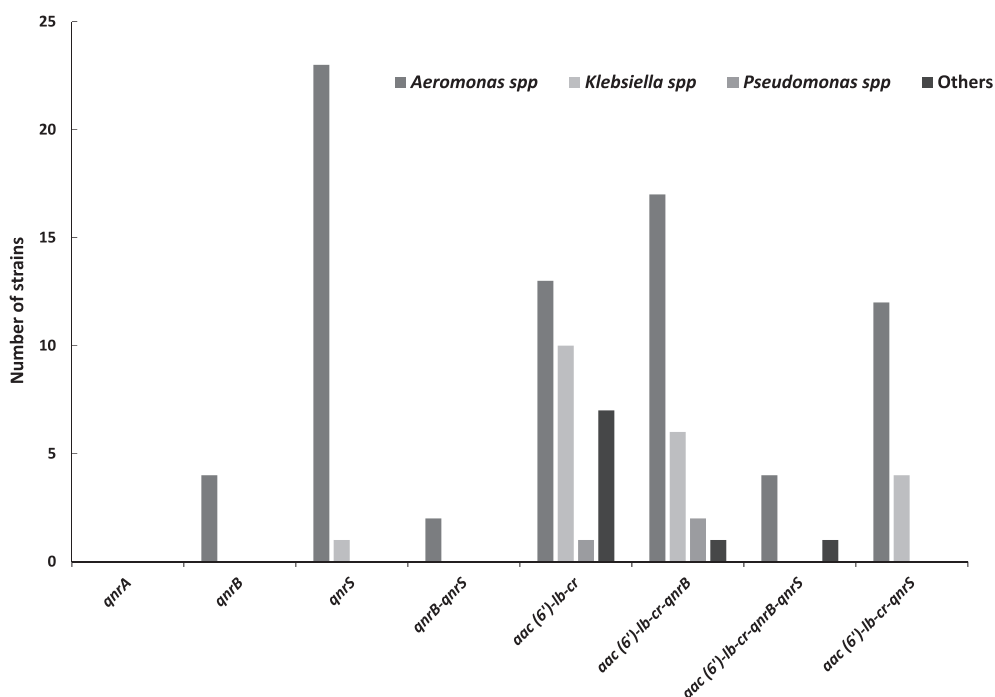


Fig. 5. Frequency of the plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) genes (*qnrA*, *qnrS*, *qnrB* and *aac(6')-Ib-cr*) determined by multiplex PCRs among the bacterial genus of the effluent isolates. Data represents number of strains harboring single genes or combinations (*qnrB/qnrS*; *aac(6')-Ib-cr/qnrB*; *aac(6')-Ib-cr/qnrB/qnrS*; *aac(6')-Ib-cr/qnrS*).

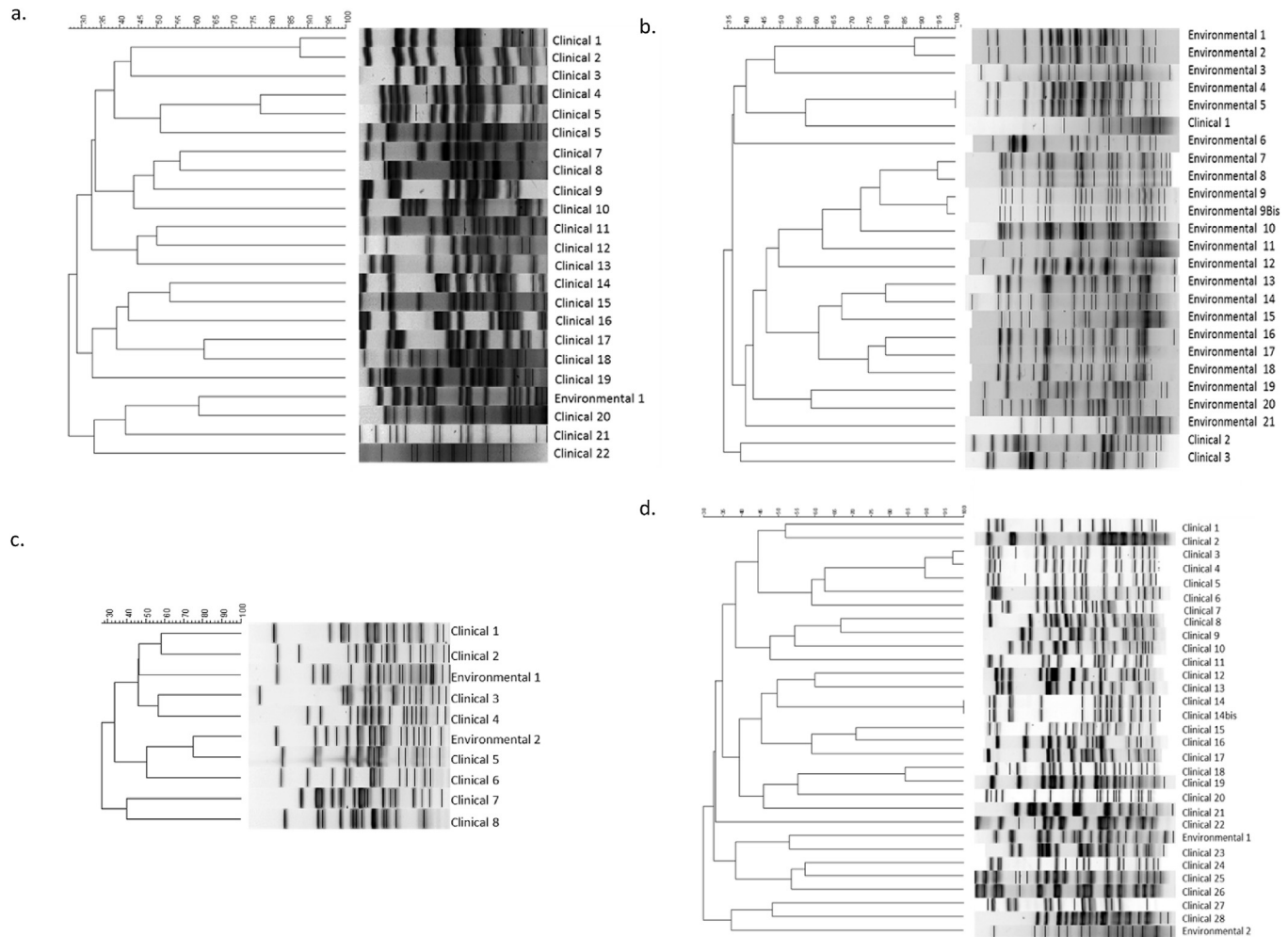
#### 3.3. Comparison of ciprofloxacin resistant isolates from the effluent biofilm and hospitalized patients

In parallel with effluent characterization, 1247 bacteria isolated from hospitalized patients (pathogens and multiresistant strains from rectal swabs) and resistant to at least one of the FQ molecules (ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin) were gathered. Only 5 of the 14 species identified in the effluent biofilm were also found in the clinical isolates: *Citrobacter freundii* (8; 3 from feces, 2 from expectoration, 2 from rectal swabs, and 1 from urines), *Klebsiella oxytoca* (3; 2 from urines and 1 from rectal swabs), *Klebsiella pneumoniae* (22; 9 from urines, 5 from rectal swabs, 3 from feces and 5 from other samples), *Enterobacter cloacae complex* (27; 8 from urines, 5 from skin samples, 3 from feces, 2 from biopsy and 9 other samples) and *Staphylococcus epidermidis* (129, mostly from blood cultures) (Table 3). PFGE typing of the Gram-negative isolates found in both compartments showed a similarity index lower than 80%,

phosphate molecules could partially explain this peculiarity.

Beta-lactams were the most prescribed antibiotic molecules in the Clermont-Ferrand hospital (64.30% of the total antibiotics prescribed per year, mean of the past 3 years, data not shown) but because of their instability, our study focused on the detection of another antibiotic, ciprofloxacin, a fluoroquinolone antibiotic molecule commonly used in hospitals because of its broad-spectrum antimicrobial activity. Tetracyclines could have been another appropriate target, but these molecules only represented 0.84% of the total antibiotics prescribed per year versus 9.65% for the fluoroquinolones. In addition, owing to its consumption, discharge, stability and persistence in the environment, fluoroquinolone has been often detected in different aquatic compartments (Adachi et al., 2013; Al-Ahmad et al., 1999; Johnson et al., 2015; Van Doorslaer et al., 2014) and is one of the most highly recovered antibiotic molecule in hospital effluents. In addition, a correlation was observed by some authors between the





**Fig. 6.** Examples of PFGE typing of the isolates belonging to Gram-negative species present in both the clinical and the biofilm samples: *Klebsiella pneumoniae* (a), *Klebsiella oxytoca* (b), *Citrobacter freundii* (c), *Enterobacter cloacae* (d). Homology scores were lower than 80%, indicating no clonality among the isolates of the two compartments.

ciprofloxacin concentrations in effluents and the composition and resistance profiles of their microbial communities (Daouk et al., 2016; Helwig et al., 2015; Rodríguez-Mozaz et al., 2014; Varela et al., 2015). Sampling hospital effluent water is complex and should take into account both the fluctuation of the molecules and the outflow of the hospital effluent, as evidenced in (Boillot et al., 2008). In our study, outflow was higher in the morning during weekdays (data not shown) because of hospital activity. The ciprofloxacin concentrations measured in the hospital effluent by spot sampling showed large variations between the samples, from  $<5 \mu\text{g/L}$  (not detectable) ( $T_0$  and  $T_2$ ) to  $17 \mu\text{g/L}$  ( $T_1$ ). Such variations have been previously observed in measurements of the amount of pharmaceutical compounds in effluent (Pereira et al., 2015). It should be noted that the level of ciprofloxacin in the incoming hospital water was under the threshold level (data not shown).

All these findings support the use of integrative sampling devices to erase these fluctuations by accumulating the molecules present in the water compartment, even when they are present at concentrations under the detection levels of the spot sampling method. The use of this device does not require any source of energy, but is influenced by certain parameters such as temperature, pressure and the gradient of molecule concentration (Bailly et al., 2013; Vrana et al., 2006; Zenobio et al., 2014). Depending on the targeted molecule concentrations, saturation of the collecting

membranes can occur, and thus the number of devices used and their length of stay have to be predicted. Among the passive sampling devices, the POCIS have been mainly used in surface water sampling to evaluate the contamination due to polar organic compounds. These devices are composed of polar molecular adsorptive phase retained by two membranes; they are considered as the best sampling devices and have been previously used to detect herbicides, hormones, antibiotics, anti-inflammatories, and benzodiazepines (Bailly et al., 2013; Ibrahim et al., 2013; Miège et al., 2012; Morin et al., 2013). In our study, the ciprofloxacin concentration determined by the POCIS was  $2.08 \pm 0.88 \mu\text{g/L}$  (MEC), a concentration under the detection limit of the spot sampling method, demonstrating the relevance of the POCIS. The sampling rate used for time-weighted average concentration is not accurate enough, owing to the high variability in the physicochemical parameters and water velocity, but allows an estimation of chemical exposure.

The concentrations of ciprofloxacin in hospital effluents are highly variable and depend on the number of patients, each hospital's specialist activity, its location (tropical zone, temperate ...) and the prescription practices of local physicians ( $1.6\text{--}24.8 \mu\text{g/L}$  with a median  $21 \mu\text{g/L}$ ) (Duong et al., 2008; Van Doorslaer et al., 2014; Verlicchi et al., 2012). The amount of ciprofloxacin detected in our study was among the lowest compared to other studies. This





could have been due to the parsimonious use of this molecule in Gabriel Montpied Hospital, where ciprofloxacin alone represents only 1.7% of the total antibiotic molecules prescribed (personal communication). Knowledge of ciprofloxacin consumption by in-patients during our study period allowed us to determine the PEC and to calculate a PEC/MEC ratio of 2.14. The difference in the PEC and MEC values could have been due to the combined effects of differences between partial retention of the molecule in the feces and delivery versus real consumption of the molecules by the patients. Although this information is usually difficult to gather it is more accurate in a hospital environment than elsewhere, and since the obtained ratio is acceptable, PEC values could be used to assess the ecological risks of this molecule.

Pharmaceutical substances are usually assessed with respect to environmental risk based on the hazard quotient (HQ), which is the ratio between the MEC and the highest concentration of the substance that does not have a harmful effect on the environment (PNEC). In our study, the effluent hospital HQ was moderate (=2.08), thus indicating potential toxicity for the environment. High risks due to ciprofloxacin release were previously detected in hospital effluents (HQ > 1) (Daouk et al., 2016; Helwig et al., 2015); and were even higher in activated sludge in reactor (Halling-Sørensen et al., 2000). Ciprofloxacin can induce serious hazards for many tested species including bacteria, algae, invertebrates, and fish (Mutiyaar and Mittal, 2014). In addition to the determination of HQ, we determined the environmental risk of the hospital effluent using the *T. pyriformis* model. This water living eukaryotic organism with a short generation time (3 h) has been used to evaluate the toxicity of pollutants such as herbicides (Bonnet et al., 2007; Bricheux et al., 2013). In our study, we observed a 20% growth inhibition ( $CI_{20}$  of  $0.33 \pm 0.03$ ) of *T. pyriformis* in the presence of hospital effluent. In contrast, the ciprofloxacin molecule alone had no effect (up to 500 µg/L). However, hospital wastewaters contain a variety of toxic and persistent substances that create hazardous mixtures (Boillot et al., 2008; Gautam et al., 2007) and ciprofloxacin could contribute to a synergic toxic effect. Since the hospital effluent joins up with the public discharge, a dilution factor is therefore applied (<1%), giving rise to a lower HQ value in the final WWTP.

The presence of ciprofloxacin in the hospital effluent raised the question of potential selective pressure exerted on local microorganisms. Since microorganisms are often organized in biofilms, mainly to protect them from environmental conditions, we decided to study biofilms formed in the flow of the hospital effluent rather than planktonic bacteria. Analysis of the effluent biofilm cell population was performed by flow cytometry after disruption of the biofilms and staining with both SYBR<sup>®</sup>Green and Propidium Iodide. The two molecules target the nuclei but propidium iodide does not permeate viable cell membranes, only injured cell membranes. Used in combination with SYBR<sup>®</sup>Green, it allows differentiating living and membrane-damaged cells, regardless of their cultivation capacity. A large population of cells with damaged membranes was evidenced in the biofilm suspensions, undoubtedly caused by environmental conditions (pharmaceutical molecules, detergents, and pH). These damaged membranes, added to the inability of the majority of bacteria to grow on synthetic medium, could explain why only 0.52% of the observed bacteria were able to grow on R2A agar media. Among the cultivable bacteria, we isolated 115 strains on media with ciprofloxacin as selecting agent, of which the genus *Aeromonas* was the most prevalent (69.5%). This opportunistic pathogen has the inherent capability to grow in water distribution systems, especially in biofilms, where bacteria can resist chlorination (Igbinsosa et al., 2012; Piotrowska and Popowska, 2014). Other Gram-negative bacteria, belonging to the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonaceae* families, were also detected. All these bacteria are

naturally found in water environments and frequently associated with nosocomial infections. To determine if some strains isolated in the effluent biofilms originated from the hospital environment, we compared them with isolates of the same species collected in patient specimens during the 2-week period of the study. It should be noted that several attempts to form biofilms in the hospital incoming water had little success and did not allow the selection of any ciprofloxacin resistance isolate (data not shown), reinforcing the hypothesis of the hospitalized patients as the origin of the ciprofloxacin-resistant effluent strains. Whatever the species, PFGE showed no similarity between the 60 ciprofloxacin-resistant hospital strains and the 26 ciprofloxacin-resistant effluent strains. This could have been due to the limited number of ciprofloxacin-resistant strains isolated from the effluent. Alternatively, the release of clinical strains in a hostile environment such as hospital effluent is likely to exert dramatic stress on the bacteria, which might not be able to compete for integration in resident biofilms and/or to grow in vitro on media. However, we cannot exclude the occurrence of DNA transfers between bacteria from the two compartments (clinical isolates and environmental bacteria), including antibiotic resistance genes. Indeed, careful examination of the antibiotic resistances of the effluent biofilm bacteria showed that more than 60% exhibited resistance to up to six antibiotics, including molecules mostly used in the hospital area, i.e. aminoglycosides (gentamicin, 60.18%, tobramycin, 78.76%) and third-generation cephalosporins (ceftazidime, 76.11%). Previous studies have described the presence of multi-resistant and ESBL-producing bacteria in hospital effluent worldwide (Chagas et al., 2011). Because of the instability of cephalosporins, these molecules are rarely sought for in hospital effluents and we concentrated our efforts on more stable molecules like fluoroquinolones. The MEC of ciprofloxacin ( $2.08 \pm 0.88$  µg/L) was much lower than the MICs of biofilm isolates, but low concentrations of fluoroquinolones both induce genetic alterations associated with the movement of mobile elements and increase the rate of mutagenesis (Andersson and Hughes, 2014; Gullberg et al., 2011), a biological hazard different from the harmful effect estimated by the PNEC. In addition, plasmid-mediated fluoroquinolone resistance (PMQR) mechanisms including drug target protection by Qnr proteins and enzymatic modification by the *aac(6′)-Ib-cr*-encoding enzyme confer low-level resistance that facilitates the selection of mutants with higher levels of resistance (Gibson et al., 2010; Hooper and Jacoby, 2015; Robicsek et al., 2006). In our study, *qnrS* was dominant (40.9% of the isolates) and detected in both *Aeromonas* spp and *Klebsiella* isolates, alone or associated with *aac(6′)-Ib-cr* and/or *qnrB*. The *qnrS* genes were previously identified in *Aeromonas* spp from an aquatic environment (Picão et al., 2008; Poirel et al., 2012, 2008; Xia et al., 2013), supporting the hypothesis of the main role of these genes in the dissemination of quinolone resistance markers.

## 5. Conclusion

Determination of the measured environmental concentration of ciprofloxacin, and comparison with predicted environmental concentrations indicated a potential ecotoxicological risk. Because of the combination of a low level of antibiotic molecules and environmental microorganisms, hospital effluents can be considered as significant sources of hazard.

Analysis of ciprofloxacin-resistant isolates from biofilms formed within the hospital effluent indicated that *Gamma-Proteobacteriae* were numerous and harbored multiple resistance genes. The biofilm lifestyle represents a “hot spot” for exchanges between hospital and environmental microorganisms and may increase the distribution rates of antibiotic resistance. Comparison of biofilm isolates with bacteria isolated from patients hospitalized during the



same period showed there was no clonality among the strains. However the possibility of horizontal gene transfer between the two compartments cannot be ruled out since these events might even be favoured by local sub-inhibitory antibiotic concentrations.

## Acknowledgments

The authors thank Christophe Portelli and Paul Alain Nana for providing field and laboratory assistance. We are also grateful to Sonia Khier for the pharmacokinetic analysis, Frederic Robin and Chantal Rich for their insightful comments and discussions during this research project. We thank Vincent Pinon for providing the data of medicine consumption, Victoria Girard for her help in bacterial identification and Christelle Blavignac Centre Imagerie Cellulaire Santé (CICS) for her help in microscopy observation.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.033>.

## References

- Adachi, F., Yamamoto, A., Takakura, K.-I., Kawahara, R., 2013. Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 444, 508–514. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.077>.
- Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé, 2014. L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2010 et 2013.
- Al-Ahmad, A., Daschner, F.D., Kümmerer, K., 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 158–163. <http://dx.doi.org/10.1007/s002449900501>.
- Alder, A.C., McArdell, C.S., Golet, E.M., Kohler, H.-P.E., Molnar, E., Thi, N.A.P., Siegrist, H., Suter, M.J.-F., Giger, W., 2004. Environmental exposure of antibiotics in wastewaters, sewage sludges and surface waters in Switzerland. In: Kümmerer, A.P.D.K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 55–66.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465–478.
- Bailly, E., Levi, Y., Karolak, S., 2013. Calibration and field evaluation of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring pharmaceuticals in hospital wastewater. *Environ. Pollut.* 174, 100–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.025>.
- Boillot, C., Bazin, C., Tissot-Guerraz, F., Droguet, J., Perraud, M., Cetre, J.C., Trepo, D., Perrodin, Y., 2008. Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci. Total Environ.* 403, 113–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.037>.
- Bonnet, J.-L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* 22, 78–91. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20237>.
- Bricheux, G., Bonnet, J.-L., Bohatier, J., Morel, J.-P., Morel-Desrosiers, N., 2013. Microcalorimetry: a powerful and original tool for tracking the toxicity of a xenobiotic on *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 88–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.019>.
- Cattoir, V., Poirer, L., Aubert, C., Soussy, C.-J., Nordmann, P., 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 231–237. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1402.070677>.
- Chagas, T.P.G., Seki, L.M., Cury, J.C., Oliveira, J.A.L., Dávila, A.M.R., Silva, D.M., Asensi, M.D., 2011. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro. *Braz. J. Appl. Microbiol.* 111, 572–581.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marré, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>.
- Czekalski, N., Gascón Díez, E., Bürgmann, H., 2014. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* 8, 1381–1390.
- Daouk, S., Chèvre, N., Vernaz, N., Widmer, C., Daali, Y., Fleury-Souverain, S., 2016. Dynamics of active pharmaceutical ingredients loads in a Swiss university hospital wastewaters and prediction of the related environmental risk for the aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 547, 244–253.
- Duong, H.A., Pham, N.H., Nguyen, H.T., Hoang, T.T., Pham, H.V., Pham, V.C., Berg, M., Giger, W., Alder, A.C., 2008. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* 72, 968–973. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.009>.
- Ebert, I., Bachmann, J., Kühnen, U., Küster, A., Kussatz, C., Maletzki, D., Schlüter, C., 2011. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2786–2792. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.678>.
- Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.-M., Vermande, P., 2005. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J. Hazard. Mater.* 117, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.08.032>.
- Gautam, A.K., Kumar, S., Sabumon, P.C., 2007. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *J. Environ. Manag.* 83, 298–306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.03.009>.
- Gibson, J.S., Cobbold, R.N., Heisig, P., Sidjabat, H.E., Kyaw-Tanner, M.T., Trott, D.J., 2010. Identification of *Qnr* and *AAC(6′)-1b-cr* plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. *Vet. Microbiol.* 143, 329–336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.031>.
- Golet, E.M., Alder, A.C., Giger, W., 2002. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the glatt valley watershed, Switz. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3645–3651. <http://dx.doi.org/10.1021/es0256212>.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ibbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 7, e1002158.
- Halling-Sørensen, B., Lützhøft, H.-C.H., Andersen, H.R., Ingerslev, F., 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 53–58. [http://dx.doi.org/10.1093/jac/46.suppl\\_1.53](http://dx.doi.org/10.1093/jac/46.suppl_1.53).
- Harris, S., Morris, C., Morris, D., Cormican, M., Cummins, E., 15 January 2014. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the municipal wastewater system: effect of hospital effluent and environmental fate. *Sci. Total Environ.* 468–469C, 1078–1085. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.017>.
- Hausner, M., Wuertz, S., 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3710–3713.
- Helwig, K., Hunter, C., McNaughtan, M., Roberts, J., Pahl, O., 2015. Ranking prescribed pharmaceuticals in terms of environmental risk: inclusion of hospital data and the importance of regular review. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1043–1050.
- Hennequin, C., Aumeran, C., Robin, F., Traore, O., Forestier, C., 2012. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a (CTX)<sub>M</sub>-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2123–2130. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks169>.
- Hooper, D.C., Jacoby, G.A., 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1354, 12–31.
- Ibrahim, I., Togola, A., Gonzalez, C., 2013. Polar organic chemical integrative sampler (POCIS) uptake rates for 17 polar pesticides and degradation products: laboratory calibration. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 3679–3687. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1284-3>.
- Igbino, I.H., Igumbor, E.U., Aghdasi, F., Tom, M., Okoh, A.I., 2012. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Sci. World J.* 2012, 625023.
- Johnson, A.C., Keller, V., Dumont, E., Sumpter, J.P., 2015. Assessing the concentrations and risks of toxicity from the antibiotics ciprofloxacin, sulfamethoxazole, trimethoprim and erythromycin in European rivers. *Sci. Total Environ.* 511, 747–755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.055>.
- Kümmerer, K., 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manag.* 90, 2354–2366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>.
- Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 45, 957–969. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8).
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V., 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40, 701–710. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00439-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00439-7).
- Leprat, P., 1998. Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques?.
- Lindberg, R.H., Björklund, K., Rendahl, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A.V., 2007. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Res.* 41, 613–619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.014>.
- Lindberg, R.H., Wennberg, P., Johansson, M.I., Tysklind, M., Andersson, B.A.V., 2005. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3421–3429. <http://dx.doi.org/10.1021/es048143z>.
- Miège, C., Budzinski, H., Jacquet, R., Soulier, C., Pelte, T., Coquery, M., 2012. Polar organic chemical integrative sampler (POCIS): application for monitoring organic micropollutants in wastewater effluent and surface water. *J. Environ. Monit.* 14, 626–635.
- Morin, N., Camilleri, J., Cren-Olivé, C., Coquery, M., Miège, C., 2013. Determination of uptake kinetics and sampling rates for 56 organic micropollutants using “pharmaceutical” POCIS. *Talanta* 109, 61–73.
- Mutiyaar, P.K., Mittal, A.K., 2014. Risk assessment of antibiotic residues in different water matrices in India: key issues and challenges. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21,



- 7723–7736. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2702-5>.
- Pereira, A.M.P.T., Silva, L.J.G., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A., 2015. Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environ. Res.* 136, 108–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.09.041>.
- Petrovic, M., de Alda, M.J.L., Diaz-Cruz, S., Postigo, C., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D., 2009. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Phil. Trans. R. Soc. A* 367, 3979–4003. <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2009.0105>.
- Picão, R.C., Poirel, L., Demarta, A., Silva, C.S.F., Corvaglia, A.R., Petrini, O., Nordmann, P., 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 948–950.
- Piotrowska, M., Popowska, M., 2014. The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments. *Ann. Microbiol.* 64, 921–934. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-014-0911-2>.
- Plesner, P., et al., 1964. Nucleotide metabolism during synchronized cell division in *Tetrahymena pyriformis*. *C. R. Trav. Lab. Carlsb.* 34, 1–76.
- Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P., 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance: interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front. Microbiol.* 3, 24.
- Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P., 2008. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 295–297. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01930.x>.
- RAISIN, 2012. Surveillance de la consommation des antibiotiques.
- Robicsek, A., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 6, 629–640. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70599-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70599-0).
- Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., Balcázar, J.L., 2014. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>.
- Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 461–462, 302–316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>.
- Savage, V.J., Chopra, I., O'Neill, A.J., 2013. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1968–1970. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02008-12>.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 325–335. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x>.
- Société Française de Microbiologie, 2014. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations 2014*.
- Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., Reissman, D.B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.* 329, 99–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.015>.
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 8, 768–777. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.189>.
- Su, H.-C., Ying, G.-G., He, L.-Y., Liu, Y.-S., Zhang, R.-Q., Tao, R., 2014. Antibiotic resistance, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and ampC gene in two typical municipal wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 324. <http://dx.doi.org/10.1039/c3em00555k>.
- Tuméo, E., Gbaguidi-Haore, H., Patry, I., Bertrand, X., Thouverez, M., Talon, D., 2008. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *Int. J. Hyg. Env. Heal* 211, 200–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.02.010>.
- Van Doorslaer, X., Dewulf, J., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2014. Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Sci. Total Environ.* 500–501C, 250–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>.
- Varela, A.R., Macedo, G.N., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2015. Genetic characterization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from urban streams and municipal and hospital effluents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, fiv015.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2012. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 430, 109–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Jelic, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2014. Comparison of measured and predicted concentrations of selected pharmaceuticals in wastewater and surface water: a case study of a catchment area in the Po Valley (Italy). *Sci. Total Environ.* 470–471, 844–854. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.026>.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2015. What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives. *Sci. Total Environ.* 514, 467–491. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.020>.
- Vrana, B., Mills, G.A., Dominiak, E., Greenwood, R., 2006. Calibration of the chemcatcher passive sampler for the monitoring of priority organic pollutants in water. *Environ. Pollut.* 142, 333–343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.033>.
- Xia, R., Ren, Y., Xu, H., 2013. Identification of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in multidrug-resistant gram-negative bacteria from hospital wastewaters and receiving waters in the Jinan area, China. *Microb. Drug Resist.* 19, 446–456. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2012.0210>.
- Zenobio, J.E., Sanchez, B.C., Leet, J.K., Archuleta, L.C., Sepúlveda, M.S., 2014. Presence and effects of pharmaceutical and personal care products on the Baca National Wildlife Refuge, Colorado. *Chemosphere.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.050>.



Table S1. Consumption of ciprofloxacin at the hospital over the 2 weeks analysis and pharmacokinetics parameters used to estimate the amount of ciprofloxacin potentially released in the hospital wastewater.

Molecule	Administration way	Form	Quantity (mg)	Consumption	q = Quantity consumed (mg)	u = % dose urinary excretion (min-max)	f = % dose faecal excretion (min-max)
CIP	PO	Tablet	750	50	37 500	35-50%	20-35%
		Tablet	500	16	8 000	35-50%	20-35%
		Solution	500	1	500	35-50%	20-35%
	IV	Infusion solution	400	0	0	50-70%	15-15,20%





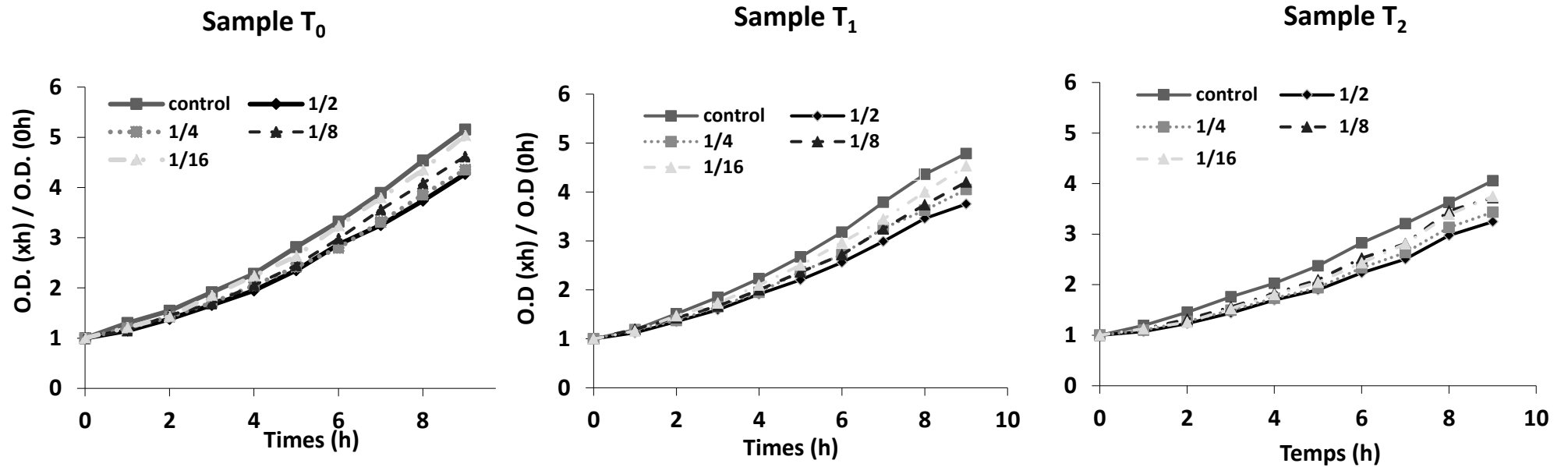


FIG. S1 Growth of *Tetrahymena pyriformis* in the T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> samples. Crude and diluted samples (1/2, 1/4 and 1/8, 1/16) were assessed for their impact on the generation time of the ciliate. Results are expressed as the ratio OD<sub>535</sub> measured every hour compared to the control during 9 hours.



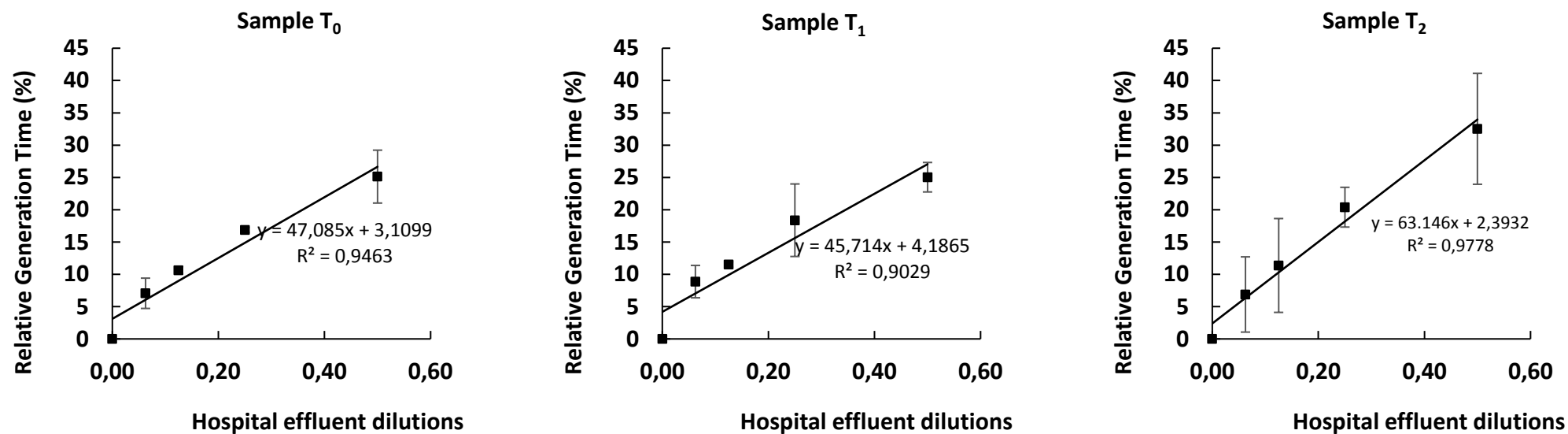


FIG. S2 The relative toxicity of hospital effluent (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) were quantified by determining the inhibitory concentrations (IC<sub>20</sub>), corresponding to a 20% decrease in cell growth of *T. pyriformis* compared to untreated cells.



## Commentaire d'article 1 :

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur la détection des fluoroquinolones potentiellement présentes dans les effluents hospitaliers spécifiquement la ciprofloxacine, l'ofloxacine et la norfloxacine. Nous avons mesuré les concentrations de ces molécules faiblement biodégradables (De Bel *et al.*, 2009; Sturini *et al.*, 2012) en utilisant un échantillonneur passif (POCIS). Nous avons mesuré les composés parents et pas leurs métabolites. En parallèle de la ciprofloxacine, les concentrations mesurées (MEC) et prédites environnementales (PEC) de l'ofloxacine et de la norfloxacine ont également été établies (Tableau 21). Un risque écotoxicologique de l'ofloxacine est identifié dans les effluents hospitaliers avec un  $HQ > 1$  mais absent pour la norfloxacine ( $HQ < 1$ ). Cependant, une discordance entre la PEC et la MEC de l'ofloxacine est constatée, avec un ratio de 9 ce qui est relativement élevé (Verlicchi, 2016). La PEC, pourtant évaluée à partir des consommations réelles du CHU sur la période d'échantillonnage, semble sous-estimée. Cette discordance pourrait être due d'une part à des différences entre prescriptions (données collectées provenant de la pharmacie) et consommation réelle du patient, d'autre part à la transformation de la lévofloxacine, un énantiomère de l'ofloxacine. Cependant, l'ajout de la  $PEC_{\text{levofloxacine}}$  à la  $PEC_{\text{ofloxacine}}$  ne permet pas de répondre à nos interrogations. Un autre postulat serait une sur-estimation analytique de la MEC. Des interférences analytiques peuvent avoir existé lors de la mesure de l'ofloxacine. A noter que cette discordance a également été constatée dans une étude de Verlicchi (Verlicchi and Zambello, 2016). Les fluoroquinolones détectées dans les effluents hospitaliers conservent leurs activités bactéricides. Ces antibiotiques exercent donc des effets toxiques dans le compartiment aquatique sur le système écologique et sur les microorganismes.

En utilisant les PNEC issues des tests écotoxicologiques, les valeurs de HQ pour les FQ sont supérieures à 1 sauf pour la norfloxacine ( $HQ = 0.38 \pm 0.18$ ). Un risque écotoxicologique potentiel est lié à ces effluents hospitaliers. Ces effluents hospitaliers rejoignant les effluents urbains puis la station d'épuration, un facteur de dilution devrait être pris en compte pour estimer plus précisément le risque. Dans cette étude, l'effet écotoxicologique de la ciprofloxacine a été évalué sur le modèle expérimental *Tetrahymena pyriformis*. Il serait intéressant d'analyser sur ce modèle écotoxicologique l'impact d'un cocktail de fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine et

**Tableau 21:** Predicted Environmental Concentration (PEC), Predicted No-Effect Concentration (PNEC). Measured Environmental Concentration (MEC) par les POCIS et détermination du Hazard quotient (HQ) pour la norfloxacin et l'ofloxacin

Molécule		Valeurs	Ecart type	
Quantité (µg/l)	Norfloxacin	Quantité consommée	6,24 10 <sup>+7</sup>	
		Quantité inchangée éliminée par l'organisme	4,21 10 <sup>+7</sup>	2,03E+07
	Ofloxacin	Quantité consommée	7,94 10 <sup>+7</sup>	
		Quantité inchangée éliminée par l'organisme	6,15 10 <sup>+7</sup>	5,96E+06
Concentration (µg/l)	Norfloxacin	PEC <sub>Hopital</sub>	7,68	3,7
		MEC <sub>POCIS</sub>	6,43	0,56
		MEC <sub>punctual</sub>	6	
		PNEC	20	
		PNEC <sub>(CMI)</sub>	0,5	
		F=PEC/MEC	0,54	
		HQ <sub>POCIS</sub> = MEC <sub>POCIS</sub> /PNEC	0,32	0,028
		HQ <sub>r</sub> = MEC <sub>POCIS</sub> /PNEC <sub>(CMI)</sub>	12,86	1,12
		HQ <sub>predictive</sub> =PEC/PNEC	0,38	0,18
		HQ <sub>predictive</sub> =PEC/ PNEC <sub>(CMI)</sub>	15,36	7,4
	F	100		
	Ofloxacin	PEC <sub>Hopital</sub>	11,22	1,09
		MEC <sub>POCIS</sub>	101,06	18,47
		MEC <sub>punctual</sub>	14	
		PNEC	3,12	
		PNEC <sub>(CMI)</sub>	0,5	
F=PEC/MEC		0,11		
HQ <sub>POCIS</sub> = MEC <sub>POCIS</sub> /PNEC		32,4	5,9	
HQ <sub>r</sub> = MEC <sub>POCIS</sub> /PNEC <sub>(CMI)</sub>		202,13	36,94	
HQ <sub>predictive</sub> =PEC/PNEC	3,6	0,35		
HQ <sub>predictive</sub> =PEC/ PNEC <sub>(CMI)</sub>	22,4	2,18		
F	10			

norfloxacine) ce qui permettrait d'apprécier leur synergie d'action dans le compartiment aquatique sur un nouvel organisme autre que les poissons ou les algues (González-Pleiter *et al.*, 2013a; Marx *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). En utilisant les PNEC issues des CMI (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016), le risque d'acquisition de résistance dans les effluents hospitaliers est supérieur à 1 d'après les concentrations mesurées, pour l'ofloxacine et la ciprofloxacine (Tableau 21). Afin de tenir compte des variations saisonnières de consommations d'antibiotiques, il aurait été intéressant de réaliser deux campagnes, une en hiver et une en été, pour évaluer le risque environnemental des fluoroquinolones. En effet, la consommation d'antibiotiques varie beaucoup durant ces périodes (Suda *et al.*, 2014), la pression de sélection dans les effluents hospitaliers n'est donc pas la même et pourrait modifier la composition et la nature des biofilms.

Dans la majorité des études recherchant les microorganismes résistants aux antibiotiques dans les effluents hospitaliers, les bactéries sont étudiées sous forme planctonique et très rarement dans les biofilms. Or dans le compartiment aquatique les bactéries vivent majoritairement sous forme de biofilms. Parmi les bactéries cultivables du biofilm des effluents hospitaliers, nous avons isolé 115 souches sur un milieu sélectif (ciprofloxacine 1 µg/mL). Le genre *Aeromonas* était le plus prévalent (69,5%). Ce pathogène opportuniste a la capacité de se développer dans les réseaux de distribution spécialement dans les biofilms (Igbinsosa *et al.*, 2012; Piotrowska and Popowska, 2014). Des bactéries appartenant aux *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae* ont également été identifiées. Toutes ces bactéries sont naturellement présentes dans les eaux environnementales mais sont aussi fréquemment associées à des infections nosocomiales. Pour déterminer si les souches isolées des biofilms des effluents hospitaliers provenaient de l'hôpital, nous les avons comparées avec les isolats cliniques résistants aux fluoroquinolones issus des patients pendant les deux semaines de l'étude. Aucune similarité n'a été montrée entre les 60 souches cliniques résistantes à la ciprofloxacine et les 26 souches résistantes à la ciprofloxacine issues des effluents hospitaliers. Cela pourrait être dû à un nombre de souches sélectionnées trop faible. Il est aussi possible que l'élimination de ces souches cliniques dans un environnement hostile comme les effluents hospitaliers exerce un stress sur les bactéries qui les empêche d'intégrer le biofilm. Enfin, les concentrations en détergent et désinfectant sont élevées dans ces effluents et pourraient détruire ces souches (Emmanuel, 2004). Cependant, ces résultats ne nous permettent pas d'exclure la possibilité de transfert d'ADN, dont les gènes de résistance, entre les bactéries des deux compartiments (isolats cliniques et bactéries environnementales). L'étude du profil de résistance





de ces bactéries environnementales a montré que plus de 60% d'entre elles étaient résistantes à plus de six antibiotiques, notamment des antibiotiques utilisés à l'hôpital comme les aminosides (gentamicine, 60%, tobramycine, 79%) et les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime, 76%). La MEC de la ciprofloxacine ( $2.08 \pm 0.88 \mu\text{g/L}$ ) était plus faible que les CMI des isolats des biofilms, mais de faibles concentrations de fluoroquinolones peuvent induire des altérations associées à des mouvements d'éléments génétiques mobiles et une augmentation du taux de mutagenèses (Gullberg *et al.*, 2011; Andersson and Hughes, 2014). Les mécanismes des PMQR telles que les protéines qnr et la modification enzymatique par aac(6')-Ib-cr confèrent des faibles niveaux de résistances et facilitent la sélection de mutant avec des hauts niveaux de résistances (Robicsek, Jacoby and Hooper, 2006; Gibson *et al.*, 2010; Hooper and Jacoby, 2015). Dans notre étude, qnrS est dominant (40.9% des isolats) et est détecté à la fois chez *Aeromonas spp* et *Klebsiella spp*, seul ou associé avec aac(6')-Ib-cr et/ou qnrB. Le gène *qnrS* a été préalablement identifié chez des *Aeromonas spp* provenant du compartiment aquatique (Picão *et al.*, 2008; Poirel, Cattoir and Nordmann, 2012; Xia, Ren and Xu, 2013) confortant l'hypothèse du rôle des *Aeromonas spp* dans la dissémination des résistances aux quinolones.



## Avant-propos article 2

Les carbapénèmes sont des antibiotiques de dernier recours dans le traitement des bactéries multirésistantes, l'imipénème est la plus fréquemment prescrite. Ce sont des antibiotiques à usage strictement hospitalier, à l'exception de l'Hospitalisation à Domicile. Après administration chez un patient, les antibiotiques ne sont pas entièrement métabolisés par l'organisme et vont être excrétés dans les eaux usées. Malgré leur fréquente utilisation hospitalière, la présence des carbapénèmes dans les eaux usées n'a quasiment jamais été documentée, probablement en raison d'une dégradation rapide dans cet environnement. Cependant, leur présence a été très récemment mise en évidence dans des effluents hospitaliers en Roumanie avec des concentrations d'imipénème de 14.42 µg/L (Szekeres *et al.*, 2017) et une présence également dans les eaux usées de stations d'épurations, les eaux souterraines, les eaux de rivières...

L'Organisation Mondiale de la Santé a publié en Octobre 2016 ses inquiétudes face à l'émergence de résistances nouvellement acquises par les bactéries issues notamment du milieu hospitalier (OMS, 2016). Au sein de ces émergences, les carbapénèmases sont parmi les plus préoccupantes. Elles ne sont pas seulement détectées chez les humains mais ont aussi été isolées chez les animaux ou dans l'environnement (Tacão, Correia and Henriques, 2015; Tanner *et al.*, 2015; Morakchi *et al.*, 2017; Pulss *et al.*, 2017; Zurfluh *et al.*, 2017). Une telle dissémination est probablement liée à la capacité du gène codant pour des carbapénèmases à être transféré dans le monde bactérien. Les gènes les plus fréquemment retrouvés dans les isolats cliniques sont *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>GES</sub>* et *bla<sub>OXA-48</sub>*. Ces carbapénèmases sont majoritairement acquises *via* des transferts horizontaux de gènes par des éléments mobiles tels les plasmides, les intégrons ou les transposons. Ces éléments génétiques mobiles sont les vecteurs de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement. Les isolats cliniques porteurs de gène codant pour les carbapénèmases sont excrétés par les patients et retrouvés dans les effluents hospitaliers majoritairement sous forme de biofilm. A de faibles concentrations dites sub-inhibitrices, les antimicrobiens exercent une pression de sélection favorisant des transferts génétiques horizontaux entre bactéries, permettant ainsi l'acquisition de mécanismes de résistances aux antibiotiques (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). Ces mécanismes de transfert de résistance sont amplifiés au sein des communautés microbiennes comme le biofilm.

Dans ce contexte, les effluents hospitaliers et notamment les biofilms constituent le lieu du parfait scénario pour l'échange de gènes entre les souches cliniques et bactéries de



l'environnement. L'objectif de cette étude a été à la fois d'évaluer la diversité des bactéries résistantes aux carbapénèmes dans les biofilms de cet effluent ainsi que la capacité de diffusion des supports génétiques de résistance de ces bactéries. En parallèle, la concentration des carbapénèmes dans l'effluent a été estimée à partir des consommations hospitalières et, avec ces données, une quantification du risque écotoxicologique de ces antibiotiques a pu être calculée. De plus, la stabilité de l'activité bactéricide de l'imipénème dans les conditions environnementales a été déterminée.



## **Biofilms in hospital effluents: hotspots for carbapenemase-encoding genes**

J. Ory<sup>1,3,4,5</sup>, G. Bricheux<sup>2,4</sup>, C. Forestier<sup>1,3,4</sup>, O. Traore<sup>3,4,5</sup>

(1) Université Clermont Auvergne, Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement",  
BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

(2) Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Laboratoire "Microorganismes :  
Génome et Environnement", BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

(3) Université Clermont Auvergne, Université d'Auvergne, Laboratoire "Microorganismes :  
Génome et Environnement", BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

(4) CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63170 Campus Universitaire des Cézeaux, FRANCE

(5) Service d'hygiène, CHU de Clermont-Ferrand, rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand,  
France





## **Abstract :**

The resistance to carbapenems represents a major health problem and is mainly due to the successful dissemination capacity of carbapenemases-encoding genes. The role of horizontal DNA transfer between resistant clinical isolates and environmental strains in wastewater has been poorly investigated while it could participate to the spreading of resistance genes.

In the present work, we looked for and characterized imipenem-resistant bacteria in biofilms formed in the effluent of the Clermont-Ferrand teaching hospital. Thirty-eight imipenem resistant strains were isolated and identified as *Aeromonas* (63%), *Pseudomonas* (23.6%), *Stenotrophomonas* (8%) and *Acinetobacter* (2.5%). Five of them harbored one carbapenemase encoding gene (*blaVIM* (3 strains), *blaOXA-48* (1 strain), *blaNDM* (1 strain)). No carbapenemase KPC encoding gene was detected. Genes encoding integrons of the classes 1, 2 and 3 were also detected in 76.3%, 39.5% and 7.9% of the isolates, respectively. All of the isolates also harbored associated resistances to aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracyclin or colistine. The presence of several plasmids of molecular weight between 48.5Kb and 194Kb was confirmed by S1-nuclease Pulse Field Gel Electrophoresis analysis and the transfer capacity of some of them harboring the carbapenemase encoding genes was evidenced by transformation and conjugation assays. Furthermore, the Predicted Environmental Concentration of imipenem was established with data from the hospital and was equal to 3.16 µg/L. All bacteria from biofilm were potentially subjected to sub-MICs of imipenem within the effluent, even though the biological activity of the molecule was undetectable after 45h of storage at 26°C (mean temperature of the effluent) as demonstrated *in vitro*.

Owing to the presence of antibiotics and the high concentration of bacteria, biofilms formed in the hospital wastewater can be considered as privileged places for genes exchange, notably those involved in antibiotic resistance.



## **Introduction**

During recent decades, antibiotics have been widely used as a therapy for bacterial infections in humans and animals. This practice led to an increase in the percentage of antibiotic resistant bacteria susceptible to lead to aforementioned therapy. Carbapenems are beta lactam antibiotics with a broad spectrum of activity and are usually considered as the last line of defense against severe hospital infections mainly those due to multidrug resistant Gram negative bacteria. The carbapenem consumption increased rapidly, from 0.0115 to 0.035 daily dose per 1000 inhabitant and this was correlated with an increase in the rates of carbapenem resistant bacteria mostly from clinical setting<sup>1</sup>. This global spread of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (CPE) has been reported, which represents an alarming and increasing threat for patient safety worldwide. A recent survey showed that in Europe, 1.3 patients per 10 000 hospital admissions developed infectious diseases due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* or *Escherichia coli*, with the highest incidence found in southern and southeastern Europe<sup>1</sup>. Likewise, the World Health Organization (WHO) recently published a list of antibiotic-resistant pathogens for which new and effective antibiotics are urgently needed<sup>2</sup> and the first priority focuses on carbapenem-resistant bacterial genus. Carbapenem-resistant strains have not only been detected in human samples but they have been also isolated from animal and environmental samples including food, drinking water and wastewater<sup>3-6</sup>. Such efficient dissemination is probably linked to the capacity of the genes encoding the carbapenem inactivating enzymes to transfer within the bacterial world. Indeed, the genes encoding the carbapenemases most frequently expressed by clinical isolates (KPC, VIM, NDM, GES and OXA-48) are carried by mobile genetic elements that ensure their maintenance and spread among Gram-negative bacterial species. In this context, the hospital sewage and notably the biofilms formed in this aquatic environment may constitute the place for perfect scenario for genes exchange between clinical pathogens and environmental bacteria.

Once administrated to the patients, a large part of the native antibiotic molecules and their metabolites are excreted into the wastewater, together with the resistant bacteria potentially selected in their digestive tracts<sup>7-10</sup>. The antibiotics such as fluoroquinolones, sulfamides and macrolide are frequently detected in wastewater, especially hospital effluents and surface water<sup>11-14</sup>. On the contrary and despite their intensive use, betalactams are rarely detected in the hospitals effluents, probably owing to their low chemical stability<sup>15</sup>. The question of potential



selective pressure exerted on local microorganisms by antibiotics, even at concentrations subMICs, arises.

In this study, we assessed the presence of carbapenem (imipenem)-resistant bacteria in a hospital effluent and characterize the antibiotic resistance patterns of the isolates, with special focus on their mobile genetic elements. Since the presence of antibiotic is known to facilitate the emergence of resistance, we also investigated the amount of imipenem theoretically present in the hospital effluent and its *in vitro* effective life. All these data support the role played by heavily contaminated environments in the antibiotic spreading phenomenon.

## **Material and Methods**

### **Hospital effluent sampling**

The samples were collected within the effluent of the Gabriel Montpied hospital, Clermont-Ferrand (139,500 inhabitants) France (latitude 45.7589632; longitude 3.0941279). It is a medium-size hospital with 1,100 beds that operates 24h a day with a peak of activity from 7a.m to 1p.m. Water consumption is 13,500–16,000 m<sup>3</sup> monthly, between 409 and 478 L/bed/day. The hospital effluent is directly discharged into the urban sewage network without any external connection and then into the municipal WWTP, “Les Trois Rivières”, which receives and treats about 1,700,000 m<sup>3</sup> a month.

The experimental sampling tank (110 cm–50 cm–50 cm) was located on a line receiving exclusively wastewater from the hospital, upstream of the connection with the pipe recovering rainwater and public network wastewater. Physical and chemical characteristics of the hospital effluent were assessed previously<sup>16</sup>.

### **Characterization of the imipenem environmental risk**

Determination of the predicted environmental concentration (PEC) and Ecotoxicological risk assessment (hazard quotient (HQ)) was done as follows. The consumption of imipenem by patients in Gabriel Montpied hospital during the study period was assessed with PHARMA software (Computer Engineering) and the amount potentially released in the hospital effluent calculated according to pharmacokinetics parameters [www.theriaque.org, www.drugs.com] (Table S1). The Predicted environmental values (PEC) was calculated by the formula used as previously described<sup>16</sup>. The environmental risk assessment of imipenem was defined according to



its hazard quotient (HQ).EU guidelines. HQ is the quotient between PEC and the predicted no effect concentration (PNEC). The PNEC value used in this study (78 µg/mL) was previously established<sup>17</sup>.

### **Measurement of imipenem effectiveness life**

The stability of imipenem was evaluated by determining its activity on the imipenem-susceptible strain *Escherichia coli* K12 C600 using the agar diffusion test (Müller Hinton, MH). A stock solution of imipenem (Sigma-Aldrich, Lyon, France) was made at a concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup> and stored at 26 °C; for each assay 10µL of the stock solution were loaded onto sterile 10mm-diameter paper discs, which were then deposited on a bacterial lawn formed by swabbing a bacterial suspension (McFarland = 0.6). The negative and positive controls consisted in paper discs impregnated with saline and commercialized imipenem disks (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) stored at 4°C, respectively. The experiment was repeated in triplicate every 6 hours for 54 hours. The diameters of inhibition zone were measured after 18h of incubation at 37°C.

The stability of imipenem was also measured in broth medium, by incubating *E. coli* C600 (DO=0.6) into MH broth containing imipenem at 10 mg.mL<sup>-1</sup>. After 2 hours of incubation at 37°C under agitation, the number of colony forming units (CFU) was determined by plating serial dilutions of the bacterial suspensions onto MH agar plates further incubated 18 hours at 37°C. The experiment was repeated every 6 hours for 54 hours and included controls (growth without antibiotic).

### ***In situ* biofilm formation, microbial content analysis and characterization of imipenem-resistant isolates**

Biofilms were formed on glass slides stuck on a rectangular granite slab placed at the bottom of the hospital effluent wastewater tank. The slides were disposed in the direction of the flow and were constantly submerged without any drying period during 15 days (04/09/2014 to 04/23/2014) to allow the development of substantial biofilm biomass. Each glass slide was collected in Falcon tubes filled with 50 mL of saline to rinse the biofilm and remove planktonic cells. Glass slides were then scratched with a razor blade and sonicated for 5 min in a total volume of 50 mL saline to disrupt the biofilm.





Total biofilm cells were counted by flow cytometry with the suspensions obtained after biofilm disassembly. SYBR®Green was used to stain 500 µL of the suspension. The cells were pre-heated at 37 °C for 3–4 min and SYBR®Green (10,000X) was then added to 1X final concentration and the cells incubated again for 10 min at 37 °C. To evaluate cell viability, the samples were counter-stained with Propidium Iodide (PI) 1 mg/mL diluted 1/500 for 10 min at room temperature. The analyses were performed with a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Imipenem-resistant bacteria were isolated by spreading serial dilutions (from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ) of the biofilm suspension onto R2A-agar medium with and without imipenem at 8 µg/mL and incubated at 30 °C for 24 h/48 h in aerobic conditions. The bacteria counts were performed. The resulting colonies were further isolated and identified by Gram staining and mass spectrometer analysis (MALDI-TOF technology bioMérieux) or 16S DNA sequencing. The percentage of cultivable bacteria was determined by comparing the total amount of CFU obtained on non-selective agar with the flow cytometry counts. The percentage of imipenem-resistant isolates among the cultivable bacteria was determined by comparing the number of CFU/mL obtained after growth with and without antibiotics in the medium.

The isolates' antibiotic resistance pattern was determined by agar diffusion susceptibility testing: ampicillin (AMP, 10 µg), ticarcillin (TIC, 75 µg) piperacillin/tazobactam (PTZ, 85 µg), piperacillin+tazobactam (PTZ, 30-6 µg), Amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 20-10 µg), cephazolin (CZN, 30 µg), cefalexin (CN, 30 µg), ceftazidim (CZD, 10 µg), cefuroxim (CXN, 30 µg), cefixim (FIX, 5 µg), cefepim (FEP, 30 µg), mecillinam (MEC, 10 µg), imipenem (IMP, 10 µg), ertapenem (ETP, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), temocillin (TEM, 30 µg), gentamicin (GMN, 10 µg), netilmicin (NTM, 10 µg), tobramycin (TMN, 10 µg), amikacin (AMK, 30 µg), nalidixic acid (NAL, 30 µg), norfloxacin (NXN, 10 µg), ofloxacin (OFX, 5 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), chloramphenicol (CHL, 30 µg), trimethoprim (TMP, 5 µg), Trimethoprim and sulfamethoxazole (STX/TMP, 25 µg), tetracylin (TET, 30 µg), fosfomicin (FOS, 200 µg), colistin (COL, 50 µg), rifampicin (RIF, 30 µg). (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France). The breakpoint values were interpreted according to the SFM-EUCAST guidelines<sup>18</sup>.



The minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem were determined by the dilution method in MH medium as recommended by the guidelines of the Société Française de Microbiologie <sup>18</sup>.

### **Detection and analysis of carbapenemase-encoding genes and genetic mobile elements**

All imipenem-resistant isolates were screened by multiplex PCR for the presence of carbapenemase genes, with primers specific for *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA48</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> (Table 1). PCRs were carried out in 10 µL volume containing 1 µL of template DNA (10 ng) with the KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (KAPA Biosystems, CliniSciences, Nanterre, France). The temperature profile for amplification was as follows: 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 15 s, annealing temperature of 60 °C for 30 s, 72 °C for 20 s, and a final extension step at 72 °C for 3 min. The PCR products were subjected to gel electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel. The *bla* genes references chosen were the publicly available ones referenced in NCBI Genbank database.

The presence of integron in wild-type strains from the biofilm effluent was assessed using PCR with primers specific for *int1*, *int2* and *int3* (Eppendorf Co., Hamburg, Germany) (see table 1)

### **Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation**

Plasmid DNA from biofilm isolates was extracted with the miniprep plasmid DNA maxi kit and analyzed by electrophoresis on a 0.7% agarose gel. Purified plasmid DNA was subjected to electroporation into *E. coli* Top10 according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France). Recombinant bacteria were plated onto Lysogeny agar (LB) agar plates containing imipenem 2 µg/ml. Resulting colonies were checked by performing PCR with carbapenemase specific primers and their phenotypical antibiotic resistance pattern determined by agar diffusion testing as described above.

### **Conjugation experiment**

Mating experiments were performed using sodium azide resistant *E. coli* J53 as a recipient strain. Briefly the imipenem resistant donor (wild-type or transformants) and recipient strains were grown in LB medium overnight at 37°C, and then mixed (1:1 ratio) in 10 ml of LB fresh medium. After 2h of incubation at 37°C, the suspension was diluted and seeded onto medium (LB) plate. After overnight incubation at 37°C, transconjugants were selected by plating serial dilutions of



the suspensions onto LB agar plates supplemented with imipenem and sodium azide (2µg/ml and 200µg/ml, respectively). The presence of carbapenemase encoding genes in selected transconjugant was assessed by specific PCRs and phenotypical antibiotic resistance pattern determination. The phenotypical antibiotic resistance pattern for the transconjugant were determined by agar diffusion testing as described above.

### **Plasmids analysis by S1-nuclease PFGE**

The plasmid content from recombinant, transconjugant and environmental strains was compared by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) after S1 nuclease digestion. All PFGE reagents used were from Bio-Rad (CHEF Genomic DNA Plug Kits). Genomic DNA agaroses blocks were digested with the endonuclease S1 (New England Biolab) for 45 min at 37°C, and then loaded into 1% electrophoretic agarose gel and run with the CHEF-DR II system (Bio-Rad), with a specific program 1-10s, 14h, 6V/cm (voltage, pulse time, and electrophoretic time) at 14°C. The gels were then stained with Gel Star® (Lonza, Rockland, ME USA). Dendrograms were determined with FPQuest software (BioRad, Marne la Coquette, France).

## **Results**

### **Biofilm analysis and characterization of imipenem-resistant isolates**

The microscopic observation of biofilm formed in the hospital effluent showed relatively uniform aggregates all over the glass substrate with microorganism embedded in a thick matrix. Several bacterial morphologies were observed but rods were predominant. Cytometry analysis of the biofilm population after PI and SYBRgreen staining identified a total of  $1.10 \times 10^8$  organisms. Two main populations were characterized, with living ( $5.40 \times 10^7$ -49.09%) and damaged ( $4.50 \times 10^7$ - 40.91%) cells (data not shown). Culture of biofilm suspension on non-selective medium led to the isolation of  $2.85 \times 10^5$  CFU/mL corresponding to 0.259% of the total cells detected by flow cytometry. The addition of imipenem to the medium resulted in the selection of about  $6.3 \times 10^4$  CFU/mL, *i.e.* 0.064% of the total bacterial cells and 22.1% of the cultivated bacteria. We selected 38 isolates on the basis of colony characteristics (size, color, aspect). Their identification indicated that they belong to 8 different bacterial species, mostly within *Gamma-Proteobacteria* (Table 1). Members of the *Aeromonadaceae* family were the most prevalent (63.15%), mostly of



the *Aeromonas spp* genus. *Pseudomonaceae* was the second most prevalent family (26.32%), with *Pseudomonas spp*.

Antibiotic susceptibility testing indicated that most of them 50 % showed multiresistant phenotypes to 5 antibiotics classes (betalactam, fluoroquinolones, tetracyclin, aminoglycosides, trimethoprim with or without sulfamethoxazole) as shown in figure 1. Resistance to third generation cephalosporins (cefotaxime and ceftazidime) was observed in 73.7% and 60.5% of the isolates, respectively, and 60% of them showed resistance to up to four antibiotic families. The MIC of imipenem was superior to 32 µg/ml for 89.5% of the isolates and higher than 256 µg/ml for 23.7% of them (figure 2). Detection of the carbapenemase encoding genes by simplex PCR showed that five strains harbored carbapenemase; 2 strains *Aeromonas spp* harboring *bla*NDM or *bla*VIM, 2 strains *pseudomonas spp* harboring *bla*VIM or *bla*NDM and one strain *Stenotrophomonas spp* harboring *bla*OXA-48. No carbapenemase KPC and GES encoding gene were detected. However, the MICs of imipenem were in the same range, whatever the number of carbapenemase-encoding genes harbored by the strains. Genes encoding integrons of the classes 1, 2 and 3 were detected 76.3%, 39.5% and 7.9%, respectively. In addition to harboring *int1*, 8 isolates were positive for *int2* (7 strains) and *int3* (1 strain) and one isolate harbored the three integron encoding genes.

### **Plasmid analysis of carbapenem resistant strains**

Plasmid DNA was extracted from 8 strains selected among the 38 biofilm isolates. The criteria selected were the species (*Aeromonas spp*, *Stenotrophomonas spp* and *Pseudomonas spp*) and the carbapenemase encoding gene. Transformants resistant to imipenem were obtained after electroporation of the *E. coli* Top 10 strain with each of the plasmid extracts. In addition, all transformants showed phenotypic resistance to more than one class of antimicrobial compound (sup table 2). A carbapenemase *bla*VIM encoding gene was confirmed on one transformant. When using these transformants as donor strains in mating experiments, imipenem resistant transconjugants were obtained. Plasmids analysis by S1-nuclease PFGE evidenced several plasmids in 2 wild-type strains and their derivatives, with molecular weight between 48.5Kb and 194Kb (Figures 3a and 3b).





## **Assessment of imipenem in the hospital effluent**

The PEC of imipenem was determined taking into account the total prescription of this antibiotic at the Gabriel Montpied hospital from 04/09/2014 to 04/23/2014. The  $HQ_{\text{predictive}}$  was lower than 1, equal to  $0.046 \pm 0.003$  (Table 2), indicating a potential ecotoxicological risk.

Regarding the *in vitro* stability and kinetics of degradation of imipenem at 26°C, the two methodologies aiming to measure the biological activity (agar disk diffusion and broth dilution) indicated that Imipenem half-life was about 26h and no more inhibitory effect was evidenced after 45h of storage of the antibiotic stock solution (Figures 4 and 5).

## **Discussion :**

The sources of antibiotic resistance in the environment tend to be multifactorial but excessive human, veterinary, and agricultural uses of antimicrobial products play a main role, together with the low efficacy of sewage treatment. Indeed, antibiotics and their metabolites are disposed into the WWTP, persist in treated effluents and contaminate surface waters<sup>19–21</sup>. One of the main environmental problems caused by hospital effluents is due to their discharge in urban sewerage systems without preliminary treatment, whereas they contain high loads of pharmaceuticals. Betalactams are the most prescribed antibiotics worldwide; they should thus be highly recovered in hospital effluents. There are, however, few reports in the literature addressing the presence of penicillin and cephalosporin in wastewater, mostly from studies performed in Romania, Denmark, France and Spain<sup>12, 13, 22, 23</sup>. Only one study described the presence of a carbapenem (imipenem) and the concentration measured was  $14,420 \pm 390$  ng/ml<sup>13</sup>. Carbapenems are antibiotics exclusively used in the hospitals and considered as the last line of defense against severe infections, with imipenem being the molecule most frequently used (75% in the Clermont-Ferrand hospital, followed by meropenem (14%) and ertapenem (11%) (means of the past 3 years, data not shown). The likelihood of detection in the effluents depends on the compound's initial concentration, its stability and the sensitivity of the testing methods. In our study, the PEC of imipenem was 3.14µg/L and thus passive sampling device allowing collection of molecules over time should enable quantification of imipenem in environmental samples<sup>24</sup>. We were unable to detect the molecule in the effluent (data not shown). In addition, beta-lactams are known to be quite unstable molecules and this property may participate to the failure of their detection in effluents. In this study, we determined the *in vitro* biological effectiveness of an



imipenem solution by measuring diameters of inhibition zones on agar plates made every 6h during 54h with the same antibiotic solution stored at 26°C, which is the average hospital effluent temperature. This instability was not related to low concentrations of the molecule used in the agar test, since 10 times higher concentrations were tested in parallel in a broth medium experiment and the results were similar. Imipenem is thus probably rapidly degraded in non-active metabolites within the effluents, because of the elevated temperature but also because of the alkaline pH, which is known to enhance beta-lactams degradation<sup>25,26</sup>. The instability of imipenem and thus its absence of detection in complex environment might explain why no risk has ever been associated with this molecule. Indeed, pharmaceutical substances are usually assessed with respect to environmental risk based on the hazard quotient (HQ), which is the ratio between the PEC and the highest concentration of the substance without any harmful effect on the environment (PNEC). In our study, the effluent hospital HQ was low (=0.046), thus indicating no potential toxicity for the environment. However, hospital wastewaters contain a variety of toxic and persistent substances that create hazardous mixtures<sup>27,28</sup> and imipenem could contribute to a synergic toxic effect.

Besides pharmaceutical compounds and their residues, the hospital effluents also contain clinical strains from patients' excreta. Therefore, the question of potential selective pressure exerted on local microorganisms by antibiotics, even at sub-MICs, arises. In our study, 22.1% of the viable cells from biofilms formed in the hospital effluent were resistant to imipenem. This high percentage may be explained by the high rate of imipenem resistant clinical isolates detected in hospitalized patients. However, the majority of imipenem resistant clinical isolates were *Enterobacteriaceae*, i.e. *Klebsiella pneumoniae* (66%) and *Escherichia coli* (25%) (INVS) while *Aeromonas* spp and *Pseudomonas* spp were dominant among the environmental imipenem resistant isolates. The use of imipenem to detect carbapenem-resistant strains in this study may have led to an underestimation of the diversity of carbapenem-resistant bacteria. With imipenem, the separation between the intrinsic resistant and the carbapenemase-producers is relatively poor contrary to ertapenem. *Aeromonas* spp and *Pseudomonas* spp are commonly isolated from aquatic systems and are intrinsically resistant to carbapenem due to chromosome-encoded betalactamase production, enabling the hydrolysis of imipenem or meropenem but with poor activity against other betalactams<sup>29-33</sup>. Additionally, impermeability mechanisms have also been described in such environmental strains<sup>34</sup>. However, since they also harbored plasmids with



carbapenemase encoding genes such as *bla*<sub>OXA48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>VIM</sub>, we cannot exclude that these strains acquired mobile genetic elements from clinical strains. Carbapenemase encoding genes have previously been detected in biofilms in rivers or hospital effluents<sup>35</sup>. Indeed, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> have already been detected in *Aeromonas spp* isolated aquatic samples (Hughes 2016, Libissch 2008, Walsh 2011), but to our knowledge, this is the first report of a metalloβ-lactamase (*bla*<sub>NDM</sub>) in *Aeromonadaceae*. In our study, detection of carbapenemase encoding genes was performed by specific PCRs; these preliminary results will be validated and completed by determination of the nucleotide sequences of the amplicons and of their surrounding regions. We will thus be able to determine if these genes are parts of mobile elements such as plasmids, transposons or integrons. Class 1 integrons are the most prevalent ones in multidrug-resistant Gram-negative clinical isolates<sup>36</sup>. Class 2 integrons are less frequent, and few class 3 integrons are found in clinical strain. Class 1 integrons are detected in hospital effluent<sup>14</sup> and in the WWTP influent and effluent<sup>37</sup>. Also, Class 3 integrons are detected in aquatic sample and associated with carbapenemase encoding genes<sup>38,39</sup>. To determine if the carbapenemase encoding genes were harbored by conjugative plasmids, we initiated mating experiments. Despite repeated assays, no imipenem-resistant transconjugant was obtained whatever the wild-type strain tested. It is noteworthy that other groups also failed to get transconjugants directly from wild-type strains harboring carbapenemase encoding conjugative plasmids<sup>40,41</sup> suggesting that conjugation events are probably favored under specific conditions such as biofilm lifestyle<sup>42</sup>. However, imipenem resistant transformants were obtained in an *E. coli* Top10 background after electroporation of plasmid DNA extracts from environmental wild-type strains, and preliminary S1-nuclease PFGE results confirmed the presence of several plasmids (with molecular weight between 48.5Kb and 194Kb) in the transformants. Analysis of their antibiotic resistance phenotype indicated that additional resistances had been co-transferred. The carbapenemase genes are often associated with resistance to other antibiotics (e.g. aminoglycosides, tetracycline, sulfonamides) as a consequence of the co-localization of antibiotic resistance genes in the same plasmids<sup>43,44</sup>. In-depth analysis of the plasmids harbored by the transformants will indicate the degree of mosaic of the replicons and their conjugative characteristics. In addition, the plasmid content of the wild-type strains has still to be determined, which implies the optimization of the S1-nuclease PFGE methodology for strains belonging to environmental species such as *Aeromonas spp*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas spp*. The fact that most of the



antibiotic resistances of the environmental isolates from this study were associated with plasmid DNA is an additional cause of concern because of their potential spreading capacities <sup>45-47</sup>. One carbapenem-resistant clinical ; *Klebsiella pneumoniae blaOXA-48*, strains belonging to the same species as those encountered in the biofilm effluent were isolated in the patients' specimens during this period (data not shown). The survival of clinical strains in such hostile environment is probably compromised, but we can not exclude the occurrence of gene transfer events between the two communities. Indeed, biofilms are privileged places for DNA exchange and may facilitate the flow of antimicrobial resistance determinants between water and commensal gut bacteria <sup>48</sup>. Wastewater would therefore not only constitutes a way of dissemination of antibiotic resistant organisms among human and animal populations, but also the route by which resistance genes are introduced in natural bacterial ecosystem.

### **Acknowledgments**

The authors thank Christophe Portelli and Paul Alain Nana for providing field and laboratory assistance. We are also grateful to Frederic Robin and Chantal Rich for their insightful comments and discussions during this research project. We thank Vincent Pinon for providing the data of medicine consumption.





## References

- 1 ESAC-Net. European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net). Available at <https://ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/esac-net>. Accessed August 5, 2017.
- 2 OMS. OMS | Résistance aux antibiotiques. *WHO* 2016.
- 3 Morakchi H., Loucif L., Gacemi-Kirane D., Rolain J-M. Molecular characterisation of carbapenemases in urban pigeon droppings in France and Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017;**9**:103–10. Doi: 10.1016/j.jgar.2017.02.010.
- 4 Tacão M., Correia A., Henriques IS. Low Prevalence of Carbapenem-Resistant Bacteria in River Water: Resistance Is Mostly Related to Intrinsic Mechanisms. *Microbial Drug Resistance* 2015;**21**(5):497–506. Doi: 10.1089/mdr.2015.0072.
- 5 Tanner WD., VanDerslice JA., Toor D., et al. Development and field evaluation of a method for detecting carbapenem-resistant bacteria in drinking water. *Systematic and Applied Microbiology* 2015;**38**(5):351–7. Doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.010.
- 6 Zurfluh K., Bagutti C., Brodmann P., et al. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase and 16s rRNA methylase producing enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2017. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.017.
- 7 Vaz-Moreira I., Varela AR., Pereira T V., Fochat RC., Manaia CM. Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microbial Drug Resistance* 2016;**22**(2):155–63. Doi: 10.1089/mdr.2015.0118.
- 8 Chagas TPG., Seki LM., da Silva DM., Asensi MD. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *Journal of Hospital Infection* 2011;**77**(3):281. Doi: 10.1016/j.jhin.2010.10.008.
- 9 Chang X., Meyer MT., Liu X., et al. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environmental Pollution* 2010;**158**(5):1444–50. Doi: 10.1016/j.envpol.2009.12.034.
- 10 Längin A., Alexy R., König A., Kümmerer K. Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere* 2009;**75**(3):347–54. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.032.
- 11 Lien LTQ., Hoa NQ., Chuc NTK., et al. Antibiotics in Wastewater of a Rural and an Urban Hospital before and after Wastewater Treatment, and the Relationship with Antibiotic Use-A One Year Study from Vietnam. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2016;**13**(6). Doi: 10.3390/ijerph13060588.
- 12 Gros M., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2013;**1292**:173–88. Doi:



10.1016/j.chroma.2012.12.072.

- 13 Szekeres E., Baricz A., Chiriac CM., et al. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. *Environmental Pollution* 2017;**225**:304–15. Doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.054.
- 14 Le T-H., Ng C., Chen H., et al. Occurrences and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria and Genetic Determinants of Hospital Wastewater in a Tropical Country. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016;**60**(12):7449–56. Doi: 10.1128/AAC.01556-16.
- 15 Deshpande AD., Baheti KG., Chatterjee NR. Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Current Science* 2004:1684–95. Doi: 10.2307/24109765.
- 16 Ory J., Bricheux G., Togola A., et al. Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent. *Environmental Pollution* 2016;**214**:635–45. Doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.033.
- 17 Bengtsson-Palme J., Larsson DGJ. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International* 2016;**86**:140–9. Doi: 10.1016/j.envint.2015.10.015.
- 18 Microbiologie SF de. CA-SFM 2017. Doi: 10.1093/jac/39.6.673.
- 19 Korzeniewska E., Korzeniewska A., Harnisz M. Antibiotic resistant Escherichia coli in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013;**91**:96–102. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.014.
- 20 Osińska A., Harnisz M., Korzeniewska E. Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environmental Science and Pollution Research* 2016;**23**(11):10818–31. Doi: 10.1007/s11356-016-6221-4.
- 21 White L., Hopkins KL., Meunier D., et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in hospital wastewater: a reservoir that may be unrelated to clinical isolates. *Journal of Hospital Infection* 2016;**93**(2):145–51. Doi: 10.1016/j.jhin.2016.03.007.
- 22 Nielsen U., Hastrup C., Klausen MM., et al. Removal of APIs and bacteria from hospital wastewater by MBR plus O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAC or ClO<sub>2</sub>. *Water Science and Technology* 2013;**67**(4). Doi: 10.2166/wst.2012.645.
- 23 Dinh QT., Moreau-Guigon E., Labadie P., et al. Occurrence of antibiotics in rural catchments. *Chemosphere* 2017;**168**:483–90. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.106.
- 24 Liu Y., Liu J., Li X., Zhao K., Zhang P., Ding S. Determination of Meropenem and Ertapenem in Lagoon Water, Bedding Soil, and Silage by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Letters* 2017;**50**(9):1387–96. Doi: 10.1080/00032719.2016.1226322.
- 25 Smith GB., Dezeny GC., Douglas AW., et al. Stability and Kinetics of Degradation of Imipenem in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990;**79**(8):732–40.



Doi: 10.1002/jps.2600790816.

- 26 Hassan N., Abdel-Moety E. Stability-indicating determination of meropenem in presence of its degradation product n.d.
- 27 Boillot C., Bazin C., Tissot-Guerraz F., et al. Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Science of The Total Environment* 2008;**403**(1–3):113–29. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.04.037.
- 28 Gautam AK., Kumar S., Sabumon PC. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *Journal of Environmental Management* 2007;**83**(3):298–306. Doi: 10.1016/j.jenvman.2006.03.009.
- 29 Rasmussen BA., Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;**41**(2):223–32. Doi: 0066-4804/97/\$04.00 0.
- 30 Rossolini GM., Walsh, Timothy amicosante G. The Aeromonas Metallo- $\beta$ -Lactamases: Genetics, Enzymology, and Contribution to Drug Resistance. *Microbial Drug Resistance* 1996;**2**(2):245–52. Doi: 10.1089/mdr.1996.2.245.
- 31 Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2008;**21**(4):367–71. Doi: 10.1097/QCO.0b013e328303670b.
- 32 Stunt R., Thomson CJ., Payne DJ., Amyes SG. A study of the mechanisms involved in imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;**42**(2):272–3. Doi: 10.1093/jac/42.2.272.
- 33 Ko WC., Wu HM., Chang TC., Yan JJ., Wu JJ. Inducible beta-lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;**36**(11):3188–92.
- 34 Yordanov D., Strateva T. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* 2009;**58**(9):1133–48. Doi: 10.1099/jmm.0.009142-0.
- 35 Subirats J., Royo E., Balcázar JL., Borrego CM. Real-time PCR assays for the detection and quantification of carbapenemase genes (bla KPC, bla NDM, and bla OXA-48) in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research* 2017. Doi: 10.1007/s11356-017-8426-6.
- 36 Cambray, G., Guerout, A-M., Mazel D. Integrons. *Annual Review of Genetics* 2010;**44**(1):141–66. Doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163504.
- 37 Zhang X-X., Zhang T., Zhang M., Fang HHP., Cheng S-P. Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009;**82**(6):1169–77. Doi: 10.1007/s00253-009-1886-y.
- 38 Xu H., Davies J., Miao V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *Journal of Bacteriology* 2007;**189**(17):6276–83. Doi: 10.1128/JB.00348-07.
- 39 Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*



1995;**39**(7):1612–5.

- 40 Kieffer N., Poirel L., Bessa LJ., Barbosa-Vasconcelos A., da Costa PM., Nordmann P. VIM-1, VIM-34, and IMP-8 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Strains Recovered from a Portuguese River. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016;**60**(4):2585–6. Doi: 10.1128/AAC.02632-15.
- 41 Ramoul A., Loucif L., Bakour S., Amiri S., Dekhil M., Rolain J-M. Co-occurrence of bla NDM-1 with bla OXA-23 or bla OXA-58 in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2016;**6**:136–41. Doi: 10.1016/j.jgar.2016.05.003.
- 42 Savage VJ., Chopra I., O’Neill AJ. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;**57**(4):1968–70. Doi: 10.1128/AAC.02008-12.
- 43 Xie L., Dou Y., Zhou K., et al. Coexistence of blaOXA-48 and Truncated blaNDM-1 on Different Plasmids in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate in China. *Frontiers in Microbiology* 2017;**8**. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00133.
- 44 Samuelsen O., Naseer U., Tofteland S., et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009;**63**(4):654–8. Doi: 10.1093/jac/dkp018.
- 45 Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1995;**8**(4):557–84. Doi: Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance.
- 46 Livermore DM. Acquired carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997;**39**(6):673–6. Doi: 10.1093/jac/39.6.673.
- 47 Queenan AM., Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007;**20**(3):440–58. Doi: 10.1128/CMR.00001-07.
- 48 Carnelli A., Mauri F., Demarta A. Characterization of genetic determinants involved in antibiotic resistance in *Aeromonas* spp. and fecal coliforms isolated from different aquatic environments. *Research in Microbiology* 2017;**168**(5):461–71. Doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.006.
- 49 Monteiro J., Widen RH., Pignatari ACC., Kubasek C., Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012;**67**(4):906–9. Doi: 10.1093/jac/dkr563.
- 50 Poirel L., Walsh TR., Cuvillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011;**70**(1):119–23. Doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
- 51 Moura A., Henriques I., Ribeiro R., Correia A. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;**60**(6):1243–50. Doi: 10.1093/jac/dkm340.





- 52 Mazel D., Dychinco B., Webb VA., Davies J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;**44**(6):1568–74.



**Table 1:** Oligonucleotides used in this study

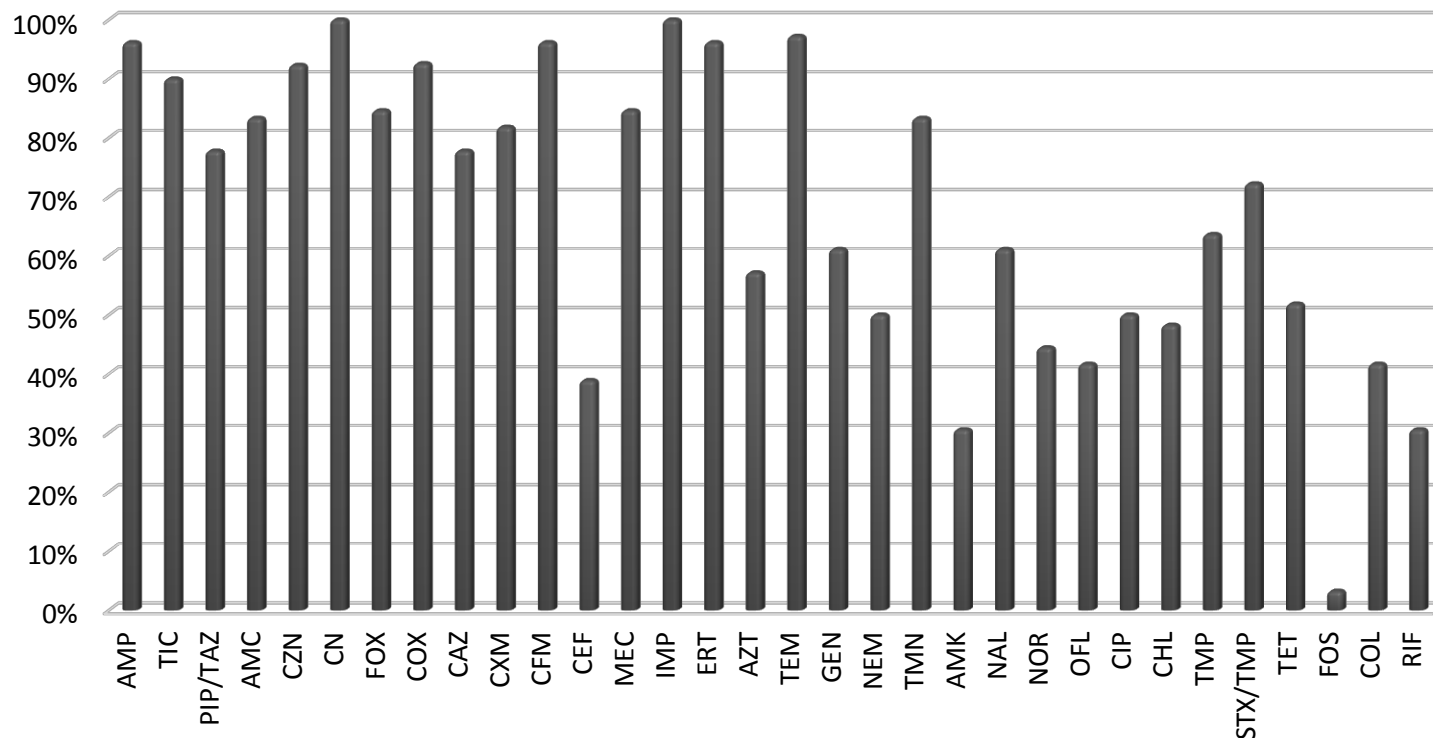
	<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'–3')</b>	<b>Size</b>	<b>Reference</b>	
<b>Carbapenemases</b>	<i>bla</i> KPC	KPC-F	TCGCTAAACTCGAACAGG	785	49
		KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCCA ATCC		
	<i>bla</i> NDM	NDM-F	TTGGCCTTGCTGTCCTTG	82	49
		NDM-R	ACACCAGTGACAATATCACC G		
	<i>bla</i> GES	GES-F	CTATTACTGGCAGGGATCG	594	49
		GES-R	CCTCTCAATGGTGTGGGT		
	<i>bla</i> VIM	VIM-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	49
		VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATA G		
	<i>bla</i> OXA-48	OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	437	50
		bis OXA-R bis	CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG		
<b>Integrans</b>	<i>int1</i>	int1-MF	CCT CCC GCA CGA TGA TC	280	51
		int1-MR	TCC ACG CAT CGT CAG GC		
	<i>int2</i>	Int2-GF	GTA GCA AAC GAG TGA CGA	788	52
		Int2-GR	AAT G CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T		
	<i>int3</i>	Int3-GF	GCC TCC GGC AGC GAC TTT	979	52
		Int3-GR	CAG ACG GAT CTG CCA AAC CTG ACT		



**Table 2:** Predicted Environmental Concentration (PEC), Predicted No-Effect Concentrations (PNEC) and determination of the Hazard quotient (HQ) for Imipenem (IMP)

		<b>Values</b>	<b>Standard Deviation</b>
<b>Quantity</b> <b>(µg)</b>	q = Quantity consumed	$7.6 \cdot 10^{+07}$	
	Q = Quantity of unchanged drug eliminated by organism	$5.7 \cdot 10^{+07}$	$3.8 \cdot 10^{+06}$
<b>Concentration</b> <b>(µg/L)</b>	PEC <sub>hospital</sub>	3.61	0,24
	PNEC	78	
	HQ <sub>POCIS</sub> = PEC <sub>hospital</sub> / PNEC	0.046	0.003

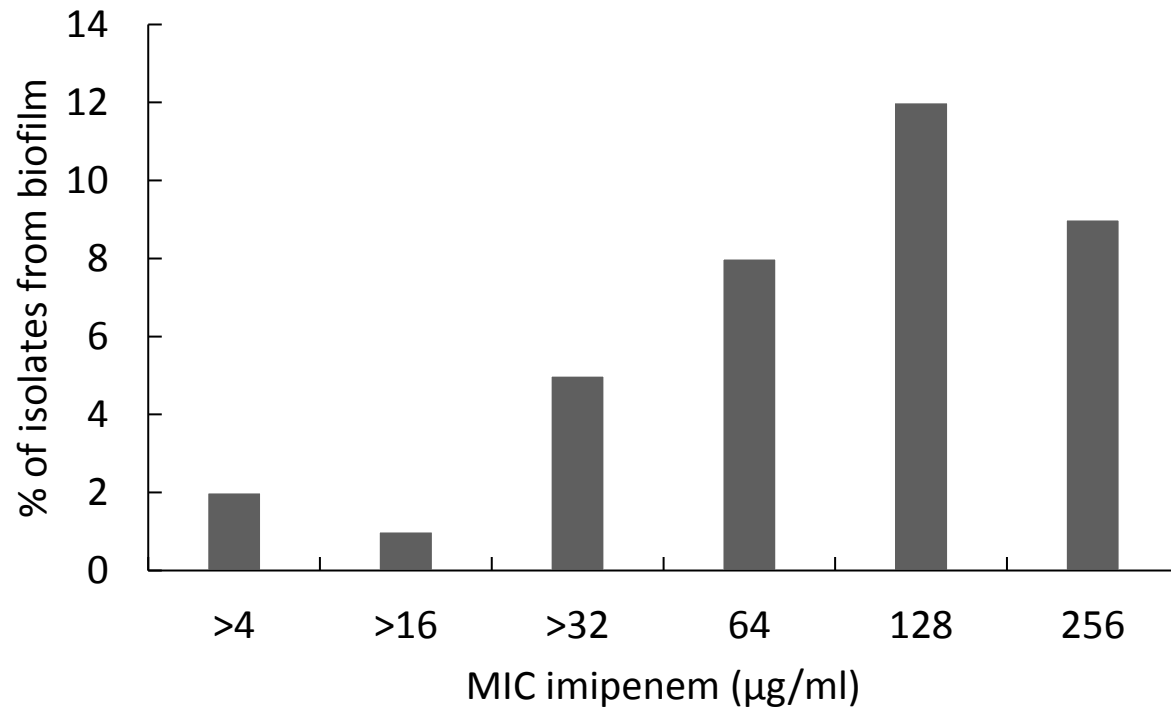




**Figure 1:** Antibiotic resistant profiles of isolates from biofilm suspension selected on imipenem medium (resistance up to 8 $\mu$ g/ml). Results are expressed as the percentage of strains resistant to ampicillin (AMP), ticarcillin (TIC), piperacillin/tazobactam (PIP/TAZ), amoxicillin-clavulanic acid (AMC), ceftazidime (CZN), cefalexin (CN), ceftazidime (FOX), cefotaxim (COX), ceftazidim (CAZ), cefuroxim (CXM), cefixim (FIX), mecillinam (MEC), cefepim (CFM), aztreonam (ATM), imipenem (IMP), ertapenem (ETP), temocillin (TEM), gentamicin (GEN), netilmicin (NEM), tobramycin (TMN), amikacin (AMK), nalidixic acid (NAL), norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFL), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CHL), trimethoprim (TMP), Trimethoprim and sulfamethoxazole (STX/TMP), fosfomycin (FOS), colistin (COL), rifampicin (RIF)

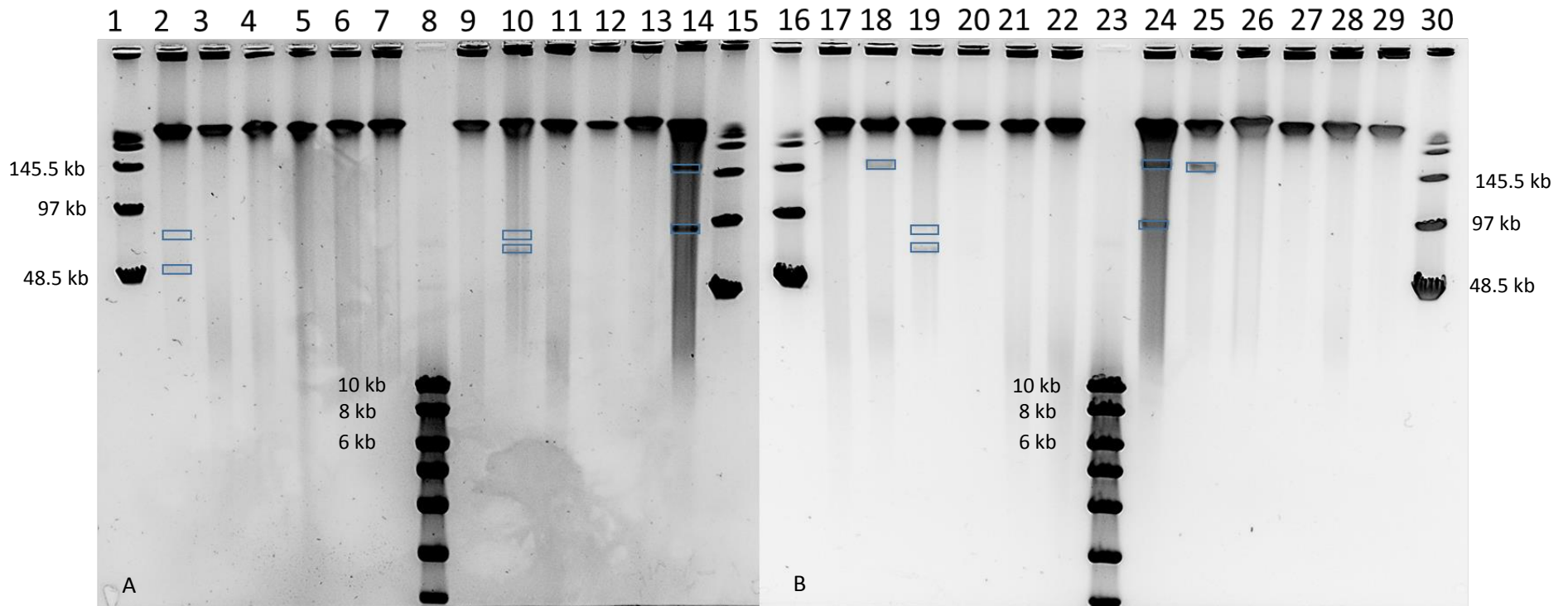






**Figure 2:** Distribution of the imipenem MIC's among the effluent biofilm isolates initially selected on agar plate containing  $8\mu\text{g/ml}$  of imipenem





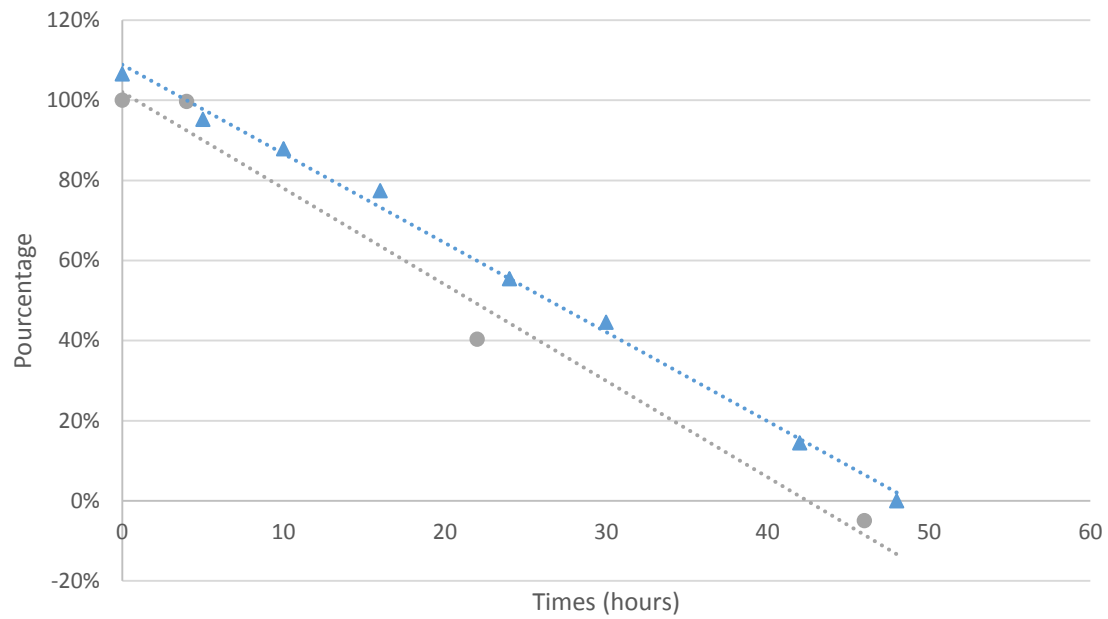
**Figure 3 A and 3 B:** PFGE of S1 nuclease-digested total DNA from wild-type strains and their transformants. Lanes 2, *Aeromonas hydrophila/caviae* i52 and lanes 3 and 4: 2 of its transformants; lane 5: *Pseudomonas sp* i2 and lanes 6 and 7: 2 of its transformants; lane 9: *Aeromonas hydrophila/caviae* i9 and lanes 10 and 11: 2 of its transformants; lane 13,; *Aeromonas hydrophila/caviae* i10 and lanes 14 and 15: 2 of its transformants; lane 17: *Pseudomonas oleovorans/mendocina* i13 and lanes 18 and 19 : 2 of its transformants, lane 20: *Stenotrophomonas maltophilia* i47 and lanes 21 and 22: 2 of its transformants, lane 24: *Aeromonas sobria/hydrophila* i7 and lanes 25 and 26: 2 transformants Lane 27: *Aeromonas hydrophila/caviae/sobria* i51 and lanes 28 and 29: 2 of its transformants . Lanes 1, 15, 16, and 30: DNA ladder (concatemers of 48.5kb) and lanes 8 and 23: DNA Small ladder (concatemers from 0.2kb to 10kb)





**Figure 4:** Pictures of the agar diffusion tests performed in triplicate (IMP1, IMP2 and IMP3) with imipenem solution at  $10\mu\text{g/ml}$  stored at  $26^\circ\text{C}$  for different lengths of time ( $T=0\text{h}$ ,  $T=30\text{h}$  and  $T=48\text{h}$ ). The negative (T-) and positive (T+) controls consisted in paper discs impregnated with saline and commercial imipenem disks ( $10\mu\text{g}$ ).





**Figure 5:** Stability and kinetics of degradation of imipenem at 26°C (● agar diffusion test and ▲ broth diffusion test)





	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF
2	0	24	8	0	0	0	20	0	0	30	0	0	28	0	0	0	0	14	0	20	8	18	15	0	0	30	22	23
2t1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	27	30	28	29	33	31	36	33	24	20	42	13	19	35
2t2	0	8	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	10*	0	25	25	21	25	32	30	30	30	28	14	40	30	20	32

	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	18	28	0	14	20	0	20	20	36	35	40	8	0	0	8	20	15
7t1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	12	22	8	23	40	46	46	48	9	0	0	9	21	21
7t2	0	0	0	0	0	9	0	0	0	23	19	21	23*	0	27	30	28	29	33	31	36	33	24	20	42	13	19	35
7t3	0	14	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	10*	0	22	20	22	22	33	24	28	34	24	9	12	21	22	28
7t4	0	11	0	0	0	9	0	0	0	28	24	25	28	0	10	11	0	23	44	49	48	50	9	0	0	12	22	24

	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF
9	0	0	8	0	0	0	0	0	0	20	15	12	20	0	30	18	8	18	18	25	20	25	8	0	0	8	19	15
9t1	0	24	0	40	31	42	22	40	26	41	23	0	18	0	12	22	8	23	40	46	46	48	9	0	0	9	21	21
9t2	0	0	0	0	0	9	0	0	0	23	19	21	23*	0	24	28	22	26	33	34	37	40	32	32	32	44	23	23

	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	18	0
10t1	0	24	0	40	31	42	22	40	26	41	23	0	18	0	24	28	22	26	33	34	37	40	32	32	32	44	23	23	
10t2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0*	0	27	30	28	29	33	31	36	33	24	20	42	13	19	35	
10t3	0	10	0	0	0	0	0	0	0	22	25	22	30	0	0	0	0	0	40	50	50	50	40	50	44	30	25	20	
10t4	0	15	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20	10*	0	30	30	20	30	40	40	44	50	34	36	32	40	28	25	

	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF
13	0	22	8	0	0	0	15	0	0	30	0	0	30	0	10	8	8	21	8	25	16	25	/	0	15	30	20	22
13t1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0*	0	27	30	28	29	33	31	36	33	24	20	42	13	19	35
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0*	0	27	30	28	29	33	31	36	33	24	20	42	13	19	35
13t3	0	20	10	0	0	0	0	0	0	17	0	0	12*	0	30	30	30	25	40	30	40	30	26	10	44	20	22	30



	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF
51	0	17	13	0	0	0	0	0	0	9	9	8	8	0	22	19	12	8	19	0	8	0	0	0	0	0	20	0
51t1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0*	0	0	27	30	28	29	33	31	36	33	24	20	42	13	19	35
51t2	0	24	0	40	31	42	22	40	26	41	23	0*	18	0	24	28	22	26	33	34	37	40	32	32	32	44	23	23
	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF
52	0	17	12	0	0	0	0	0	0	10	10	9	8	0	15	19	11	8	19	0	7	0	10	0	0	0	19	0
52t1	0	0		0	0	0	0	0	0	11	0	0*	0	0	27	30	28	29	33	31	36	33	24	20	42	13	19	35
	TIC	PPT	AMC	CXN	FOX	COX	CZD	CXM	FIX	FEP	IMP	ETP	ATM	TEM	GEN	NEM	TMN	AMK	NAL	NOR	OFL	CIP	CHL	TMP	STX/TMP	TET	COL	RIF
47	18	22	9	0	0	0	18	0	0	17	0	10	0	0	0	34	24	26	34	22	30	28	30	0	34	28	25	32
47t1	0	24	0	40	31	42	22	40	26	41	23	0*	18	0	24	28	22	26	33	34	37	40	32	32	32	44	23	23

Supplementary figure 1 : Phenotypic resistances of environmental strains (2,7,9,10,13,51,52 and 47) and their transformants (2t1,2t2...) to antibiotics : ampicillin (AMP, 10 µg), ticarcillin (TIC,75 µg) piperacillin/tazobactam (PTZ, 85µg), piperacillin+tazobactam (PTZ, 30-6 µg), Amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 20-10 µg), cephazolin (CZN, 30 µg), cefalexin (CN, 30 µg), cefoxitin (FOX, 30 µg), cefotaxim (COX, 5 µg), ceftazidim (CZD,10 µg), cefuroxim (CXN, 30 µg), cefixim (FIX, 5 µg), cefepim (FEP, 30 µg), mecillinam (MEC, 10 µg), imipenem (IMP, 10 µg), ertapenem (ETP, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), temocillin (TEM, 30 µg), gentamicin (GMN, 10 µg), netilmicin (NTM, 10 µg), tobramycin (TMN, 10 µg), amikacin (AMK, 30 µg), nalidixic acid (NAL, 30 µg), norfloxacin (NXN, 10 µg), ofloxacin (OFX, 5 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), chloramphenicol (CHL, 30 µg), trimethoprim (TMP, 5 µg), Trimethoprim and sulfamethoxazole (STX/TMP, 25 µg), tetracylin (TET,30 µg), fosfomycin (FOS, 200 µg), colistin (COL, 50 µg), rifampicin (RIF,30 µg). In according to the inhibition zone value, the color red indicate a resistance, the yellow color indicate an intermediary resistance and green a sensibility to antibiotics.



## Commentaire Article 2

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur la détection des souches productrices de carbapénémases et la présence de carbapénèmes (imipénème) dans les effluents hospitaliers.

Bien que très consommées au niveau hospitalier les bêtalactamines ne font pas partie des antibiotiques les plus recherchés et détectés dans les effluents hospitaliers. La détection et la quantification de l'imipénème n'ont pu être effectuées dans les effluents hospitaliers. En effet, à partir des données de consommation de l'hôpital, nous avons évalué la quantité d'imipénème potentiellement présente dans les effluents hospitaliers à 3.14 µg/L sur la période d'échantillonnage. Les limites de détection des techniques actuelles sont trop élevées pour mesurer cette concentration de manière ponctuelle. L'échantillonnage passif serait une solution afin d'évaluer la concentration d'imipénème sur 15 jours par exemple mais la stabilité de l'imipénème est trop faible et diminue également la capacité de le détecter dans les eaux usées (Smith *et al.*, 1990). Cependant, des auteurs ont très récemment réussi à détecter, pour la première fois à notre connaissance, la présence d'imipénème dans des effluents hospitaliers. La concentration mesurée était de 14.42 µg/L (Szekeres *et al.*, 2017) ce qui suggère une utilisation très intense de l'imipénème dans l'hôpital étudié. A défaut de pouvoir le doser, nous nous sommes intéressés à la stabilité de l'imipénème *in vitro* dans des conditions environnementales. Son activité biologique a été estimée à 46 heures. Cependant, en conditions environnementales réelles, la dégradation peut s'accélérer notamment à des pH alcalins ou sous l'action des rayons UV (Smith *et al.*, 1990; Zaccardelli *et al.*, 1990; Takeuchi *et al.*, 1995; Mendez *et al.*, 2006; Cielecka-Piontek, Zając and Jelińska, 2008; Cielecka-Piontek *et al.*, 2011). Dans nos travaux en plus d'une température à 26°C, (température moyenne des effluents hospitaliers), la conservation de la solution d'imipénème à un pH=8 aurait permis de se rapprocher davantage des conditions environnementales des effluents hospitaliers.

En dépit de la faible stabilité chimique de l'imipénème, toutes les bactéries du biofilm sont potentiellement en contact dans les effluents hospitaliers avec des concentrations sub-CMI de l'imipénème. La pression de sélection sur les microorganismes peut notamment être traduite par l'évaluation d'un risque de sélection de la résistance. On constate alors que la PNEC (=0.125 µg/L) est inférieure à la PEC de l'imipénème évaluée de 3.14 µg/L. Un risque de sélection de bactérie résistante à l'imipénème existe réellement (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016). Par contre, le risque écotoxicologique de l'imipénème au niveau des effluents hospitaliers est minimal (HQ<1). Les tests écotoxicologiques réalisés sur *Tetrahymena pyriformis* confirment ce résultat.



L'imipénème n'a aucun effet sur le temps de génération de *T. pyriformis* jusqu'à des concentrations de 500mg/L.

A partir de la suspension du biofilm, 38 isolats bactériens ont été sélectionnés sur milieu sélectif (imipénème 8 µg/L), majoritairement des *Aeromonas spp* et *Pseudomonas spp*. Aucune entérobactérie n'a été identifiée alors que les biofilms des effluents hospitaliers sont constitués majoritairement d'entérobactéries (Schwartz *et al.*, 2003). Les mêmes constatations ont été faites dans nos précédents travaux. Cependant le nombre d'isolats n'est pas assez élevé pour conclure à une absence d'entérobactérie résistante à l'imipénème dans le biofilm étudié, comme nous le suggère l'analyse des biofilms par cytométrie en flux où seulement 0.259% des bactéries ont été cultivées. Par ailleurs, Banning et Mee ont démontré que, sous certaines conditions, un biofilm mixte peut limiter la survie de bactéries entériques pathogènes introduites dans les eaux brutes (Banning, Toze and Mee, 2003). Les effluents hospitaliers peuvent également être hostiles à certaines bactéries par la présence de détergent et désinfectant à haute concentration. Le choix de l'imipénème comme antibiotique de sélection de bactéries porteuses de carbapénèmases peut sembler discutable. Sur le plan de la diversité des souches résistantes sélectionnées l'ertapénème aurait été un meilleur choix par son spectre d'action. Cependant l'imipénème a été choisi, parmi les carbapénèmes car il s'agit de l'antibiotique le plus consommé à l'hôpital et donc le plus en contact avec la communauté microbienne.

Ces souches provenant de biofilm devraient montrer des capacités à former un biofilm. Il serait donc intéressant de mesurer la capacité de ces 38 souches à produire du biofilm.

La détection des gènes codant pour les carbapénèmases *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* et *bla<sub>GES</sub>* par multiplex PCR a été délicate. L'identification de ces gènes de résistances s'est donc effectuée par PCR simplex. Plusieurs souches ont été identifiées comme porteuses de carbapénèmases *bla<sub>VIM</sub>* (2 souches), *bla<sub>NDM</sub>* (1 souche) et *bla<sub>OXA48</sub>* (1 souche) une confirmation de ce résultat sera effectuée par séquençage. Nous pourrons alors déterminer si les gènes sont présents sur des éléments mobiles comme les plasmides, les transposons ou intégrons.

L'absence des carbapénèmases recherchées dans certaines souches fait suspecter la présence d'autres carbapénèmases (NEM, IMP...) ou bien de BLSE ou de céphalosporinases. Ces mécanismes de résistance peuvent d'ailleurs être associés à d'autres mécanismes de résistances aux carbapénèmes comme les pompes à efflux.





Les intégrons de classe 1 sont présent majoritairement dans nos isolats. Ces intégrons de classe 1 sont fréquemment retrouvés dans les isolats cliniques (Van Essen-Zandbergen *et al.*, 2007; Zhao and Hu, 2014), mais aussi dans les effluents hospitaliers (Le *et al.*, 2016a) et en entrée ou en sortie de station d'épuration (Zhang *et al.*, 2009). Ces intégrons de classe 1 sont considérés comme des réservoirs de gène de résistances (Mooij *et al.*, 2009). Des intégrons de classe 3, ont été aussi retrouvés dans le compartiment aquatique associés à des gènes codant pour des carbapénèmases (Arakawa *et al.*, 1995; Xu, Davies and Miao, 2007).

Pour déterminer si les gènes codant pour les carbapénèmases sont présents sur des plasmides, des expériences de conjugaison ont été réalisées. Après plusieurs essais, aucun transconjugant n'a été obtenu quel que soit la souche sauvage testée. D'autres équipes ont rencontré ces mêmes difficultés (Kieffer, Poirel, Lucinda J. Bessa, *et al.*, 2016; Ramoul *et al.*, 2016), suggérant que les évènements de conjugaisons demandent des conditions spécifiques telle que la forme biofilm (Savage, Chopra and O'Neill, 2013). Pour contourner ce problème, des transformations ont été effectuées sur 8 de nos souches sauvages, sélectionnées selon leurs phénotypes de résistances et leurs gènes de carbapénèmases. Les transferts du ou des plasmides ont fonctionné dans *E. coli* Top10. Prochainement, la présence de gène codant pour les carbapénèmases sera confirmée par PCR. Le phénotype de résistances des transformants a alors été contrôlé par des antibiogrammes et comparé aux souches initiales. Ces antibiogrammes montrent que les plasmides sont porteurs de résistances à d'autres familles antibiotiques que les bêtalactamines tels que les aminoglycosides, tétracycline et sulfamides. Une électrophorèse en champs pulsé associée à une nucléase S1 a été réalisée sur des transformants et les souches initiales, pour confirmer la présence de plusieurs plasmides et en évaluer les tailles. Des plasmides ont été mis en évidence dans les souches sauvages et les transformants avec des tailles estimées entre 48.5Kb et 194Kb. Il est à noter que plusieurs plasmides issus de souches sauvages possèdent des tailles similaires. Cette méthodologie de la PFGE S1-nuclease doit cependant être optimisée pour les souches sauvages d'*Aeromonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Pseudomonas spp.* A partir du gel de PFGE, les plasmides porteurs des gènes de carbapénèmases pourraient être identifiés par hybridation spécifique. De plus, afin de connaître le pouvoir conjugatif de ces plasmides, une conjugaison entre des transformants et un *E. coli* J53 sera réalisée.



Le fait que la plupart de ces résistances dans des isolats environnementaux soient associées à des plasmides confirme leurs potentielles capacités de diffusion (Livermore, 1995; A. M. Queenan and Bush, 2007).

Simultanément à la période d'échantillonnage des effluents, un seul isolat clinique résistant aux carbapénèmes et porteur d'un gène *bla<sub>OXA-48</sub>* a été identifié. Il serait intéressant de comparer génétiquement le plasmide de cette souche avec l'isolat environnemental porteur du gène *bla<sub>OXA-48</sub>*. Une première analyse par électrophorèse en champs pulsé-S1nucléase de l'isolat environnemental et de l'isolat clinique suivie d'une hybridation spécifique du gène *bla<sub>OXA-48</sub>* permettrait de comparer les plasmides (taille, nombre de plasmides et présence de *bla<sub>OXA-48</sub>*).



Discussion  
&  
Perspectives



Ces travaux ont été conduits dans le but d'évaluer l'impact environnemental du contenu pharmaceutique (antibiotiques) d'un effluent hospitalier et la composition de ses communautés bactériennes. La connaissance des résidus pharmaceutiques dans les effluents hospitaliers est essentielle afin d'identifier leur risque environnemental dans le but de préserver la qualité des eaux réceptrices. Au préalable, il nous est apparu essentiel de déterminer les paramètres physico-chimiques des effluents étudiés car la biodisponibilité et la toxicité des molécules peuvent être influencées par les conditions environnementales. Les variations de tous les paramètres mesurés dans notre étude ont été faibles, indiquant une régularité des critères étudiés relatifs aux effluents durant la période d'échantillonnage. De plus, les concentrations mesurées ont été équivalentes à celles décrites dans les effluents hospitaliers (Clotilde Boillot, 2008; P Verlicchi *et al.*, 2012; Verlicchi, Al Aukidy and Zambello, 2015) excepté pour deux éléments, PO<sub>4</sub><sup>-</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, plus élevées dans nos effluents. L'utilisation d'antirouille pour les conduites d'eaux contenant des molécules de phosphates pourrait partiellement expliquer cette discordance. Les bêtalactamines sont les antibiotiques les plus consommés au CHU de Clermont-Ferrand représentant 64.30% de la totalité des antibiotiques prescrits par an (moyenne sur les trois dernières années) suivi des fluoroquinolones avec 9.65% de la totalité des antibiotiques prescrits par an (moyenne sur les trois dernières années). Ce sont deux familles d'antibiotiques communément utilisés à l'hôpital en raison de leur activité-bactéricide à large spectre. Nos travaux se sont focalisés sur la détection de ces deux familles d'antibiotiques, les bêtalactamines (carbapénèmes) et les fluoroquinolones. Les carbapénèmes sont exclusivement utilisés à l'hôpital et sont considérés comme la dernière ligne de défense contre les infections sévères multirésistantes, l'imipénème étant la molécule la plus prescrite (75% à Clermont-Ferrand) suivi du méropénème (14%) et de l'ertapénème (11%) (moyenne sur les 3 dernières années). En raison de leurs fortes consommations, les bêtalactamines devraient être retrouvées très fréquemment dans les effluents hospitaliers. Mais seules quelques études ont révélé la présence de pénicillines ou de céphalosporines, en Roumanie, Danemark, France et Espagne (Gros, Rodríguez-Mozaz and Barceló, 2013; Nielsen *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013; Dinh *et al.*, 2017; Szekeres *et al.*, 2017). A contrario, les fluoroquinolones sont les antibiotiques les plus fréquemment retrouvés dans les effluents hospitaliers (Al-Ahmad, Daschner and Kümmerer, 1999; Escudero-Oñate *et al.*, 2017).

La stratégie d'échantillonnage des eaux des effluents hospitaliers est complexe et doit prendre en compte la fluctuation des molécules et le débit des effluents hospitaliers, comme l'a mis en





évidence Boillot (Boillot et al. 2008). L'utilisation d'échantillonneurs passifs est efficace, en permettant une accumulation des molécules présentes dans le compartiment aquatique malgré les fluctuations de concentration. L'utilisation de cet appareil peut malgré tout être influencée par certains paramètres telles la température, la pression et les concentrations de molécules cibles (Bailly et al., 2013; Vrana et al., 2006; Zenobio et al., 2014).

Dans ce travail, les antibiotiques détectés à partir de l'échantillonnage passif appartiennent à plusieurs familles : les bêtalactamines (ampicilline), les macrolides et apparentés (azithromycine, clarithromycine, érythromycine, lincomycine et roxithromycine), triméthoprime et synergistines (virginiamycine), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, norfloxacine et ofloxacine) (données non montrées). La concentration des fluoroquinolones déterminée par les POCIS était de  $2.08 \pm 0.88$  µg/L pour la ciprofloxacine,  $6.43 \pm 0.56$  pour la norfloxacine et  $101.06 \pm 18.47$  pour l'ofloxacine, définissant les MEC de ces molécules. La pertinence de l'utilisation des POCIS est démontrée car en cas d'échantillonnage ponctuel la concentration de ces molécules aurait été sous la limite de détection. Par contre, les POCIS adsorbant les molécules polaires sur une période de temps, la stabilité des molécules doit être prise en compte dans leur détection. Malgré tout, les bêtalactamines, notamment les carbapénèmes, n'ont pas été détectées dans les effluents hospitaliers de cette étude. Cette non-détection doit être liée à l'instabilité des bêtalactamines dans les environnements aqueux tels que les effluents hospitaliers. En effet, les bêtalactamines s'hydrolysent rapidement en milieu aquatique (Längin *et al.*, 2009). La stabilité biologique de l'imipénème et donc probablement sa stabilité chimique a été évaluée à 46 heures, ce qui pourrait expliquer la non-détection de cet antibiotique dans les eaux usées au bout de 15 jours d'exposition. Un autre postulat serait qu'une forte concentration de bactéries ayant la capacité d'hydrolyser les carbapénèmes dans les effluents hospitaliers, pourrait contribuer à la dégradation de ces molécules. Mais nos résultats ne sont pas en faveur d'une telle hypothèse.

Dans la seule étude à notre connaissance ayant rapporté la présence d'imipénème dans les effluents hospitaliers, la concentration mesurée est de  $14,42 \pm 0.39$  µg/ml, soit assez élevée et ceci d'autant plus qu'il s'agissait d'un hôpital de petite taille (453 lits). Une consommation importante d'imipénème dans cet hôpital (non connue) pourrait expliquer une telle concentration dans les eaux usées. Une forte concentration en céphalosporine de 4ème génération (céfèpime) a aussi été détectée dans les effluents hospitaliers dans cette même étude. Un lien avec les niveaux de



consommation paraît là aussi assez probable car les données de l'ECDC montrent que la Roumanie est le 2<sup>ème</sup> plus gros consommateur d'antibiotiques systémiques après la Grèce.

A l'opposé, les données sur les mesures des fluoroquinolones dans les effluents hospitaliers sont nombreuses, les valeurs dépendant du nombre de patients, de l'activité hospitalière, de la situation géographique de l'établissement (zone tropicale, zone tempérée...) et des pratiques de prescription des médecins (1.6–24.8 µg/L avec une moyenne de 21 µg/L) (Duong et al., 2008; Van Doorslaer et al., 2014; Verlicchi et al., 2012). Contrairement aux bêta-lactamines, les fluoroquinolones ont une stabilité élevée dans le compartiment aquatique (Amorim *et al.*, 2014). La concentration de ciprofloxacine détectée dans notre étude fait partie des plus basses valeurs comparées aux autres études. Cela pourrait être dû à l'utilisation parcimonieuse de cette molécule dans notre établissement dans le cadre d'une politique d'épargne des quinolones, où la ciprofloxacine représente seulement 1.7% de la totalité des antibiotiques prescrits.

Les données de consommation des fluoroquinolones et des carbapénèmes collectées pendant notre étude ont permis de déterminer leurs concentrations prédites environnementales. Pour les fluoroquinolones, nous avons pu calculer le ratio PEC/MEC de chacune de ces molécules : ciprofloxacine 2.81, norfloxacine 0.54 et ofloxacine 0.11. Un exemple de cette différence entre les valeurs de la PEC et la MEC peut être due à des effets combinés entre une rétention partielle de molécules dans les fèces et la consommation réelle de ces molécules par les patients. Les ratios obtenus sont acceptables pour la ciprofloxacine et la norfloxacine et, bien que ces informations soient habituellement difficiles à obtenir et à calculer, les valeurs de la PEC pourraient être utilisées pour évaluer le risque écologique de ces molécules. Par contre, pour l'ofloxacine, le ratio est relativement élevé, remarquable dans d'autres études (Verlicchi, 2016).

Pour chaque substance pharmaceutique, il est possible d'évaluer le risque environnemental en calculant le Hazard quotient (HQ), qui est le ratio entre la MEC et la plus haute concentration de substances n'ayant pas d'effet sur l'environnement (PNEC). Lorsque la MEC n'est pas mesurable, il est admis d'utiliser la PEC estimée à l'aide des consommations d'antibiotiques comme dans notre étude. Dans nos travaux, le risque environnemental des fluoroquinolones varie selon les molécules : modéré pour la ciprofloxacine (=2.08), faible pour la norfloxacine (=0.32), et de modéré à élevé pour l'ofloxacine selon la prise en compte de la PEC ou la MEC (3.6 versus 202.13). Ces antibiotiques exposent l'environnement à un potentiel risque toxique. Un risque élevé (HQ>1) a été préalablement décrit pour la ciprofloxacine dans les effluents hospitaliers (Daouk *et al.*, 2016)(



et al., 2016; Helwig et al., 2015) et à des niveaux plus élevés dans les réacteurs à boues activées (Halling-Sorensen *et al.*, 2000). Pour les carbapénèmes, le risque environnemental calculé à l'aide de la PEC dans notre étude est considéré comme minimal (=0.043).

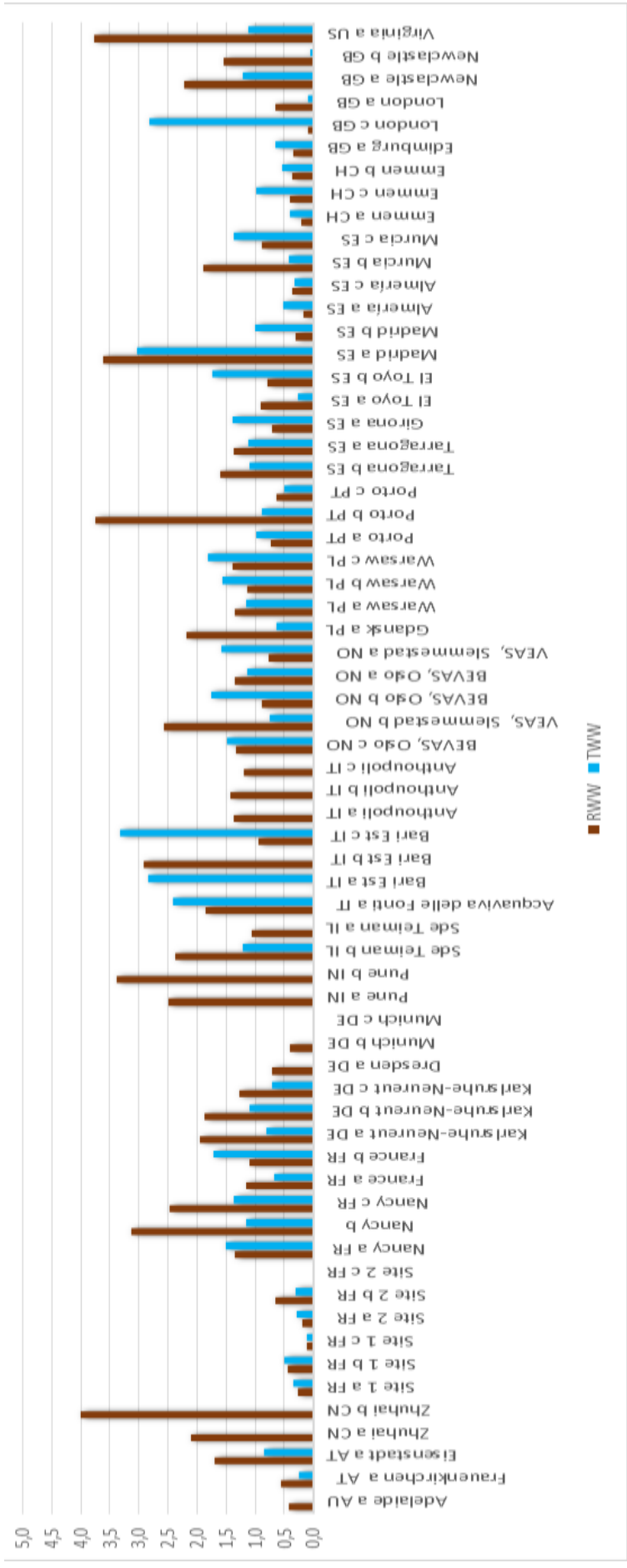
Cependant, la présence d'antibiotiques à large spectre dans les effluents hospitaliers nous interroge sur une potentielle pression de sélection exercée sur les microorganismes locaux. Récemment, Bengtson a proposé une PNEC spécifique permettant d'évaluer le pouvoir de sélection des antibiotiques sur les bactéries présentes dans l'environnement (Bengtson et al, 2016). En se basant sur les concentrations estimées ou mesurées dans notre étude, les fluoroquinolones et les carbapénèmes ont un pouvoir de sélection de résistance sur les microorganismes des effluents (MEC ou PEC >PNEC). Néanmoins pour évaluer l'impact des antibiotiques sur les communautés bactériennes agrégées sous forme de biofilms comme c'est le cas en milieu aquatique, il faudrait se baser non pas sur les CMI mais sur les Concentrations Minimales d'éradication du biofilm (MBEC). Il est généralement admis que les MBEC sont 10 à 1000 fois supérieures aux CMI (Mulla, Kumar and Rajdev, 2016). Une pression sur les communautés microbiennes est exercée même par des antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices, qui peuvent favoriser le mouvement d'éléments génétiques mobiles et le taux de mutagenèse (Gullberg *et al.*, 2011, 2014). Nous nous sommes donc intéressés aux microorganismes présents dans les effluents hospitaliers et plus spécifiquement aux bactéries des biofilms de ces effluents un mode de vie qui leur permet de se protéger des conditions environnementales. Parmi les bactéries cultivables issues du biofilm, nous avons isolé 153 souches sur milieu sélectif (115 sur ciprofloxacine (1 µg/L) et 38 sur imipénème (8 µg/L)). Quel que soit le milieu sélectif utilisé, le genre *Aeromonas spp* était prévalent. Ce pathogène opportuniste se développe dans les réseaux d'eau, particulièrement dans les biofilms, mais peut aussi être présent dans la flore intestinale à des taux variants de 0% à 4% (Batra, Mathur and Misra, 2016). Leur présence dans les effluents hospitaliers leur donner la possibilité d'acquérir des gènes de résistance tels ceux codant les carbapénémases ou les PMQR pourrait faire craindre l'émergence de pathogènes entériques. Quelques études ont rapporté la présence de *Aeromonas spp* porteur de gènes *bla<sub>KPC</sub>* dans les selles de patients (Picão *et al.*, 2008; Hughes, 2014). Des bactéries d'autres familles, *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae*, ont été aussi détectées. Ces bactéries expriment des résistances à divers antibiotiques, notamment à ceux utilisés exclusivement à l'hôpital tels les aminosides. La présence de carbapénémases leur confère des hauts niveaux de résistance aux bêtalactamines. Les gènes codant ces carbapénémases sont très fréquemment

**Tableau 22** : Résultats récapitulatifs des proportions de coliformes fécaux et totaux résistants au céfotaxime sur 5 campagnes (Décembre, Janvier, Février, Juin, et Juillet)

	Pourcentage de coliformes fécaux résistants au céfotaxime						Pourcentage de coliformes totaux résistants au céfotaxime					
	Hiver			Eté			Hiver			Eté		
	Décembre	Janvier	Février	Juin	Juillet	Total	Décembre	Janvier	Février	Juin	Juillet	Total
<b>Entrée de la station d'épuration</b>	0,78	1,10	3,31	0,79	1,60	1,51	1,59	9,36%	6,72	2,30	8,57	5,89
<b>Sortie de la station d'épuration</b>	0,68	1,72	1,90	1,60	1,42	1,46	1,35	8,80%	5,15	1,16	4,64	5,10
<b>Hôpital Gabriel Montpied</b>	11,89	0,74	2,29	0,30	4,83	4,01	14,78	36,38%	10,97	1,82	11,62	20,71

présents sur des plasmides, responsables de leur diffusion planétaire. Par ailleurs, des gènes codant des PMQR et des modifications enzymatiques tel que *aac(6)-Ib-cr* ont été aussi identifiés dans les isolats issus du même biofilm. Ces mécanismes confèrent aux bactéries qui les hébergent de faibles niveaux de résistances et facilitent la sélection de mutants possédant des hauts niveaux de résistance (Robicsek, Jacoby and Hooper, 2006; Gibson *et al.*, 2010; Hooper and Jacoby, 2015). Les gènes *qnrS* et ceux codant des carbapénèmases ont été préalablement identifiés chez *Aeromonas spp* dans un environnement aquatique (Picão *et al.*, 2008; Poirel, Cattoir and Nordmann, 2012; Renata C Picão *et al.*, 2013; Xia, Ren and Xu, 2013), supportant l'hypothèse que ces bactéries jouent un rôle majeur dans la dissémination des marqueurs de résistance aux fluoroquinolones ou aux carbapénèmes. Aucune similarité entre les souches hospitalières et environnementales résistantes à la ciprofloxacine n'a été démontrée dans notre étude. Pour les bactéries résistantes à l'imipénème, la recherche de similarité de souches environnementales et cliniques n'a pas été possible car il n'y avait aucune espèce identique entre l'environnement et l'hôpital. Nous avons limité nos travaux aux effluents hospitaliers, il serait intéressant d'étendre l'analyse dans les eaux usées de la station d'épuration qui reçoivent les eaux usées de l'effluent hospitalier. Une étude a débuté, dans le cadre d'un partenariat européen pour lequel un screening des coliformes fécaux et totaux résistant au céfotaxime est effectué sur trois sites de prélèvements : les effluents hospitaliers, les eaux entrantes et sortantes de la station d'épuration de la ville. Au total 40 équipes dans le monde effectuent 5 campagnes de prélèvements, 3 en hiver et 2 en été. Les échantillons d'eaux usées sont prélevés puis filtrés et cultivés sur un milieu sélectif pour coliformes avec ou sans céfotaxime. Le dénombrement permet d'évaluer la proportion de coliformes résistants au céfotaxime sur les trois sites d'échantillonnage. Les résultats de nos 5 campagnes sont représentés dans le tableau 22. La présence de coliformes résistants au céfotaxime est démontrée dans ces 3 types d'eau. Cependant, une plus grande proportion de coliformes fécaux au céfotaxime est constatée dans les effluents hospitaliers par rapport à l'entrée ou à la sortie de la station d'épuration. Une dilution des eaux usées hospitalières pourrait être responsable de cette diminution. Le mode de culture permet de sélectionner la présence potentielle de BLSE ou carbapénèmases ou céphalosporinases dans ces coliformes. Ainsi, pour chaque campagne, une dizaine de bactéries résistantes au céfotaxime et phénotypiquement différentes (forme, couleur et aspect) ont été isolées et congelées afin de les identifier et de détecter la présence de BLSE. La figure 25 représente les résultats des trois premières campagnes d'échantillonnage pour l'ensemble des participants. Nous pouvons ainsi





**Figure 25 :** Résultats préliminaires des proportions de coliformes fécaux résistant au céfotaxime dans les eaux entrantes (RWW) et sortantes (TWW) des stations d'épurations dans le monde (Echantillonnage Clermont-Ferrand : France a FR/ France b FR)

constater que le traitement des eaux usées par les stations d'épuration n'est vraisemblablement pas approprié à l'élimination des bactéries multi-résistantes ou des éléments génétiques mobiles porteurs de gènes de résistances. Une autre hypothèse sur la présence de résistance au céfotaxime dans les eaux de sortie de STEP serait la présence de betalactamines à des concentrations sub-CMI induisant l'acquisition ou l'apparition de BLSE ou céphalosporinase. Le cefotaxime étant un médicament à usage strictement hospitalier, il serait envisageable de déterminer la PEC, à l'aide des consommations de cet antibiotique enregistrées dans la base de données ConsoRés (<http://www.consores.net/>) dans l'ensemble des établissements de santé de l'agglomération clermontoise. Globalement, ces résultats permettront d'apporter des arguments sur la diffusion probable de l'antibiorésistance de type BLSE ou de carbapénèmases dans l'environnement par l'intermédiaire des eaux usées. Cependant, ce travail est effectué à partir de bactéries planctoniques et non sous forme de biofilm, et il serait intéressant de confronter ces données à celles issues de bactéries sessiles prélevées dans les mêmes environnements et de développer une approche mécanistique qui permettrait d'observer la diffusion effective des gènes de résistance à partir de biofilms. Pour cela, nous allons étudier le transfert d'un plasmide conjugatif porteur de gènes codant une carbapénémase et un marqueur de fluorescence. Ce plasmide sera hébergé par une souche *K. pneumoniae* elle-même marquée au niveau du chromosome par un autre marqueur de fluorescence. A partir de cette souche donatrice, nous suivrons dans des microcosmes à la fois la diffusion de la bactérie et celle de son plasmide conjugatif au sein des communautés de biofilms issu de 3 environnements aqueux (effluent hospitalier, station d'épuration et rivière). Nous aurons ainsi une notion qualitative de la diffusion des deux éléments et pourrons observer d'éventuelles différences en fonction de la nature des biofilms. Nous pourrons également déterminer quelles sont les espèces bactériennes environnementales les plus susceptibles d'acquérir et donc de transmettre le plasmide conjugatif expérimental. Ainsi nous évaluerons comparativement la capacité des biofilms - et donc des microorganismes qui les composent - à accepter, voire à transmettre, les éléments génétiques mobiles d'une souche clinique pathogène.

En conclusion de nos travaux, les biofilms des effluents hospitaliers semblent bien être un lieu propice d'échange et de dissémination de mécanismes de résistance aux antibiotiques *via* des éléments génétiques mobiles. Ainsi, ils sont potentiellement un maillon de la diffusion de l'antibiorésistance dans l'environnement. Afin de limiter cette dissémination, le traitement des effluents hospitaliers pourrait être une solution, même si des travaux récents préconisent de ne pas



traiter ces effluents hospitaliers de façon isolée mais en association avec les effluents urbains (Teofana Chonova et al. 2017). Des études complémentaires devront confirmer ces résultats. Néanmoins, le traitement des effluents hospitaliers ne résoudra pas seul le problème de l'apparition et de la diffusion de l'antibiorésistance et ne peut constituer qu'une aide qui s'ajoute à la mesure essentielle qui est la maîtrise de la consommation d'antibiotiques. Une vigilance accrue sur le bon usage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire et dans le domaine de la production animale s'impose.



# Références bibliographiques



- Abrahamson, M. *et al.* (1996) 'Development of an artificial biofilm to study the effects of a single microcolony on mass transport', *Journal of Microbiological Methods*, 26(1–2), pp. 161–169. doi: 10.1016/0167-7012(96)00908-6.
- Al-Ahmad, A., Daschner, F. D. and Kümmerer, K. (1999) 'Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, and Sulfamethoxazole and Inhibition of Waste Water Bacteria', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(2), pp. 158–163. doi: 10.1007/s002449900501.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J. and Osheroff, N. (2014) 'Mechanism of quinolone action and resistance.', *Biochemistry*. American Chemical Society, 53(10), pp. 1565–74. doi: 10.1021/bi5000564.
- Alexander, M. (1981) 'Biodegradation of chemicals of environmental concern', *Science*, 211(4478), pp. 132–138. doi: 10.1126/science.7444456.
- Alexy, R., Kumpel, T. and Kümmerer, K. (2004) 'Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test', *Chemosphere*, 57(6), pp. 505–512. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.06.024.
- Almakki, A. *et al.* (2017) 'NDM-5-producing *Escherichia coli* in an urban river in Montpellier, France', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(1), pp. 123–124. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.003.
- Alouache, S. *et al.* (2014) 'Characterization of ESBLs and Associated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from an Urban Wastewater Treatment Plant in Algeria', *Microbial Drug Resistance*, 20(1), pp. 30–38. doi: 10.1089/mdr.2012.0264.
- Altin, A., Altin, S. and Degirmenci, M. (2003) 'Characteristics and treatability of hospital (medical) wastewaters', *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(9), pp. 1098–1108.
- Ambler, R. P. (1980) 'The structure of beta-lactamases.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289(1036), pp. 321–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6109327> (Accessed: 9 August 2017).
- Amorim, C. L. *et al.* (2014) 'Biodegradation of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin as single and mixed substrates by *Labrys portucalensis* F11', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7), pp. 3181–3190. doi: 10.1007/s00253-013-5333-8.
- Andersson, D. I. and Hughes, D. (2012) 'Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations', *Drug Resistance Updates*, 15(3), pp. 162–172. doi: 10.1016/j.drug.2012.03.005.
- Andersson, D. I. and Hughes, D. (2014) 'Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics', *Nature reviews. Microbiology*, 12(7), pp. 465–78. doi: 10.1038/nrmicro3270.
- Andersson, S. and AlbaNova universitetscentrum. (2009) *Characterization of bacterial biofilms for wastewater treatment*. Nature Rev. Stockholm: School of Biotechnology, Division of Environmental Microbiology, AlbaNova University Center, Royal Institute of Technology.
- Ando, T. *et al.* (2007) 'A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agents.', *Environmental toxicology and chemistry*, 26(4), pp. 601–6. doi: 10.1897/06-195R.1.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, P. (2003) 'Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment', *Chemosphere*, 50(10), pp. 1319–30. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00769-5.
- ANSM (2017) 'L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2013', p. 44.
- Arakawa, Y. *et al.* (1995) 'A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 39(7), pp. 1612–5. doi: 10.1128/AAC.39.7.1612.
- Ashfaq, M. *et al.* (2016) 'Occurrence and ecological risk assessment of fluoroquinolone antibiotics in hospital waste of Lahore, Pakistan', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, pp. 16–22. doi: 10.1016/j.etap.2015.12.015.
- ATB-RAISIN, R. (2008) 'Surveillance de la consommation des antibiotiques'.
- Aubron, C. *et al.* (2005) 'Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers.', *Emerging infectious diseases*.





Centers for Disease Control and Prevention, 11(2), pp. 260–4. doi: 10.3201/eid1102.030684.

Al Aukidy, M., Verlicchi, P. and Voulvoulis, N. (2014) 'A framework for the assessment of the environmental risk posed by pharmaceuticals originating from hospital effluents', *Science of The Total Environment*, 493, pp. 54–64. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.128.

Backhaus, T. and Grimme, L. H. (1999) 'The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*', *Chemosphere*, 38(14), pp. 3291–3301. doi: 10.1016/S0045-6535(98)00560-8.

Backhaus, T., Scholze, M. and Grimme, L. H. (2000) 'The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*', *Aquatic Toxicology*, 49(1–2), pp. 49–61. doi: 10.1016/S0166-445X(99)00069-7.

Baena-Nogueras, R. M., González-Mazo, E. and Lara-Martí, P. A. (2017) 'Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 590–591(March), pp. 643–654. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.015.

Bailly, E., Levi, Y. and Karolak, S. (2013) 'Calibration and field evaluation of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring pharmaceuticals in hospital wastewater', *Environmental Pollution*, 174, pp. 100–105. doi: 10.1016/j.envpol.2012.10.025.

Ball, P. (2000) 'Safety of the New Fluoroquinolones Compared with Ciprofloxacin', *Journal of Chemotherapy*. Taylor & Francis, 12(sup1), pp. 8–11. doi: 10.1080/1120009X.2000.11782290.

Balzer, M. *et al.* (2010) 'Faecal indicator bacteria in river biofilms', *Water Science and Technology*, 61(5), pp. 1105–1111. doi: 10.2166/wst.2010.022.

Van Bambeke, F. *et al.* (2005) 'Quinolones in 2005: an update', *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), pp. 256–280. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01131.x.

Banning, N., Toze, S. and Mee, B. J. (2003) 'Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system', *Microbiology*, 149(1), pp. 47–55. doi: 10.1099/mic.0.25938-0.

Bañuelos-Vazquez, L. A., Torres Tejerizo, G. and Brom, S. (2017) 'Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements', *Plasmid*, 91, pp. 82–89. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.04.002.

Baquero, F., Martínez, J.-L. and Cantón, R. (2008) 'Antibiotics and antibiotic resistance in water environments', *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), pp. 260–265. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.

Baron, E. J. and Hindler, J. A. (1984) 'Bioactivity of imipenem as a function of medium, time, and temperature.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 25(6), pp. 781–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6588920> (Accessed: 5 August 2017).

Barra Caracciolo, A. *et al.* (2016) 'Degradation of a fluoroquinolone antibiotic in an urbanized stretch of the River Tiber', *Microchemical Journal*. Elsevier B.V., (February). doi: 10.1016/j.microc.2016.12.008.

Basker, M. J. (1982) 'The carbapenem family.', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 10(1), pp. 4–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6980875> (Accessed: 10 July 2017).

Basker, M. J., Boon, R. J. and Hunter, P. A. (1980) 'Comparative antibacterial properties in vitro of seven olivanic acid derivatives: MM 4550, MM 13902, MM 17880, MM 22380, MM 22381, MM 22382 and MM 22383.', *The Journal of antibiotics*, 33(8), pp. 878–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6968745> (Accessed: 10 July 2017).

Bassetti, M. *et al.* (2009) 'Current status of newer carbapenems.', *Current medicinal chemistry*, 16(5), pp. 564–75. doi: 10.2174/092986709787458498.

Batra, P., Mathur, P. and Misra, M. C. (2016) 'Aeromonas spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen.', *Journal of laboratory physicians*. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd., 8(1), pp. 1–4. doi: 10.4103/0974-2727.176234.

De Beer, D., Stoodley, P. and Lewandowski, Z. (1996) 'Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms',



*Water Research*, 30(11), pp. 2761–2765. doi: 10.1016/S0043-1354(96)00141-8.

Beier, S. *et al.* (2011) ‘Full scale membrane bioreactor treatment of hospital wastewater as forerunner for hot-spot wastewater treatment solutions in high density urban areas’, *Water Science and Technology*, 63(1). doi: 10.2166/wst.2011.010.

De Bel, E. *et al.* (2009) ‘Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products’, *Chemosphere*, 77(2), pp. 291–295. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.033.

Bengtsson-Palme, J. and Larsson, D. G. J. (2016) ‘Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation’, *Environment International*, 86, pp. 140–149. doi: 10.1016/j.envint.2015.10.015.

Bianchi, S., Bianchini, E. and Scanavacca, P. (2011) ‘Use of antipsychotic and antidepressant within the Psychiatric Disease Centre, Regional Health Service of Ferrara’, *BMC Clinical Pharmacology*, 11(1), p. 21. doi: 10.1186/1472-6904-11-21.

Van Boeckel, T. P. *et al.* (2014) ‘Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data’, *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), pp. 742–750. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.

Boillot, C. *et al.* (2008) ‘Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities.’, *The Science of the total environment*, 403(1–3), pp. 113–29. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.04.037.

Boillot, C. (2008) ‘Evaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d’effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l’amélioration de la phase ” caractérisation des effets ”.’, p. 292. doi: tel-00289514.

Bolon, M. K. (2009) ‘The Newer Fluoroquinolones’, *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(4), pp. 1027–1051. doi: 10.1016/j.idc.2009.06.003.

Bonnin, R. A. *et al.* (2011) ‘Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 55(1), pp. 349–54. doi: 10.1128/AAC.00773-10.

Bonot, S. and Merlin, C. (2010) ‘Monitoring the Dissemination of the Broad-Host-Range Plasmid pB10 in Sediment Microcosms by Quantitative PCR’, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), pp. 378–382. doi: 10.1128/aem.01125-09.

Borgeaud, S. *et al.* (2015) ‘The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer’, *Science*, 347(6217). doi: 10.1126/science.1260064.

Bouki, C., Venieri, D. and Diamadopoulos, E. (2013) ‘Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016.

Bound, J. P. and Voulvoulis, N. (2006) ‘Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment’, *Water Research*, 40(15), pp. 2885–2892. doi: 10.1016/j.watres.2006.05.036.

Bradford, P. A. *et al.* (1997) ‘Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(3), pp. 563–9. doi: 0066-4804/97/\$04.00 0.

Bradley, J. S. *et al.* (1999) ‘Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection.’, *International journal of antimicrobial agents*, 11(2), pp. 93–100. doi: 10.1016/S0924-8579(98)00094-6.

Brain, R. A. *et al.* (2004) ‘Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test.’, *Environmental toxicology and chemistry*, 23(2), pp. 371–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982384> (Accessed: 10 August 2017).

Breilh, D. *et al.* (2013) ‘Carbapenems’, *Journal of Chemotherapy*. Taylor & Francis, 25(1), pp. 1–17. doi: 10.1179/1973947812Y.0000000032.

Brown, A. G. *et al.* (1976) ‘Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity.’, *The Journal of*



- Antibiotics*. Japan antibiotics research association, 29(6), pp. 668–669. doi: 10.7164/antibiotics.29.668.
- Brown, K. D. *et al.* (2006) ‘Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico’, *Science of The Total Environment*, 366(2–3), pp. 772–783. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.10.007.
- Butterworth, D. *et al.* (1979) ‘Olivanic acids, a family of betalactam antibiotics with beta-lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species. I. Detection, properties and fermentation studies.’, *The Journal of Antibiotics*, 32(4), pp. 287–294. doi: 10.7164/antibiotics.32.287.
- Cambau, E. *et al.* (2009) ‘Target specificity of the new fluoroquinolone besifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(3), pp. 443–450. doi: 10.1093/jac/dkn528.
- Carraro, E. *et al.* (2016) ‘Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries’, *Journal of Environmental Management*, 168, pp. 185–199. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.11.021.
- Castiglioni, S. *et al.* (2008) ‘Novel homologs of the multiple resistance regulator *marA* in antibiotic-contaminated environments’, *Water Research*, 42(16), pp. 4271–4280. doi: 10.1016/j.watres.2008.07.004.
- Cattoir, V. *et al.* (2006) ‘In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(5), pp. 1054–1057. doi: 10.1093/jac/dkl361.
- Cattoir, V. *et al.* (2008) ‘Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp.’, *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 14(2), pp. 231–7. doi: 10.3201/eid1402.070677.
- Cattoir, V., Poirel, L. and Nordmann, P. (2008) ‘Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 52(10), pp. 3801–4. doi: 10.1128/AAC.00638-08.
- Cavallo, J.-D. *et al.* (2004) ‘Bêtalactamines’, *EMC - Maladies Infectieuses*, 1(3), pp. 129–202. doi: 10.1016/j.emcmi.2004.03.003.
- Cayci, Y. T., Coban, A. Y. and Gunaydin, M. (2014) ‘Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.’, *Indian journal of medical microbiology*. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd., 32(3), pp. 285–9. doi: 10.4103/0255-0857.136567.
- Chagas, T. P. G. *et al.* (2011) ‘Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater’, *Journal of Hospital Infection*, 77(3), p. 281. doi: 10.1016/j.jhin.2010.10.008.
- Chandran, S. P. *et al.* (2014) ‘Detection of carbapenem resistance genes and cephalosporin, and quinolone resistance genes along with *oqxAB* gene in *Escherichia coli* in hospital wastewater: A matter of concern’, *Journal of Applied Microbiology*, 117(4), pp. 984–995. doi: 10.1111/jam.12591.
- Chang, X. *et al.* (2010) ‘Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China’, *Environmental Pollution*, 158(5), pp. 1444–1450. doi: 10.1016/j.envpol.2009.12.034.
- Chen, T.-L. *et al.* (2008) ‘Acquisition of a plasmid-borne *blaOXA-58* gene with an upstream IS1008 insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 52(7), pp. 2573–80. doi: 10.1128/AAC.00393-08.
- Chen, X. *et al.* (2012) ‘Prevalence of *qnr*, *aac(6’)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 56(6), pp. 3423–7. doi: 10.1128/AAC.06191-11.
- Chitnis, V. *et al.* (2013) ‘Hospital effluent: A source of multiple drug-resistant bacteria’, *Current Science*. Current Science Association, pp. 989–991. doi: 10.2307/24104814.



- Chonova, T. *et al.* (2016) 'Separate treatment of hospital and urban wastewaters: A real scale comparison of effluents and their effect on microbial communities', *Science of the Total Environment*, 542. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.161.
- Chouchani, C. *et al.* (2013) 'Occurrence of IMP-8, IMP-10, and IMP-13 metallo- $\beta$ -lactamases located on class 1 integrons and other extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in bacterial isolates from Tunisian rivers.', *Scandinavian journal of infectious diseases*, 45(2), pp. 95–103. doi: 10.3109/00365548.2012.717712.
- Cielecka-Piontek, J. *et al.* (2011) 'Recent Advances in Stability Studies of Carbapenems', *Current Pharmaceutical Analysis*, 7(4), pp. 213–227. doi: 10.2174/157341211797457989.
- Cielecka-Piontek, J., Zajac, M. and Jelińska, A. (2008) 'A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(1), pp. 52–57. doi: 10.1016/j.jpba.2007.08.024.
- Cole, M. (1980) 'Penicillin fifty years after Fleming - " $\beta$ -Lactams" as  $\beta$ -lactamase inhibitors', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289(1036). Available at: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/289/1036/207.short> (Accessed: 5 August 2017).
- Conte, D. *et al.* (2017) 'Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, pp. 62–69. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.031.
- Le Corre, K. S. *et al.* (2012) 'Consumption based approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater', *Environment International*, 45, pp. 99–111. doi: 10.1016/j.envint.2012.03.008.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999) 'Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections', *Science*, 284(5418). doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
- Courvalin, P. (1990) 'Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence?', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(5), pp. 681–4. doi: 0066-4804/90/050681-04\$02.00/0.
- Coutu, S. *et al.* (2013) 'Temporal Variability of Antibiotics Fluxes in Wastewater and Contribution from Hospitals', *PLoS ONE*. Edited by K. Rockne. Public Library of Science, 8(1), p. e53592. doi: 10.1371/journal.pone.0053592.
- Cuzon, G., Bonnin, R. A. and Nordmann, P. (2013) 'First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France.', *PloS one*. Public Library of Science, 8(4), p. e61322. doi: 10.1371/journal.pone.0061322.
- Cuzon, G., Naas, T. and Nordmann, P. (2011) 'Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 55(11), pp. 5370–3. doi: 10.1128/AAC.05202-11.
- Dalhoff, A., Janjic, N. and Echols, R. (2006) 'Redefining penems', *Biochemical Pharmacology*, 71(7), pp. 1085–1095. doi: 10.1016/j.bcp.2005.12.003.
- Daouk, S. *et al.* (2016) 'Dynamics of active pharmaceutical ingredients loads in a Swiss university hospital wastewaters and prediction of the related environmental risk for the aquatic ecosystems', *Science of The Total Environment*, 547, pp. 244–253. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.117.
- Daughton, C. G. and Ternes, T. A. (1999) 'Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?', *Environmental health perspectives*, 107 Suppl, pp. 907–38. doi: 10.2307/3434573.
- Davies, T. A. *et al.* (2008) 'Affinity of Doripenem and Comparators to Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), pp. 1510–1512. doi: 10.1128/AAC.01529-07.
- Demouliere, Raphael, Bensaid Schemba, Joy, Berger, Joshua, Ait Kaci, Ahmed; Rougier, F. (2012) 'Public water supply and sanitation services in France', (March).
- Deshpande, A. D., Baheti, K. G. and Chatterjee, N. R. (2004) 'Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics', *Current Science*.





- Current Science Association, pp. 1684–1695. doi: 10.2307/24109765.
- Dinh, Q. T. *et al.* (2017) ‘Occurrence of antibiotics in rural catchments’, *Chemosphere*, 168, pp. 483–490. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.106.
- Diwan, V., Stålsby Lundborg, C. and Tamhankar, A. J. (2013a) ‘Seasonal and Temporal Variation in Release of Antibiotics in Hospital Wastewater: Estimation Using Continuous and Grab Sampling’, *PLoS ONE*. Edited by A. M. Noor, 8(7), p. e68715. doi: 10.1371/journal.pone.0068715.
- Diwan, V., Stålsby Lundborg, C. and Tamhankar, A. J. (2013b) ‘Seasonal and Temporal Variation in Release of Antibiotics in Hospital Wastewater: Estimation Using Continuous and Grab Sampling’, *PLoS ONE*. Edited by A. M. Noor, 8(7), p. e68715. doi: 10.1371/journal.pone.0068715.
- Dobiasova, H. *et al.* (2014) ‘Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids’, *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), pp. 413–421. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.011.
- Donald, H. M. *et al.* (2000) ‘Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 44(1), pp. 196–9. doi: 10.1128/AAC.44.1.196-199.2000.
- Donlan, R. M. (2002) ‘Biofilms: Microbial Life on Surfaces’, *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp. 881–890. doi: 10.3201/eid0809.020063.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002) ‘Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms’, *Clinical microbiology reviews*, 15(2), pp. 167–93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167–193.2002.
- Van Doorslaer, X. *et al.* (2014) ‘Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants.’, *The Science of the total environment*, 500–501C, pp. 250–269. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.08.075.
- Duong, H. A. *et al.* (2008) ‘Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam’, *Chemosphere*, 72(6), pp. 968–973. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.03.009.
- Eguchi, K. *et al.* (2004) ‘Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae’, *Chemosphere*, 57(11), pp. 1733–1738. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.07.017.
- El-Gamal, M. I. *et al.* (2017) ‘Recent updates of carbapenem antibiotics’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 131, pp. 185–195. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.022.
- El-Ogri, F. *et al.* (2016) ‘A survey of wastewaters generated by a hospital in Marrakech city and their characterization’, *Desalination and Water Treatment*, (January), pp. 1–14. doi: 10.1080/19443994.2016.1138328.
- El, T. and Roig, B. (2008) ‘KNAPPE Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental’, *Change*, (36864).
- EMA (2006) ‘Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal’, (June), pp. 1–12.
- Emmanuel, E. (2004) *Evaluation des risques sanitaires et ecotoxicologiques liés aux effluents hospitalitiers*. Université de Lyon.
- Escher, B. I. *et al.* (2011) ‘Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater’, *Water Research*, 45(1), pp. 75–92. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.019.
- Escudero-Oñate, C. *et al.* (2017) ‘Occurrence and Risks of Contrast Agents, Cytostatics, and Antibiotics in Hospital Effluents’, in: Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–30. doi: 10.1007/698\_2017\_12.
- Van Essen-Zandbergen, A. *et al.* (2007) ‘Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 59(4), pp. 746–750. doi: 10.1093/jac/dkl549.
- Evans, B. and Amyes, S. (2014) ‘OXA  $\beta$ -lactamases.’, *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology, 27(2), pp. 241–63. doi: 10.1128/CMR.00117-13.



- Evans, L. V. (2000) *Biofilms : recent advances in their study and control*. Harwood Academic.
- Ferk, F. *et al.* (2009) 'Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward', *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.08.022.
- Ferrari, B. *et al.* (2004) 'Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), p. 1344. doi: 10.1897/03-246.
- Fleming, A. (1929) 'On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae', *British journal of experimental pathology*. Wiley-Blackwell, 10(3), p. 226. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/> (Accessed: 3 August 2017).
- Flemming, H.-C., Neu, T. R. and Wozniak, D. J. (2007) 'The EPS matrix: the "house of biofilm cells".', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 189(22), pp. 7945–7. doi: 10.1128/JB.00858-07.
- Fuentefria, D. B., Ferreira, A. E. and Corção, G. (2011) 'Antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related?', *Journal of Environmental Management*, 92(1), pp. 250–255. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.09.001.
- Fukasawa, M. *et al.* (1992) 'Stability of meropenem and effect of 1 beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36(7), pp. 1577–9. doi: 10.1128/AAC.36.7.1577.
- Gay, K. *et al.* (2006) 'Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of *Salmonella enterica*', *Clinical Infectious Diseases*, 43(3), pp. 297–304. doi: 10.1086/505397.
- Ge, L. *et al.* (2015) 'New insights into the aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: Direct photodegradation, hydroxyl-radical oxidation, and antibacterial activity changes.', *The Science of the total environment*, 527–528, pp. 12–7. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.04.099.
- Giakkoupi, P. *et al.* (2000) 'IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an Enterobacter cloacae clinical strain.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(9), pp. 2247–53. doi: 10.1128/AAC.44.9.2247-53
- Gibson, J. S. *et al.* (2010) 'Fluoroquinolone resistance mechanisms in multidrug-resistant Escherichia coli isolated from extraintestinal infections in dogs', *Veterinary Microbiology*, 146(1–2), pp. 161–166. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.012.
- Giger, W. *et al.* (2003) 'Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters', *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 57(9), pp. 485–491. doi: 10.2533/000942903777679064.
- Gillings, M. R. *et al.* (2009) 'Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms', *FEMS Microbiology Letters*. Freeman, 296(2), pp. 282–288. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01646.x.
- Girardi, C., Greve, J., Lamshöft, M., *et al.* (2011) 'Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities', *Journal of Hazardous Materials*, 198, pp. 22–30. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.10.004.
- Girlich, D., Poirel, L. and Nordmann, P. (2010) 'Novel ambler class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from a Pseudomonas fluorescens isolate from the Seine River, Paris, France.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 54(1), pp. 328–32. doi: 10.1128/AAC.00961-09.
- Githinji, L. J. M., Musey, M. K. and Ankumah, R. O. (2011) 'Evaluation of the Fate of Ciprofloxacin and Amoxicillin in Domestic Wastewater', *Water, Air, & Soil Pollution*. Springer Netherlands, 219(1–4), pp. 191–201. doi: 10.1007/s11270-010-0697-1.
- Golet, E. M. *et al.* (2003) 'Environmental Exposure Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents from Sewage to Soil'. American Chemical Society. doi: 10.1021/ES0264448.



- González-Pleiter, M. *et al.* (2013) 'Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment', *Water Research*, 47(6), pp. 2050–2064. doi: 10.1016/j.watres.2013.01.020.
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S. and Barceló, D. (2013) 'Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*, 1292, pp. 173–188. doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.072.
- Guillén, D. *et al.* (2012) 'Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective', *Science of The Total Environment*, 440, pp. 236–252. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.064.
- Gullberg, E. *et al.* (2011) 'Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations', *PLoS Pathogens*. Edited by M. Lipsitch. Public Library of Science, 7(7), p. e1002158. doi: 10.1371/journal.ppat.1002158.
- Gullberg, E. *et al.* (2014) 'Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals.', *mBio*. American Society for Microbiology, 5(5), pp. e01918-14. doi: 10.1128/mBio.01918-14.
- Halling-Sorensen, B. *et al.* (2000) 'Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 46(90001), pp. 53–58. doi: 10.1093/jac/46.suppl\_1.53.
- Harris, S. *et al.* (2013) 'Simulation model to predict the fate of ciprofloxacin in the environment after wastewater treatment', *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. Taylor & Francis Group, 48(7), pp. 675–685. doi: 10.1080/10934529.2013.744568.
- Hartemann, P., Hautemaniere, A., Joyeux, M. (2005) 'La problématique des effluents liquides hospitaliers', *HYGIENES*, volume 13. Available at: <http://www.bdsp.ehesp.fr/Base/339269/> (Accessed: 28 June 2017).
- Hartmann, A. *et al.* (1998) 'Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital wastewater', *Environmental Toxicology and Chemistry*. Wiley Periodicals, Inc., 17(3), pp. 377–382. doi: 10.1002/etc.5620170305.
- Heberer, T. (2002) 'Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data', *Toxicology Letters*, 131(1–2), pp. 5–17. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00041-3.
- Heberer, T. and Feldmann, D. (2005) 'Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents—modeling versus measurements', *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), pp. 211–218. doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.03.007.
- Hee Lee, S. *et al.* (2007) 'Exact location of the region responsible for the extended substrate spectrum in class C beta-lactamases.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 51(10), p. 3778–9; author reply 3779. doi: 10.1128/AAC.00633-07.
- Henriques, I. *et al.* (2004) 'Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 48(6), pp. 2321–4. doi: 10.1128/AAC.48.6.2321-2324.2004.
- Hernando, M. D. *et al.* (2006) 'Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments', *Talanta*, 69(2 SPEC. ISS.), pp. 334–342. doi: 10.1016/j.talanta.2005.09.037.
- Hoffman, Lucas; D'argenio, David; MacCoss, Michael; Zhang, Zhaoying; Jones, Roger; Miller, S. (2005) 'Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation', *Nature*. Nature, 436(7054), pp. 1171–1175. doi: 10.1038/nature03912.
- Hooper, D. C. (2000) 'Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones', *Clinical Infectious Diseases*, 31(Supplement 2), pp. S24–S28. doi: 10.1086/314056.
- Hooper, D. C. and Jacoby, G. A. (2015) 'Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance.', *Annals of the New York Academy of Sciences*. NIH Public Access, 1354(1), pp. 12–31. doi: 10.1111/nyas.12830.



- Huang, H. *et al.* (1992) 'Analysis of two gene regions involved in the expression of the imipenem-specific, outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*.' *FEMS microbiology letters*, 76(3), pp. 267–73. doi: doi.org/10.1016/0378-1097(92)90347-Q.
- Hughes, H. Y. (2014) *Detection of Carbapenemase-Producing Aeromonas hydrophila on Perirectal Surveillance Culture*. IDSA.
- Hugonnet, J.-E. *et al.* (2009) 'Meropenem-Clavulanate Is Effective Against Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*', *Science*, 323(5918), pp. 1215–1218. doi: 10.1126/science.1167498.
- Hunt, S. M. *et al.* (2004) 'Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 70(12), pp. 7418–25. doi: 10.1128/AEM.70.12.7418-7425.2004.
- Ibrahim, I., Togola, A. and Gonzalez, C. (2013) 'Polar organic chemical integrative sampler (POCIS) uptake rates for 17 polar pesticides and degradation products: laboratory calibration', *Environmental Science and Pollution Research*. Springer-Verlag, 20(6), pp. 3679–3687. doi: 10.1007/s11356-012-1284-3.
- Igbinosa, I. H. *et al.* (2012) 'Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health', *The Scientific World Journal*. Hindawi, 2012, pp. 1–13. doi: 10.1100/2012/625023.
- InVS (2014) 'Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable', *Institut de veille sanitaire (InVS) et Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)*, pp. 1–10. doi: j.
- InVS (2015) 'Situation épidémiologique : Episodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) en France. Données du 4 mars 2015.', pp. 1–14.
- Isidori, M. *et al.* (2005) 'Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms', *Science of The Total Environment*, 346(1–3), pp. 87–98. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.11.017.
- Isozumi, R. *et al.* (2012) 'bla(NDM-1)-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam.', *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 18(8), pp. 1383–5. doi: 10.3201/eid1808.111816.
- Ito, H. *et al.* (1995) 'Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*.' *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 39(4), pp. 824–9. doi: 0066-4804/95/\$04.00 0 ?
- Ivleva, N. P. *et al.* (2008) 'In Situ Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis of Biofilm', *Analytical Chemistry*, 80(22), pp. 8538–8544. doi: 10.1021/ac801426m.
- Jacoby, G. A. *et al.* (2006) 'qnrB, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), pp. 1178–1182. doi: 10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006.
- Jakobsen, L. *et al.* (2008) 'Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment', *Environment International*, 34(1), pp. 108–115. doi: 10.1016/j.envint.2007.07.011.
- Jeon, J. *et al.* (2015) 'Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 16(5), pp. 9654–9692. doi: 10.3390/ijms16059654.
- Ji, J.-Y. *et al.* (2013) 'Acute toxicity of pharmaceutical wastewaters containing antibiotics to anaerobic digestion treatment', *Chemosphere*, 91(8), pp. 1094–1098. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.009.
- Jjemba, P. K. (2006) 'Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(1), pp. 113–130. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.11.011.
- Johnson, A. C. *et al.* (2008) 'Assessing the concentrations of polar organic microcontaminants from point sources in the aquatic environment: measure or model?', *Environmental science & technology*, 42(15), pp. 5390–9. doi: 10.1021/es703091r.





- Joss, A. *et al.* (2006) 'Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme', *Water Research*, 40(8), pp. 1686–1696. doi: 10.1016/j.watres.2006.02.014.
- Kahan, J. S. *et al.* (1979) 'Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties.', *The Journal of antibiotics*, 32(1), pp. 1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/761989> (Accessed: 10 July 2017).
- Kaplan, J. B. (2011) 'Antibiotic-induced biofilm formation', *International Journal of Artificial Organs*, 34(9), pp. 737–751. doi: 10.5301/ijao.5000027.
- Kappell, A. D. *et al.* (2015) 'Detection of multi-drug resistant *Escherichia coli* in the urban waterways of Milwaukee, WI.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 6, p. 336. doi: 10.3389/fmicb.2015.00336.
- Katayama, Y. *et al.* (2003) 'Jumping the barrier to beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*.' , *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 185(18), pp. 5465–72. doi: 10.1128/JB.185.18.5465-5472.2003.
- Kehrenberg, C. *et al.* (2006) 'Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar *Infantis*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. ASM Press, Washington, DC, 58(1), pp. 18–22. doi: 10.1093/jac/dkl213.
- Kesaano, M. and Sims, R. C. (2014) 'Algal biofilm based technology for wastewater treatment', *Algal Research*, 5, pp. 231–240. doi: 10.1016/j.algal.2014.02.003.
- Kieffer, N., Poirel, L., Bessa, L. J., *et al.* (2016) 'VIM-1, VIM-34, and IMP-8 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Strains Recovered from a Portuguese River', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), pp. 2585–2586. doi: 10.1128/AAC.02632-15.
- Kim, J. Y. *et al.* (2006) 'Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase', *Molecular Microbiology*, 60(4), pp. 907–916. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05146.x.
- Kim, S. *et al.* (2014) 'Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations', *Science of The Total Environment*, 468–469, pp. 813–820. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.100.
- Kimosop, S. J. *et al.* (2016) 'Residue levels and discharge loads of antibiotics in wastewater treatment plants (WWTPs), hospital lagoons, and rivers within Lake Victoria Basin, Kenya', *Environmental Monitoring and Assessment*. Springer International Publishing, 188(9), p. 532. doi: 10.1007/s10661-016-5534-6.
- Kitchel, B. *et al.* (2010) 'Genetic Factors Associated with Elevated Carbapenem Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), pp. 4201–4207. doi: 10.1128/AAC.00008-10.
- Kittinger, C. *et al.* (2016) 'Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 7, p. 586. doi: 10.3389/fmicb.2016.00586.
- Klapper, I. *et al.* (2002) 'Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties.', *Biotechnology and bioengineering*, 80(3), pp. 289–96. doi: 10.1002/bit.10376.
- Koga, T. *et al.* (2009) 'Affinity of Tomopenem (CS-023) for penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*.' , *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 53(3), pp. 1238–41. doi: 10.1128/AAC.01433-08.
- Kokare, C. R. *et al.* (2009) 'Biofilm: Importance and applications', *Indian Journal of Biotechnology*, 8(2), pp. 159–168.
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A. and Harnisz, M. (2013) 'Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, pp. 96–102. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.014.
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A. and Albanis, T. A. (2010) 'Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece', *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), pp. 804–817. doi:



10.1016/j.jhazmat.2010.03.075.

Kovalova, L. *et al.* (2012) 'Hospital Wastewater Treatment by Membrane Bioreactor: Performance and Efficiency for Organic Micropollutant Elimination', *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society, 46(3), pp. 1536–1545. doi: 10.1021/es203495d.

Kropp, H. *et al.* (1980) 'MK0787 (N-formimidoyl thienamycin): evaluation of in vitro and in vivo activities.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 17(6), pp. 993–1000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6931549> (Accessed: 5 August 2017).

Kümmerer\* and Helmers†, E. (2000) 'Hospital Effluents as a Source of Gadolinium in the Aquatic Environment'. American Chemical Society. doi: 10.1021/ES990633H.

Kümmerer, K. *et al.* (1999) 'European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources.', *The Science of the total environment*, 225(1–2), pp. 155–65. doi: 10.1016/S0048-9697(98)00341-6.

Kümmerer, K. (2001) 'Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review', *Chemosphere*, 45(6–7), pp. 957–969. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00144-8.

Kümmerer, K. *et al.* (2004) 'Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria', *Water Research*, 38(8), pp. 2111–2116. doi: 10.1016/j.watres.2004.02.004.

Kümmerer, K., Al-Ahmad, A. and Mersch-Sundermann, V. (2000) 'Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test', *Chemosphere*, 40(7), pp. 701–710. doi: 10.1016/S0045-6535(99)00439-7.

Kümmerer, K. and Henninger, A. (2003) 'Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent', *Clinical Microbiology and Infection*, 9(12), pp. 1203–1214. doi: 10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x.

Ter Laak, T. L. *et al.* (2010) 'Relating environmental concentrations of pharmaceuticals to consumption: A mass balance approach for the river Rhine', *Environment International*, 36(5), pp. 403–409. doi: 10.1016/j.envint.2010.02.009.

Langford, K. H. and Thomas, K. V. (2009) 'Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works', *Environment International*, 35(5), pp. 766–770. doi: 10.1016/j.envint.2009.02.007.

Längin, A. *et al.* (2009) 'Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin', *Chemosphere*, 75(3), pp. 347–354. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.032.

De Lastours, V. and Fantin, B. (2014) 'Résistance aux fluoroquinolones en 2013 : quel impact pour l'interniste?', *La Revue de Médecine Interne*, 35(9), pp. 601–608. doi: 10.1016/j.revmed.2014.05.005.

Lazarova, V. (1995) 'Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment', *Water Research*, 29(10), pp. 2227–2245. doi: 10.1016/0043-1354(95)00054-O.

Le, T.-H. *et al.* (2016) 'Occurrences and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria and Genetic Determinants of Hospital Wastewater in a Tropical Country.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 60(12), pp. 7449–7456. doi: 10.1128/AAC.01556-16.

Lee, C.-H. *et al.* (2007) 'Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5  $\beta$ -lactamases', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 60(2), pp. 410–413. doi: 10.1093/jac/dkm215.

Leprat, P. (1998) 'Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques?', *Revue des techniques hospitalières*.

Li, C. *et al.* (2016) 'Exploring the correlations between antibiotics and antibiotic resistance genes in the wastewater



treatment plants of hospitals in Xinjiang, China', *Environmental Science and Pollution Research*. Springer Berlin Heidelberg, 23(15), pp. 15111–15121. doi: 10.1007/s11356-016-6688-z.

Li, S.-W. and Lin, A. Y.-C. (2015) 'Increased acute toxicity to fish caused by pharmaceuticals in hospital effluents in a pharmaceutical mixture and after solar irradiation', *Chemosphere*, 139, pp. 190–196. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.010.

Liang, Z. *et al.* (2010) 'Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge', *Chemosphere*, 81(5), pp. 626–632. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.03.043.

Liebig, M., Moltmann, J. and Knacker, T. (2006) 'Evaluation of Measured and Predicted Environmental Concentrations of Selected Human Pharmaceuticals and Personal Care Products (10 pp)', *Environmental Science and Pollution Research - International*, 13(2), pp. 110–119. doi: 10.1065/espr2005.08.276.

Lien, L. T. Q. *et al.* (2016) 'Antibiotics in Wastewater of a Rural and an Urban Hospital before and after Wastewater Treatment, and the Relationship with Antibiotic Use-A One Year Study from Vietnam.', *International journal of environmental research and public health*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 13(6). doi: 10.3390/ijerph13060588.

Lin, J.-S. *et al.* (2010) 'Effects of light and microbial activity on the degradation of two fluoroquinolone antibiotics in pond water and sediment', *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 45(5), pp. 456–465. doi: 10.1080/03601231003800222.

Lindberg, R. *et al.* (2004) 'Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards', *Chemosphere*, 57(10), pp. 1479–1488. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.09.015.

Lindberg, R. H. *et al.* (2005) 'Behavior of Fluoroquinolones and Trimethoprim during Mechanical, Chemical, and Active Sludge Treatment of Sewage Water and Digestion of Sludge'. American Chemical Society. doi: 10.1021/ES0516211.

Lindberg, R. H. *et al.* (2007) 'Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants', *Water Research*, 41(3), pp. 613–619. doi: 10.1016/j.watres.2006.11.014.

Liu, L.-L. *et al.* (2015) 'Dissemination of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. in China: main roles of conjugative plasmid pAZJ221 and transposon Tn2009.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 59(4), pp. 1998–2005. doi: 10.1128/AAC.04574-14.

Livermore, D. M. (1995) 'beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.', *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology, 8(4), pp. 557–84. doi: Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance.

Lomovskaya, O. *et al.* (2001) 'Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 45(1), pp. 105–16. doi: 10.1128/AAC.45.1.105-116.2001.

Lützhøft, H.-C. H., Halling-Sørensen, B. and Jørgensen, S. E. (1999) 'Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer-Verlag, 36(1), pp. 1–6. doi: 10.1007/s002449900435.

Macfarlane, S. and Macfarlane, G. T. (2006) 'Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 72(9), pp. 6204–11. doi: 10.1128/AEM.00754-06.

Madsen, J. S. *et al.* (2012) 'The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Oxford University Press, 65(2), pp. 183–195. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x.

Magagnin, C. M. *et al.* (2017) 'Dissemination of bla OXA-370 gene among several Enterobacteriaceae species in Brazil', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–4. doi: 10.1007/s10096-017-3012-x.



- Magdaleno, A. *et al.* (2014) 'Ecotoxicological and genotoxic evaluation of Buenos Aires city (Argentina) hospital wastewater.', *Journal of toxicology*, 2014, p. 248461. doi: 10.1155/2014/248461.
- Mah, T.-F. C. and O'Toole, G. A. (2001) 'Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents', *Trends in Microbiology*, 9(1), pp. 34–39. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01913-2.
- Maheshwari, M. *et al.* (2016) 'Emergence of ciprofloxacin-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enteric bacteria in hospital wastewater and clinical sources', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 5, pp. 22–25. doi: 10.1016/j.jgar.2016.01.008.
- Mahon, B. M. *et al.* (2017) 'Indistinguishable NDM-producing *Escherichia coli* isolated from recreational waters, sewage, and a clinical specimen in Ireland, 2016 to 2017.', *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. European Centre for Disease Prevention and Control, 22(15). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30513.
- Mammeri, H. *et al.* (2008) 'Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC)  $\beta$ -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*', *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), pp. 238–240. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01126.x.
- Mammeri, H. *et al.* (2010) 'Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC  $\beta$ -lactamases.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 54(11), pp. 4556–60. doi: 10.1128/AAC.01762-09.
- Manageiro, V. *et al.* (2012) 'Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(5), pp. 398–403. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.06.013.
- Marti, E. *et al.* (2014) 'Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river', *Water Research*, 61, pp. 67–76. doi: 10.1016/j.watres.2014.05.006.
- Marti, E. and Balcázar, J. L. (2013) 'Real-Time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 79(5), pp. 1743–5. doi: 10.1128/AEM.03409-12.
- Marti, E., Variatza, E. and Balcazar, J. L. (2014) 'The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance', *Trends in Microbiology*, 22(1), pp. 36–41. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.001.
- Martínez-Martínez, L. *et al.* (2008) 'Plasmid-mediated quinolone resistance', *Expert Review of Anti-infective Therapy*. Taylor & Francis, 6(5), pp. 685–711. doi: 10.1586/14787210.6.5.685.
- Martinez, J. L. (2008) 'Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments', *Science*, 321(5887), pp. 365–367. doi: 10.1126/science.1159483.
- Martins, A. F. *et al.* (2008) 'Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study', *CLEAN – Soil, Air, Water*, 36(3), pp. 264–269. doi: 10.1002/clen.200700171.
- Martins, N. *et al.* (2012) 'Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment', *Ecotoxicology*. Springer US, 21(4), pp. 1167–1176. doi: 10.1007/s10646-012-0871-x.
- Marx, C. *et al.* (2015) 'Environmental risk assessment of antibiotics including synergistic and antagonistic combination effects', *Science of The Total Environment*, 524–525, pp. 269–279. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.04.051.
- Matsumoto, A. *et al.* (2007) 'The emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and host risk factors for carriage of drug-resistant genes in northeastern Japan.', *Japanese journal of infectious diseases*, 60(1), pp. 10–3. doi: 10.1016/j.jid.2007.01.013.
- Van Meervenne, E. *et al.* (2014) 'Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer?', *Pathogens and Disease*. Oxford University Press, 70(3), pp. 332–338. doi: 10.1111/2049-632X.12134.
- Mendez, A. S. L. *et al.* (2006) 'Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), pp. 1363–1366. doi: 10.1016/j.jpba.2006.03.013.





10.1016/j.jpba.2006.02.017.

Mendoza, A. *et al.* (2015) 'Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard', *Environmental Research*, 140, pp. 225–241. doi: 10.1016/j.envres.2015.04.003.

Mérens, A. and Servonnet, A. (2010) 'Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010', *Revue Francophone des Laboratoires*, 2010(422), pp. 33–41. doi: 10.1016/S1773-035X(10)70508-6.

Merlin, C. *et al.* (2011) 'Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms', *Water Research*, 45(9), pp. 2897–2905. doi: 10.1016/j.watres.2011.03.002.

Miège, C. *et al.* (2012) 'Polar organic chemical integrative sampler (POCIS): application for monitoring organic micropollutants in wastewater effluent and surface water', *J. Environ. Monit.* The Royal Society of Chemistry, 14(2), pp. 626–635. doi: 10.1039/C1EM10730E.

Miranda, C. C. *et al.* (2015) 'Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil', *Journal of Applied Microbiology*, 118(6), pp. 1276–1286. doi: 10.1111/jam.12792.

Miyadera, T. *et al.* (1983) 'Synthesis and in vitro activity of a new carbapenem, RS-533.', *The Journal of antibiotics*, 36(8), pp. 1034–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6630055> (Accessed: 10 July 2017).

Mohee, R. (2005) 'Medical wastes characterisation in healthcare institutions in Mauritius', *Waste Management*, 25(6), pp. 575–581. doi: 10.1016/j.wasman.2004.10.003.

Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) 'Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure', *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), pp. 255–261. doi: 10.1016/S0958-1669(03)00036-3.

Molton, J. S. *et al.* (2013) 'The Global Spread of Healthcare-Associated Multidrug-Resistant Bacteria: A Perspective From Asia', *Clinical Infectious Diseases*. Edited by R. A. Weinstein. Oxford University Press, 56(9), pp. 1310–1318. doi: 10.1093/cid/cit020.

Montezzi, L. F. *et al.* (2015) 'Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(2), pp. 174–177. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.10.016.

Mooij, M. J. *et al.* (2009) 'Integron Class 1 Reservoir among Highly Resistant Gram-Negative Microorganisms Recovered at a Dutch Teaching Hospital', *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 30(10), pp. 1015–1018. doi: 10.1086/606039.

Morakchi, H. *et al.* (2017) 'Molecular characterisation of carbapenemases in urban pigeon droppings in France and Algeria', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, pp. 103–110. doi: 10.1016/j.jgar.2017.02.010.

Mugnier, P. D. *et al.* (2010) 'Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*.', *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 16(1), pp. 35–40. doi: 10.3201/eid1601.090852.

Mulla, S., Kumar, A. and Rajdev, S. (2016) 'Comparison of MIC with MBEC Assay for *in vitro* Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm Forming Clinical Bacterial Isolates', *Advances in Microbiology*, 6(2), pp. 73–78. doi: 10.4236/aim.2016.62007.

Naas, T. *et al.* (2008) 'Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the betalactamase blaKPC Gene', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), pp. 1257–1263. doi: 10.1128/AAC.01451-07.

Nasri, E. *et al.* (2017) 'Abundance of carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM and blaOXA-48) in wastewater effluents from Tunisian hospitals', *Environmental Pollution*, 229, pp. 371–374. doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.095.

Network, E. S. of A. C. (2017) *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net)*. Available at: <https://ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/esac-net>



(Accessed: 5 August 2017).

Neu, H. C. and Fu, K. P. (1978) 'Clavulanic acid, a novel inhibitor of beta-lactamases.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 14(5), pp. 650–5. doi: 10.1128/AAC.14.5.650.

Nicolau, D. P. (2008) 'Carbapenems: a potent class of antibiotics', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(1), pp. 23–37. doi: 10.1517/14656566.9.1.23.

Nielsen, U. *et al.* (2013) 'Removal of APIs and bacteria from hospital wastewater by MBR plus O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAC or ClO<sub>2</sub>', *Water Science and Technology*, 67(4). doi: 10.2166/wst.2012.645.

Nigro, S. and Hall, R. M. (2015) 'Distribution of the *bla*<sub>OXA-23</sub>-containing transposons Tn 2006 and Tn 2008 in Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates: Figure?1.', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(8), pp. 2409–2411. doi: 10.1093/jac/dkv102.

Nix, D. E., Majumdar, A. K. and DiNubile, M. J. (2004) 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ertapenem: an overview for clinicians', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(suppl\_2), p. ii23-ii28. doi: 10.1093/jac/dkh205.

Nordmann, P. *et al.* (2011) 'Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(5), pp. 1070–1078. doi: 10.1093/jac/dkr056.

Nordmann, P. and Carrer, A. (2010) 'Les carbapénémases des entérobactéries', *Archives de Pédiatrie*. Elsevier, 17(SUPPL. 4), pp. S154–S162. doi: 10.1016/S0929-693X(10)70918-0.

Nordmann, P., Cuzon, G. and Naas, T. (2009) 'The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria', *The Lancet Infectious Diseases*, 9(4), pp. 228–236. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4.

Nordmann, P., Dortet, L. and Poirel, L. (2012) 'Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!', *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), pp. 263–272. doi: 10.1016/j.molmed.2012.03.003.

Novo, A. and Manaia, C. M. (2010) 'Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants', *Environmental biotechnology*, (87), pp. 1157–1166. doi: 10.1007/s00253-010-2583-6.

Oberlé, K. *et al.* (2012) 'Evidence for a Complex Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia Coli*: From Medical Center Patients to a Receiving Environment', *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society, 46(3), pp. 1859–1868. doi: 10.1021/es203399h.

Ohlsen, K. *et al.* (2003) 'Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage.', *Environmental microbiology*, 5(8), pp. 711–6. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00459.x.

Oliveira, R. *et al.* (2013) 'Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*)', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), pp. 903–912. doi: 10.1016/j.etap.2013.07.019.

Oliveira, S. *et al.* (2014) 'Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. CLSI, Wayne, PA, USA, 69(3), pp. 849–852. doi: 10.1093/jac/dkt431.

Oliveira, T. S., Al Aukidy, M. and Verlicchi, P. (2017) 'Occurrence of Common Pollutants and Pharmaceuticals in Hospital Effluents', in. doi: 10.1007/978-94-007-698-9\_9.

Oliver, A. *et al.* (2004) 'Hypermutation and the Preexistence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants: Implications for Susceptibility Testing and Treatment of Chronic Infections', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), pp. 4226–4233. doi: 10.1128/AAC.48.11.4226-4233.2004.

OMS (2016) 'OMS | Résistance aux antibiotiques', WHO. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/> (Accessed: 8 August 2017).

Oosterhuis, M., Sacher, F. and Ter Laak, T. L. (2013) 'Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data', *Science of the Total Environment*, 442, pp. 380–388. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.046.



- Orias, F. and Perrodin, Y. (2014) 'Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent', *Chemosphere*, 115, pp. 31–39. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.016.
- Ort, C., Lawrence, M. G., Reungoat, J., Eaglesham, G., *et al.* (2010) 'Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital', *Water Research*, 44(2), pp. 605–615. doi: 10.1016/j.watres.2009.08.002.
- Ort, C., Lawrence, M. G., Reungoat, J. and Mueller, J. F. (2010) 'Sampling for PPCPs in Wastewater Systems: Comparison of Different Sampling Modes and Optimization Strategies', *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society, 44(16), pp. 6289–6296. doi: 10.1021/es100778d.
- Ortiz de García, S. A. *et al.* (2014) 'Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants', *Ecotoxicology*. Springer US, 23(8), pp. 1517–1533. doi: 10.1007/s10646-014-1293-8.
- Oteo, J. *et al.* (2008) 'Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy.', *International journal of antimicrobial agents*, 32(6), pp. 534–7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.012.
- Papp-Wallace, K. M. *et al.* (2011) 'Carbapenems: past, present, and future', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 55(11), pp. 4943–60. doi: 10.1128/AAC.00296-11.
- Park, S. and Choi, K. (2008) 'Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems', *Ecotoxicology*. Springer US, 17(6), pp. 526–538. doi: 10.1007/s10646-008-0209-x.
- Pascoe, D., Karntanut, W. and Müller, C. T. (2003) 'Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*', *Chemosphere*, 51(6), pp. 521–528. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00860-3.
- Pasom, W. *et al.* (2013) 'Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes, *aacIb-cr*, *qnrS*, *qnrB*, and *qnrA*, in Urinary Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a Teaching Hospital, Thailand', *Japanese Journal of Infectious Diseases*. National Institute of Infectious Diseases, Japanese Journal of Infectious Diseases Editorial Committee, 66(5), pp. 428–432. doi: 10.7883/yoken.66.428.
- Passerat, J. *et al.* (2010) 'Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine', *European journal of water quality*. EDP Sciences, 41(1), pp. 1–13. doi: 10.1051/water/2010004.
- Paton, R. *et al.* (1993) 'ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2(2), pp. 81–87. doi: 10.1016/0924-8579(93)90045-7.
- Paulsen, I. T. *et al.* (1993) 'The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 37(4), pp. 761–8. doi: 10.1128/AAC.37.4.761.
- Pauwels, B. and Verstraete, W. (2006) 'The treatment of hospital wastewater: an appraisal.', *Journal of water and health*, 4(4), pp. 405–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17176811> (Accessed: 7 August 2017).
- Pérez-Parada, A. *et al.* (2011) 'Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd., 25(6), pp. 731–742. doi: 10.1002/rcm.4902.
- Picao, R. C. *et al.* (2008) 'Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 62(5), pp. 948–950. doi: 10.1093/jac/dkn341.
- Picão, R. C. *et al.* (2008) 'Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake.', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(5), pp. 948–50. doi: 10.1093/jac/dkn341.
- Picão, R. C. *et al.* (2013) 'The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(1), pp. 80–85. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.001.
- Picão, R. C. *et al.* (2013) 'The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on



- the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage.’, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 76(1), pp. 80–5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.001.
- Pintilie, L. (2012) ‘Quinolones: Synthesis and Antibacterial Activity’, *Antimicrobial Agents*. doi: DOI: 10.5772/33215.
- Piotrowska, M. and Popowska, M. (2014) ‘The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments’, *Annals of Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, 64(3), pp. 921–934. doi: 10.1007/s13213-014-0911-2.
- Poirel, L. *et al.* (2000) ‘Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(3), pp. 622–32. doi: 10.1128/AAC.44.3.622-632.2000.
- Poirel, L. *et al.* (2005) ‘Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), pp. 1118–1121. doi: 10.1093/jac/dki371.
- Poirel, L., Bonnin, R. A. and Nordmann, P. (2011) ‘Analysis of the Resistome of a Multidrug-Resistant NDM-1-Producing *Escherichia coli* Strain by High-Throughput Genome Sequencing’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), pp. 4224–4229. doi: 10.1128/AAC.00165-11.
- Poirel, L., Bonnin, R. A. and Nordmann, P. (2012) ‘Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 56(1), pp. 559–62. doi: 10.1128/AAC.05289-11.
- Poirel, L., Cattoir, V. and Nordmann, P. (2012) ‘Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies.’, *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 3, p. 24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00024.
- Poirel, L., Pitout, J. D. and Nordmann, P. (2007) ‘Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences’, *Future Microbiology*, 2(5), pp. 501–512. doi: 10.2217/17460913.2.5.501.
- Poole, K. (2000) ‘Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria.’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 44(9), pp. 2233–41. doi: 10.1128/AAC.44.9.2233-2241.2000.
- Poole, K. (2001) ‘Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms’, *J.Mol.Microbiol Biotechnol.*, 3(2), pp. 255–264.
- Poole, K. (2007) ‘Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms’, *Annals of Medicine*, 39(3), pp. 162–176. doi: 10.1080/07853890701195262.
- Potron, A. *et al.* (2011) ‘European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone’, *Clinical Microbiology and Infection*, 17(12), pp. E24–E26. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03669.x.
- Pouillard, J. (2002) ‘Une découverte oubliée : la thèse de médecine du docteur’, *Histoire Des Sciences Medicales*, pp. 11–20.
- Prado, T. *et al.* (2011) ‘Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants’, *Water Research*, 45(3), pp. 1287–1297. doi: 10.1016/j.watres.2010.10.012.
- Pulss, S. *et al.* (2017) ‘First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1’, *International Journal of Antimicrobial Agents*. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.014.
- Purevdorj-Gage, L. B. and Stoodley, P. (2004) ‘Biofilm Structure, Behavior, and Hydrodynamics’, in *Microbial Biofilms*. American Society of Microbiology, pp. 160–173. doi: 10.1128/9781555817718.ch9.
- Al Qarni, H. *et al.* (2016) ‘Investigating the removal of some pharmaceutical compounds in hospital wastewater treatment plants operating in Saudi Arabia’, *Environmental Science and Pollution Research*. Springer Berlin Heidelberg, 23(13), pp. 13003–13014. doi: 10.1007/s11356-016-6389-7.
- Queenan, A. M. *et al.* (2010) ‘Hydrolysis and Inhibition Profiles of  $\beta$ -Lactamases from Molecular Classes A to D with





- Doripenem, Imipenem, and Meropenem', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), pp. 565–569. doi: 10.1128/AAC.01004-09.
- Queenan, A. M. and Bush, K. (2007) 'Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases', *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), pp. 440–458. doi: 10.1128/CMR.00001-07.
- Queenan, A. M. and Bush, K. (2007) 'Carbapenemases: the versatile beta-lactamases.', *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology (ASM), 20(3), p. 440–58, table of contents. doi: 10.1128/CMR.00001-07.
- Quesada, S. P., Paschoal, J. A. R. and Reyes, F. G. R. (2013) 'Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones-A Review', *Journal of Food Science*, 78(9), pp. R1321–R1333. doi: 10.1111/1750-3841.12222.
- Quinteira, S., Ferreira, H. and Peixe, L. (2005) 'First Isolation of blaVIM-2 in an Environmental Isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), pp. 2140–2141. doi: 10.1128/AAC.49.5.2140-2141.2005.
- Ramoul, A. *et al.* (2016) 'Co-occurrence of bla NDM-1 with bla OXA-23 or bla OXA-58 in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Algeria', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, pp. 136–141. doi: 10.1016/j.jgar.2016.05.003.
- Rasheed, J. K. *et al.* (2008) 'Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid.', *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 46(6), pp. 2066–9. doi: 10.1128/JCM.02038-07.
- Rasmussen, B. A. and Bush, K. (1997) 'Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 41(2), pp. 223–32. doi: 0066-4804/97/\$04.00 0.
- Reading, C. and Cole, M. (1986) 'Structure-Activity Relationships Amongst  $\beta$ -Lactamase Inhibitors', *Journal of Enzyme Inhibition*. Taylor & Francis, 1(2), pp. 83–104. doi: 10.3109/14756368609020108.
- Rhodes, G. *et al.* (2000) 'Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 66(9), pp. 3883–90. doi: 10.1128/AEM.66.9.3883-3890.2000.
- Ricart, M. *et al.* (2009) 'Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria', *Chemosphere*, 76(10), pp. 1392–1401. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.017.
- Riera, E. *et al.* (2011) 'Pseudomonas aeruginosa carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), pp. 2022–2027. doi: 10.1093/jac/dkr232.
- Riethmuller, J. (2013) *La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes . un milieu sélectif et intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF*. Université de Strasbourg.
- Rincón, G. *et al.* (2014) 'First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump QepA in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(1), pp. 70–72. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.007.
- Robicsek, A. *et al.* (2006) 'Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase', *Nature Medicine*, 12(1), pp. 83–88. doi: 10.1038/nm1347.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A. and Hooper, D. C. (2006) 'The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance', *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10), pp. 629–640. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70599-0.
- Robinson, A. A., Belden, J. B. and Lydy, M. J. (2005) 'Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms.', *Environmental toxicology and chemistry*, 24(2), pp. 423–30. doi: 10.1897/04-210R.1.
- Rodloff, A. C., Goldstein, E. J. C. and Torres, A. (2006) 'Two decades of imipenem therapy', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(5), pp. 916–929. doi: 10.1093/jac/dkl354.



- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L. and Nordmann, P. (2009) 'Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), pp. 4783–4788. doi: 10.1128/AAC.00574-09.
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L. and Nordmann, P. (2009) 'Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*.' *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 53(5), pp. 1766–71. doi: 10.1128/AAC.01410-08.
- Rodríguez-Martínez, J. M. *et al.* (2007) 'Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for Enterobacteriaceae expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant qnrA1.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 51(6), pp. 2236–9. doi: 10.1128/AAC.01444-06.
- Rodríguez-Mozaz, S. *et al.* (2014) 'Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river.', *Water research*, 69C, pp. 234–242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021.
- Rodríguez-Mozaz, S. *et al.* (2015) 'Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river', *Water Research*, 69, pp. 234–242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021.
- Rodríguez-Rojas, A. *et al.* (2013) 'Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution', *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), pp. 293–297. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.004.
- Rolinson, G. N. (1990) 'Evolution of beta-lactamase inhibitors.', *Reviews of infectious diseases*, 13 Suppl 9, pp. S727–32.
- Rossolini, G. M. and Walsh, Timothy amicosante, G. (1996) 'The Aeromonas Metallo-β-Lactamases: Genetics, Enzymology, and Contribution to Drug Resistance', *Microbial Drug Resistance*, 2(2), pp. 245–252. doi: 10.1089/mdr.1996.2.245.
- Santos, L. H. M. L. M. *et al.* (2013) 'Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals', *Science of The Total Environment*, 461–462, pp. 302–316. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.077.
- Savage, V. J., Chopra, I. and O'Neill, A. J. (2013) 'Staphylococcus aureus biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 57(4), pp. 1968–70. doi: 10.1128/AAC.02008-12.
- Schwartz, T. *et al.* (2003) 'Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms', *FEMS Microbiology Ecology*. Academic Press, London, 43(3), pp. 325–335. doi: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x.
- Schweizer, H. P. (2003) 'Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions', *Genet Mol Res*, 2(1), pp. 48–62. doi: S01 [pii].
- Seifrtová, M. *et al.* (2008) 'Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer-Verlag, 391(3), pp. 799–805. doi: 10.1007/s00216-008-2020-1.
- Shannon, K., King, A. and Phillips, I. (1986) 'β-Lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 17(1), pp. 45–50. doi: 10.1093/jac/17.1.45.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q. and Li, X.-Y. (2010) 'Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review', *Biotechnology Advances*, 28(6), pp. 882–894. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.001.
- Sim, W.-J. *et al.* (2011) 'Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures', *Chemosphere*, 82(2), pp. 179–186. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.026.



- Simões, L. C., Simões, M. and Vieira, M. J. (2010) 'Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 76(19), pp. 6673–9. doi: 10.1128/AEM.00872-10.
- Simões, M., Simões, L. C. and Vieira, M. J. (2010) 'A review of current and emergent biofilm control strategies', *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), pp. 573–583. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008.
- Skálová, A. *et al.* (2016) 'Molecular characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic: evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), p. AAC.01889-16. doi: 10.1128/AAC.01889-16.
- Slekovec, C. *et al.* (2012) 'Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network.', *PLoS one*. Public Library of Science, 7(12), p. e49300. doi: 10.1371/journal.pone.0049300.
- Smith, G. B. *et al.* (1990) 'Stability and Kinetics of Degradation of Imipenem in Aqueous Solution', *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Prentice-Hall, Inglewood Cliffs, NJ, 79(8), pp. 732–740. doi: 10.1002/jps.2600790816.
- Sørensen, S. J. *et al.* (2005) 'Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review.', *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp. 700–710. doi: 10.1038/nrmicro1232.
- Sørum, H. *et al.* (2003) 'Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 47(4), pp. 1285–90. doi: 10.1128/AAC.47.4.1285-1290.2003.
- De Souza, S. M. L. *et al.* (2009) 'Environmental risk assessment of antibiotics: An intensive care unit analysis', *Chemosphere*, 77(7), pp. 962–967. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.010.
- Stewart, P. S. (2003) 'Diffusion in biofilms.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 185(5), pp. 1485–91. doi: 10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003.
- Stickler, D. J. and Morgan, S. D. (2008) 'Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters', *Journal of Hospital Infection*, 69(4), pp. 350–360. doi: 10.1016/j.jhin.2008.04.031.
- Struelens, M. J. *et al.* (2010) 'New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe.', *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(46). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144431> (Accessed: 26 June 2017).
- Sturini, M. *et al.* (2009) 'Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters', *Journal of Separation Science*, 32(17), pp. 3020–3028. doi: 10.1002/jssc.200900135.
- Sturini, M. *et al.* (2012a) 'Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts', *Water Research*, 46(17), pp. 5575–5582. doi: 10.1016/j.watres.2012.07.043.
- Sturini, M. *et al.* (2012b) 'Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts', *Water Research*, 46(17), pp. 5575–5582. doi: 10.1016/j.watres.2012.07.043.
- Subirats, J. *et al.* (2017) 'Real-time PCR assays for the detection and quantification of carbapenemase genes (bla KPC, bla NDM, and bla OXA-48) in environmental samples', *Environmental Science and Pollution Research*. doi: 10.1007/s11356-017-8426-6.
- Suda, K. J. *et al.* (2014) 'Trends and Seasonal Variation in Outpatient Antibiotic Prescription Rates in the United States, 2006 to 2010', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), pp. 2763–2766. doi: 10.1128/AAC.02239-13.
- Szczepanowski, R. *et al.* (2009) 'Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics.', *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 7), pp. 2306–19. doi: 10.1099/mic.0.028233-0.
- Szekeres, E. *et al.* (2017) 'Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals', *Environmental Pollution*, 225, pp. 304–315. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.054.
- Tacão, M., Correia, A. and Henriques, I. S. (2015) 'Low Prevalence of Carbapenem-Resistant Bacteria in River Water:



- Resistance Is Mostly Related to Intrinsic Mechanisms’, *Microbial Drug Resistance*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 21(5), pp. 497–506. doi: 10.1089/mdr.2015.0072.
- Tafoukt, R. *et al.* (2017) ‘Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from river water in Algeria’, *Water Research*, 120, pp. 185–189. doi: 10.1016/j.watres.2017.04.073.
- Takasu, H. *et al.* (2011) ‘Fluoroquinolone (FQ) Contamination Does Not Correlate with Occurrence of FQ-Resistant Bacteria in Aquatic Environments of Vietnam and Thailand’, *Microbes Environ*, 26(2), pp. 135–143. doi: 10.1264/jisme2.ME10204.
- Takeuchi, Y. *et al.* (1995) ‘Stability of a 1.BETA.-Methylcarbapenem Antibiotic, Meropenem(SM-7338) in Aqueous Solution.’, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. The Pharmaceutical Society of Japan, 43(4), pp. 689–692. doi: 10.1248/cpb.43.689.
- Tamtam, F. *et al.* (2011) ‘A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments’, *Journal of Soils and Sediments*. Springer-Verlag, 11(5), pp. 852–859. doi: 10.1007/s11368-011-0364-1.
- Tanner, W. D. *et al.* (2015) ‘Development and field evaluation of a method for detecting carbapenem-resistant bacteria in drinking water’, *Systematic and Applied Microbiology*, 38(5), pp. 351–357. doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.010.
- Tchobanoglous, G. *et al.* (2003) *Wastewater engineering : treatment and reuse*. McGraw-Hill.
- Teschler, J. K. *et al.* (2015) ‘Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms.’, *Nature reviews. Microbiology*. NIH Public Access, 13(5), pp. 255–68. doi: 10.1038/nrmicro3433.
- Thomas, K. V. *et al.* (2007) ‘Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works’, *Journal of Environmental Monitoring*, 9(12), p. 1410. doi: 10.1039/b709745j.
- Thomson, K. S. (2010) ‘Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues.’, *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, 48(4), pp. 1019–25. doi: 10.1128/JCM.00219-10.
- Tobajas, M. *et al.* (2016) ‘Assessment of toxicity and biodegradability on activated sludge of priority and emerging pollutants’, *Environmental Technology*, 37(6), pp. 713–721. doi: 10.1080/09593330.2015.1079264.
- Togola, A. (2006) ‘Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques’, <http://www.theses.fr>. Bordeaux I. Available at: <http://www.theses.fr/2006BOR13314> (Accessed: 5 August 2017).
- Touzé, T. *et al.* (2004) ‘Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system’, *Molecular Microbiology*, 53(2), pp. 697–706. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04158.x.
- Tuméo, E. *et al.* (2008) ‘Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents?’, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(1–2), pp. 200–204. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.02.010.
- Tzouveleakis, L. S. *et al.* (2012) ‘Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions’, *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), pp. 682–707. doi: 10.1128/CMR.05035-11.
- Varela, A. R. *et al.* (2013) ‘Vancomycin resistant enterococci: From the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant’, *Science of The Total Environment*, 450–451, pp. 155–161. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.015.
- Varela, A. R. *et al.* (2014) ‘Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system’, *Water Research*, 54, pp. 327–336. doi: 10.1016/j.watres.2014.02.003.
- Varela, A. R., Nunes, O. C. and Manaia, C. M. (2016) ‘Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater’, *Science of The Total Environment*, 542, pp. 665–671. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.124.
- Vasconcelos, T. G. *et al.* (2009) ‘Ciprofloxacin in hospital effluent: Degradation by ozone and photoprocesses’, *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), pp. 1154–1158. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.143.
- Vaz-Moreira, I. *et al.* (2016) ‘Multidrug Resistance in Quinolone-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from





Hospital Effluent and the Municipal Wastewater Treatment Plant', *Microbial Drug Resistance*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 22(2), pp. 155–163. doi: 10.1089/mdr.2015.0118.

Verlicchi, P. *et al.* (2012) 'Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment', *The Science of the total environment*, 430, pp. 109–118. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055.

Verlicchi, P. *et al.* (2012) 'Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment', *Science of The Total Environment*, 430, pp. 109–118. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055.

Verlicchi, P. (2016) 'Pharmaceutical Concentrations and Loads in Hospital Effluents: Is a Predictive Model or Direct Measurement the Most Accurate Approach?', in: Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–33. doi: 10.1007/978-94-007-4942-9\_8.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M. and Zambello, E. (2015) 'What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives', *Science of The Total Environment*, 514, pp. 467–491. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.02.020.

Verlicchi, P., Galletti, A. and Al Aukidy, M. (2013) 'Hospital Wastewaters: Quali-Quantitative Characterization and for Strategies for Their Treatment and Disposal', in *Wastewater Reuse and Management*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 225–251. doi: 10.1007/978-94-007-4942-9\_8.

Verlicchi, P., Galletti, A. and Masotti, L. (2010) 'Management of hospital wastewaters: the case of the effluent of a large hospital situated in a small town', *Water Science and Technology*, 61(10). Available at: <http://wst.iwaponline.com/content/61/10/2507> (Accessed: 7 August 2017).

Verlicchi, P. and Zambello, E. (2016) 'Predicted and measured concentrations of pharmaceuticals in hospital effluents. Examination of the strengths and weaknesses of the two approaches through the analysis of a case study', *Science of The Total Environment*, 565, pp. 82–94. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.165.

Vo, T.-D.-H. *et al.* (2016) 'Investigation of antibiotics in health care wastewater in Ho Chi Minh City, Vietnam', *Environmental Monitoring and Assessment*. Springer International Publishing, 188(12), p. 686. doi: 10.1007/s10661-016-5704-6.

Walsh, T. R. (2008) 'Clinically significant carbapenemases: an update', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(4), pp. 367–371. doi: 10.1097/QCO.0b013e328303670b.

Walsh, T. R. (2010) 'Emerging carbapenemases: a global perspective', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, pp. S8–S14. doi: 10.1016/S0924-8579(10)70004-2.

Walsh, T. R. *et al.* (2011) 'Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study', *The Lancet Infectious Diseases*, 11(5), pp. 355–362. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7.

Walther-Rasmussen, J. and Høiby, N. (2006) 'OXA-type carbapenemases', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), pp. 373–383. doi: 10.1093/jac/dki482.

Wangsaatmaja, S. (1997) *Environmental action plan for a hospital*. Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. Available at: <http://faculty.ait.ac.th/visu/public/uploads/images/pdf/1997/SetiawanWangsaatmaja.pdf>.

Wareham, D. W. and Bean, D. C. (2006) 'In-vitro activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases.', *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. BioMed Central, 5, p. 10. doi: 10.1186/1476-0711-5-10.

Watkinson, A. J. *et al.* (2009) 'The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water', *Science of The Total Environment*, 407(8), pp. 2711–2723. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.059.

Webster, D. P. *et al.* (2010) 'Emergence of carbapenem resistance due to porin loss in an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strain during meropenem therapy.', *International journal of antimicrobial agents*, 36(6), pp. 575–6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.08.003.



- Wen, Y. *et al.* (2016) 'High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance and IncQ Plasmids Carrying qnrS2 Gene in Bacteria from Rivers near Hospitals and Aquaculture in China.', *PLoS one*. Public Library of Science, 11(7), p. e0159418. doi: 10.1371/journal.pone.0159418.
- WHO (2014) 'WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014', *WHO*. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (Accessed: 9 August 2017).
- Wiest, L. *et al.* (2017) 'Two-year survey of specific hospital wastewater treatment and its impact on pharmaceutical discharges', *Environmental Science and Pollution Research*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–12. doi: 10.1007/s11356-017-9662-5.
- Von Wintersdorff, C. J. H. *et al.* (2016) 'Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 7, p. 173. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173.
- Wolff, M., Jolyguillou, M. and Pajot, O. (2008) 'Le point sur les carabapénèmes', *Réanimation*, 17(3), pp. 242–250. doi: 10.1016/j.reaurg.2008.03.001.
- Xia, R., Ren, Y. and Xu, H. (2013) 'Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance *qnr* Genes in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria from Hospital Wastewaters and Receiving Waters in the Jinan Area, China', *Microbial Drug Resistance*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 19(6), pp. 446–456. doi: 10.1089/mdr.2012.0210.
- Xu, H., Davies, J. and Miao, V. (2007) 'Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 189(17), pp. 6276–83. doi: 10.1128/JB.00348-07.
- Xu, J. *et al.* (2015) 'Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river', *Chemosphere*, 119, pp. 1379–1385. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.040.
- Yan, L. *et al.* (2017) 'Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 7, p. 40610. doi: 10.1038/srep40610.
- Yang, F. *et al.* (2016) 'Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China', *PLOS ONE*. Edited by J. Kluymans. Public Library of Science, 11(5), p. e0156383. doi: 10.1371/journal.pone.0156383.
- Yang, Y., Bhachech, N. and Bush, K. (1995) 'Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases.', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 35(1), pp. 75–84. doi: 10.1093/jac/35.1.75.
- Yigit, H. *et al.* (2001) 'Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), pp. 1151–1161. doi: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.
- Zaccardelli, D. S. *et al.* (1990) 'Stability of Imipenem and Cilastatin Sodium in Total Parenteral Nutrient Solution', *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. Sage Publications Sage CA: Thousand Oaks, CA, 14(3), pp. 306–309. doi: 10.1177/0148607190014003306.
- Zhanel, G. G. *et al.* (2007) 'Comparative Review of the Carbapenems', *Drugs*. Springer International Publishing, 67(7), pp. 1027–1052. doi: 10.2165/00003495-200767070-00006.
- Zhang, C. *et al.* (2013) 'Higher Isolation of NDM-1 Producing *Acinetobacter baumannii* from the Sewage of the Hospitals in Beijing', *PLoS ONE*. Edited by R. Schuch. Public Library of Science, 8(6), p. e64857. doi: 10.1371/journal.pone.0064857.
- Zhang, L., Li, X.-Z. and Poole, K. (2001) 'Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 48(4), pp. 549–552. doi: 10.1093/jac/48.4.549.
- Zhang, X.-X. *et al.* (2009) 'Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants', *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag, 82(6), pp. 1169–1177. doi: 10.1007/s00253-009-1886-y.



Zhang, Y. *et al.* (2016) 'Toxicity assessment of combined fluoroquinolone and tetracycline exposure in zebrafish ( *Danio rerio* )', *Environmental Toxicology*, 31(6), pp. 736–750. doi: 10.1002/tox.22087.

Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera', *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society, 51(1), pp. 570–580. doi: 10.1021/acs.est.6b03132.

Zhao, J. *et al.* (2010) 'Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology, 54(10), pp. 4219–24. doi: 10.1128/AAC.00139-10.

Zhao, J.-L. *et al.* (2010) 'Occurrence and a screening-level risk assessment of human pharmaceuticals in the Pearl River system, South China', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), p. n/a-n/a. doi: 10.1002/etc.161.

Zhao, W.-H. and Hu, Z.-Q. (2011) 'IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons', *Critical Reviews in Microbiology*, 37(3), pp. 214–226. doi: 10.3109/1040841X.2011.559944.

Zhao, W.-H. and Hu, Z.-Q. (2014) 'Integrons: epidemiological molecular markers for identifying and surveying metallo- $\beta$ -lactamase genes in Gram-negative bacilli', *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd London, UK, 9(1), pp. 5–8. doi: 10.2217/fmb.13.21.

Zuccato, E. *et al.* (2010) 'Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment', *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), pp. 1042–1048. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.03.110.

Zurfluh, K. *et al.* (2017) 'Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase and 16s rRNA methylase producing enterobacteriaceae', *International Journal of Antimicrobial Agents*. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.017.



# Annexes





**Annexe 1 :** Revue de la littérature des espèces bactériennes porteuses de carbapénèmases (BIC, CMY, GES, IMI, IMP, KPC, NDM, OXA, PER, SPM, VIM et association) détectées dans divers environnements aquatiques selon les pays, le mode de sélection avec ou sans antibiotiques (CTX : cefotaxime, MRP : méropénème, CZD : ceftazidime, IMP : imipénème, AMP : ampicilline)

Carbapénèmases	Gènes détectés	Compartiment aquatique	Pays	Sélection des espèces	Méthode de détection	Espèce	Référence
<b>BIC</b>	<i>bla<sub>BIC-1</sub></i>	Rivière	France	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Girlich, Poirel and Nordmann, 2010)
	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	Rivière	Tunisie	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Chouchani <i>et al.</i> , 2013)
<b>CMY</b>	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	Rivière	Tunisie	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Proteus mirabilis</i>	(Chouchani <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	Rivière	Tunisie	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Chouchani <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla<sub>GES-1</sub></i>	Eau usée	Portugal	/	/	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Manageiro et al 2013)
<b>GES</b>	<i>bla<sub>GES-3</sub></i>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla<sub>GES-5</sub></i>	Effluent hospitalier	Brésil	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella oxytoca</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla<sub>GES-5</sub></i>	Effluent hospitalier	Brésil	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla<sub>GES-1</sub></i>	STEP	Chine	/	Q-PCR	/	(Yang et al 2016)
	<i>bla<sub>GES-16</sub></i>	Rivières	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Montezzi <i>et al.</i> , 2015)
	<i>bla<sub>GES-16</sub></i>	Rivières	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Montezzi <i>et al.</i> , 2015)
	<i>bla<sub>GES-5</sub></i>	Rivières	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Montezzi <i>et al.</i> , 2015)
	<b>IMI</b>	<i>bla<sub>IMI-1</sub></i>	Rivières	USA	AMP 100 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter asburiae</i>
<b>IMP</b>	<i>bla<sub>IMP-1</sub></i>	Station d'épuration	Chine	/	Q-PCR	/	(Yang et al 2016)



	<i>bla</i> <sub>IMP-10</sub>	Rivière	Tunisie	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Chouchani <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>IMP-13</sub>	Rivière	Tunisie	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Chouchani <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>IMP-13</sub> & <i>bla</i> <sub>IMP-2</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>IMP-2</sub> & <i>bla</i> <sub>IMP-5</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>IMP-4</sub>	Effluent hospitalier	Chine	MRP 8µg/ml	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	Zhang et al 2012
	<i>bla</i> <sub>IMP-8</sub>	Rivière	Portugal	IMP 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Kieffer, Poirel, Lucinda J Bessa, <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>IMP-8</sub>	Rivière	Tunisie	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Chouchani <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>IMP-9</sub> & <i>bla</i> <sub>IMP-11</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<b>KPC</b>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter/Pantoea</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Kluyvera georgiana</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	CZD 4 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter/Pantoea</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	CZD 4 µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Rivière	Roumanie/Bulgarie	ChromoID CARBA	PCR	<i>Enterobacter asburiae</i>	(Kittinger <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Rivière	Serbie	ChromoID CARBA	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Kittinger <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	Selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Miranda <i>et al.</i> , 2015)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)



<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Renata C Picão et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Renata C Picão et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	pas précisé	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Chagas et al., 2011)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Renata C Picão et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Kluyvera spp</i>	(Renata C Picão et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Raoultella spp</i>	(Renata C Picão et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Serratia spp</i>	(Renata C Picão et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Chine	MRP 8µg/ml	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zhang et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Chine	MRP 8µg/ml	PCR	<i>Enterobacter cloacae</i>	(Zhang et al., 2013)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Portugal	/	Q-PCR	/	(Subirats et al., 2017)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh et al., 2017)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Effluent hospitalier	Tunisie	/	Q-PCR	/	(Nasri et al., 2017)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Rivière	Brésil	CHROMagar KPC	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Oliveira et al., 2014)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Rivière	Portugal	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Poirel, Bonnin and Nordmann, 2012)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Rivières	Portugal	/	Q-PCR	Biofilm	(Subirats et al., 2017)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Rivières	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Montezzi et al., 2015)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Rivières	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Montezzi et al., 2015)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Rivières	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Montezzi et al., 2015)
<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Rivières	Brésil	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Kluyvera spp</i>	(Montezzi et al., 2015)



	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	/	Q-PCR	/	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Enterococcus spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Escherichia spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Paenibacillus spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Shigella spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Stenotrophomonas spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Wautersiella spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Brésil	IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Renata C Picão <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Brésil	IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Renata C Picão <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Brésil	IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Renata C Picão <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Brésil	IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Kluyvera spp</i>	(Renata C Picão <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Brésil	IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Raoultella spp</i>	(Renata C Picão <i>et al.</i> , 2013)
	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	STEP	Brésil	IMP 1 µg/ml	PCR	<i>Serratia spp</i>	(Renata C Picão <i>et al.</i> , 2013)
<b>NDM</b>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Eau de mer	Ireland	/	Q-PCR	/	(Mahon <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>NDM-5</sub>	Eaux usées urbaines	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)





<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Eau usée	Ireland	/	Q-PCR	/	(Mahon <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Effluent hospitalier	Portugal	/	Q-PCR	/	(Subirats <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	CZD 4 µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter jujini</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Enterobacter/Pantoea</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas spp</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter jujini</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Effluent hospitalier	Singapour	MRP 4 µg/ml	PCR	<i>Comamonas testosteroni</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Effluent hospitalier	Chine	IMP 10 µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter baumannii</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Effluent hospitalier	Inde	MacConkey agar plate	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran <i>et al.</i> , 2014)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Effluent hospitalier	Tunisie	/	Q-PCR	/	(Nasri <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Effluent hospitalier	Inde	MacConkey agar plate	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran <i>et al.</i> , 2014)
<i>bla</i> <sub>NDM-9</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Rivière	Serbie	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kitinger et al 2016
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Rivières	Portugal	/	Q-PCR	Biofilm	(Subirats <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Rivière	France	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Almakki <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Rivières	Vietnam	VAN + MRP0,5µg/ml	PCR	<i>Klesbiella pneumoniae</i>	(Isozumi <i>et al.</i> , 2012)



<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Achromobacter spp</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Kingella denitrificans</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas putida</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Shigella boydii</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)



	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Sutonella indologenes</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Eaux stagnantes	Inde	VAN +MRP 0,5µg/ml ou CTX 20µg/ml et VAN 100 µg/ml	PCR	<i>Vibrio cholerae</i>	(Walsh <i>et al.</i> , 2011)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1µg/ml	Q-PCR	/	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1µg/ml	PCR	<i>Acinetobacter seohaensis</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterococcus faecium</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1µg/ml	PCR	<i>Shigella sonnei</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	STEP	Chine	AMP 100 µg/ml et IMP 1µg/ml	PCR	<i>Wautersiella spp</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>NDM-5</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>NDM-5</sub>	Eau d'entrée de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<b>OXA</b>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>OXA-10</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>OXA-181</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-181</sub>	Eau d'entrée de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-181</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)



<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-21</sub> et <i>bla</i> <sub>OXA-53</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-204</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-204</sub>	Rivière	Portugal	IMP 8µg/ml	PCR	<i>Shewanella xiamenensis</i>	(Tação, Correia and Henriques, 2015)
<i>bla</i> <sub>OXA-22</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA244</sub>	Rivière	Algérie	ERT 0,5µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Tafoukt <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-27</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-27</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-309</sub>	Eau usée	Portugal	/	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Manageiro <i>et al.</i> , 2012)
<i>bla</i> <sub>OXA40</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-40</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-46</sub> et <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Eau d'entrée de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Eau d'entrée de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)





<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Eaux usées urbaines	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Enterobacter cloacae</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Effluent hospitalier	Tunisie	/	Q-PCR	/	(Nasri <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Flaque d'eau	Maroc	IMP 0,5µg/ml	PCR	<i>Serratia marscecens</i>	(Potron <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Rivière	Algérie	ERT 0,5µg/ml	PCR	<i>Citrobacter braakii</i>	(Tafoukt <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Rivière	Algérie	ERT 0,5µg/ml	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Tafoukt <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Rivière	Algérie	ERT 0,5µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Tafoukt <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Rivière	Algérie	ERT 0,5µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Tafoukt <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Rivière	Algérie	ERT 0,5µg/ml	PCR	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	(Tafoukt <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Rivière	Portugal	IMP 8 µg/ml	PCR	<i>Shewanella xiamenensis</i>	(Tacão, Correia and Henriques, 2015)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Rivière	Portugal	IMP 8 µg/ml	PCR	<i>Shewanella xiamenensis</i>	(Tacão, Correia and Henriques, 2015)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> like	Effluent hospitalier	Portugal	/	Q-PCR	/	(Subirats <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> like	Rivières	Portugal	/	Q-PCR	Biofilm	(Subirats <i>et al.</i> , 2017)
<i>bla</i> <sub>OXA-5</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)



	<i>bla</i> <sub>OXA-50</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>OXA-75</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>OXA-9</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<b>PER</b>	<i>bla</i> <sub>PER-2</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
<b>SPM</b>	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	Selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Miranda <i>et al.</i> , 2015)
	<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	Selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonasaeruginosas</i>	(Fuentefria, Ferreira and Corção, 2011)
<b>VIM</b>	<i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>	Eau usée	Allemagne	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Issus de l'extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Effluent hospitalier	Brésil	selective asparagine	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Miranda <i>et al.</i> , 2015)
	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Enterobacter aerogenes</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Eau d'entrée de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Enterobacter aerogenes</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Rivière et eaux usées	Brésil	IMP 2µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	(Quinteira, Ferreira and Peixe, 2005)
	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Rivière et eaux usées	Brésil	IMP 2µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	(Quinteira, Ferreira and Peixe, 2005)
	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Rivière	Portugal	IMP 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Kieffer, Poirel, Lucinda J Bessa, <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Rivière	Tunisie	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Chouchani <i>et al.</i> , 2013)



	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	Rivière	Portugal	IMP 8 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas genicola</i>	(Tacão, Correia and Henriques, 2015)
	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	Rivière	Portugal	IMP 8 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas putida</i>	(Tacão, Correia and Henriques, 2015)
	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	Rivière	Portugal	IMP 8 µg/ml	PCR	<i>Pseudomonas spp</i>	(Tacão, Correia and Henriques, 2015)
	<i>bla</i> <sub>VIM-34</sub>	Rivière	Portugal	IMP 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Kieffer, Poirel, Lucinda J Bessa, <i>et al.</i> , 2016)
	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Rivière	Suisse	CRE agar	PCR	<i>klebsiella pneumoniae susbp pneumoniae</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
Associations	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Effluent hospitalier	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> & <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	Eau de sortie de STEP	Suisse	ChromoID CARBA SMART	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Zurfluh <i>et al.</i> , 2017)



**Annexe 2 :** Revue de la littérature des espèces bactéries porteuses de gène de résistance aux fluoroquinolones plasmidiques (*aac(6')-lb-cr, oqxAB, qepA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS* et association) détectées dans divers environnements aquatiques selon les pays, le mode de selection avec ou sans antibiotiques (CTX : cefotaxime, , CIP : ciprofloxacine, NOR : norloxacine, OFL : ofloxacine, GAT : gatefloxacine)

	Compartiment aquatique	Pays	Gènes détectés	Selection des espèces	Methode de detection	Espèce	Auteur
	Eau de sortie de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Eau de sortie de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
	Eau d'entrée de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Eau d'entrée de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Eau d'entrée de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
	Eau aquaculture	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Morganella Morganii</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
	Eau aquaculture	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
<b>aac(6')-lb-cr</b>	Eaux usées	Algérie	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Eaux usées	Algérie	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Eaux de surface de ville	Vietnam	<i>aac(6')-lb-cr</i>	OFL, NOR et OFL 16 µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Takasu <i>et al.</i> , 2011)
	Eau de sortie de la station d'épuration	Algérie	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Eau de sortie de la station d'épuration	Algérie	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)





Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter mori</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Morganella Morganii</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Proteus mirabilis</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
Effluent hospitalier	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
Effluent hospitalier	Inde	<i>aac(6')-lb-cr</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran <i>et al.</i> , 2014)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Proteus spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Shigella spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Environnement (non précisé)	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	non précisé	PCR	<i>Non précisé</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
Environnement (sol et eau)	Chine	<i>aac(6')-lb-cr</i>	Eosin methylene blue	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(J. Zhao <i>et al.</i> , 2010)
Rivière	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
Rivière	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
STEP	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
STEP	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)



<b>oqxAB</b>	Effluent hospitalier	Brésil	<i>oqxAB</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
	Effluent hospitalier	Chine	<i>oqxAB</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
	Effluent hospitalier	Inde	<i>oqxAB</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran <i>et al.</i> , 2014)
	Environnement (non précisé)	Chine	<i>oqxAB</i>	non précisé	PCR	Non précisé	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
	Environnement (sol et eau)	Chine	<i>oqxAB</i>	Eosin methylene blue	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(J. Zhao <i>et al.</i> , 2010)
	Rivière	Brésil	<i>oqxAB</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
	Effluent hospitalier	Chine	<i>oqxAB</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
<b>qepA</b>	Effluent hospitalier	Inde	<i>qepA</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran <i>et al.</i> , 2014)
	Effluent hospitalier	Chine	<i>qepA</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
	Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qepA</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
<b>qnrA</b>	Eaux usées	Allemagne	<i>qnrA</i>	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	Eau de mer	Espagne	<i>qnrA</i>	/	Q-PCR	/	(Marti and Balcázar, 2013)
	Eaux usées	Allemagne	<i>qnrA3</i>	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	Effluent hospitalier	Espagne	<i>qnrA</i>	/	Q-PCR	/	(Marti and Balcázar, 2013)
	Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrA</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017) Lei Yan et al 2017
	Effluent hospitalier	Singapour	<i>qnrA</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Singapour	<i>qnrA</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrA</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)



	Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrA</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Proteus spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
	Environnement (non précisé)	Chine	<i>qnrA</i>	non précisé	PCR	Non précisé	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
	Rivières (4)	Brésil	<i>qnrA-like</i>	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Montezzi <i>et al.</i> , 2015)
<b>qnrB</b>	Effluent hospitalier	Espagne	<i>qnrB</i>	/	Q-PCR	/	(Marti and Balcázar, 2013)
	Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrB</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
	Effluent hospitalier	Inde	<i>qnrB</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran <i>et al.</i> , 2014)
	Effluent hospitalier	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016b)
	Effluent hospitalier	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016b)
	Effluent hospitalier	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016b)
	Effluent hospitalier	Singapour	<i>qnrB</i>	CIP 2 µg/mL	PCR	<i>Shighella/E. coli</i>	(Le <i>et al.</i> , 2016b)
	Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
	Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
	Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Proteus spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Shigella spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)	



des effluents hospitaliers							
	Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrB</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Citrobacter spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
	Environnement (non précisé)	Chine	<i>qnrB</i>	non précisé	PCR	<i>Non précisé</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
	Environnement (sol et eau)	Chine	<i>qnrB6</i>	Eosin methylene blue	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(J. Zhao <i>et al.</i> , 2010)
	Eaux usées	Algérie	<i>qnrB1</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Eaux usées	Algérie	<i>qnrB1</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Eaux usées	Allemagne	<i>qnrB4</i>	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	<i>Extraction de plasmide</i>	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	Eau de sortie de la station d'épuration	Algérie	<i>qnrB1</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Eau de sortie de la station d'épuration	Algérie	<i>qnrB1</i>	CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Alouache <i>et al.</i> , 2014)
	Eaux de surface (elevage)	Vietnam	<i>qnrB</i>	OFL, NOR et OFL 16ug/ml	PCR	<i>Brevundimonas diminuta</i>	(Takasu <i>et al.</i> , 2011)
	Eaux de surface (elevage)	Vietnam	<i>qnrB</i>	OFL, NOR et OFL 16ug/ml	PCR	<i>Blastobacter aggregatus</i>	(Takasu <i>et al.</i> , 2011)
	Eau aquaculture	Thaïlande	<i>qnrB</i>	OFL, NOR et OFL 16ug/ml	PCR	<i>Jonibacter anophelis</i>	(Takasu <i>et al.</i> , 2011)
	Eau de mer	Espagne	<i>qnrB</i>	/	Q-PCR	/	(Marti and Balcázar, 2013)
	Rivières (4)	Brésil	<i>qnrB-like</i>	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Kluyvera spp</i>	(Montezzi <i>et al.</i> , 2015)
	Rivières (4)	Brésil	<i>qnrB-like</i>	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Montezzi <i>et al.</i> , 2015)
<b>qnrC</b>	Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrC</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
<b>qnrD</b>	Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrD</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
<b>qnrS</b>	Effluent hospitalier	Espagne	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Rodriguez-Mozaz <i>et al.</i> , 2015)





Effluent hospitalier	Espagne	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Marti and Balcázar, 2013)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Yan <i>et al.</i> , 2017)
Effluent hospitalier	Inde	<i>qnrS</i>	Milieu MacConkey	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Chandran <i>et al.</i> , 2014)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS1</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS1</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Portugal	<i>qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Enterococcus faecalis</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS1</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter hormaechi</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrS</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Klebsiella spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrS</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Effluent hospitalier ou Rivière en aval des effluents hospitaliers	Chine	<i>qnrS</i>	GAT 5 µg/ml et autres antibiotiques	PCR	<i>Enterobacter spp</i>	(Xia, Ren and Xu, 2013)
Eau d'entrée de la station d'épuration	Espagne	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Rodriguez-Mozaz <i>et al.</i> , 2015)
Environnement (non précisé)	Chine	<i>qnrS</i>	non précisé	PCR	Non précisé	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
Environnement (sol et eau)	Chine	<i>qnrS1</i>	Eosin methylene blue	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(J. Zhao <i>et al.</i> , 2010)
Rivière	Espagne	<i>qnrS</i>	/	Q-PCR	/	(Marti and Balcázar, 2013)
Rivière	Suisse	<i>qnrS2</i>	pas précisé	PCR	<i>A. allosaccharophila</i>	(Picao <i>et al.</i> , 2008)
Rivière	France	<i>qnrS2</i>	Milieu Chromogenic URISelect	PCR	<i>Aeromonas punctata</i>	(Cattoir <i>et al.</i> , 2008)



	STEP	Espagne	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
	Eaux de surface (elevage)	Vietnam	<i>qnrS</i>	OFL, NOR et OFL 16µg/ml	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Takasu <i>et al.</i> , 2011)
	Eau aquaculture	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
	Eau aquaculture	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas veronii</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
	Eau propre	Chine	<i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Escherichia coli</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
	Eaux usées	Allemagne	<i>qnrS2</i>	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	Eau de sortie de la station d'épuration	Portugal	<i>qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
	Eau d'entrée de la station d'épuration	Portugal	<i>qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
	Rivières (4)	Brésil	<i>qnrS-like</i>	IMP 1µg/ml	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Montezzi <i>et al.</i> , 2015)
Associations	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et oqxAB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et qnrB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et qnrB et qnrS</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter ludwigii</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>qnrB et oqxAB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et oqxAB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et qnrB</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Citrobacter freundii</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et qnrB et qnrS</i>	CIP 4 µg/mL	PCR	<i>Enterobacter ludwigii</i>	(Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
	Effluent hospitalier	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr et qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
	Effluent hospitalier	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr et oqxAB</i>	Milieu Mac conkey avec CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)



Effluent hospitalier	Brésil	<i>oqxAB</i> et <i>qnrS</i>	Milieu Mac conkey avec CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
Effluent hospitalier	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>oqxAB</i>	Milieu Mac conkey avec CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrS2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrB2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Effluent hospitalier	Chine	<i>qnrB2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Rivière (Aval de la STEP)	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
Rivière (Aval de la STEP)	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
Rivière (Aval de la STEP)	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
Rivière (Aval de la STEP)	Espagne	<i>qnr6/qnrB17</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella oxytoca</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
Rivière	Brésil	<i>qnrB,aac(6')-lb-cr</i> et <i>oqxAB</i>	Milieu Mac conkey avec CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
Rivière (Aval de la STEP)	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
Rivière (Aval de la STEP)	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
Rivière (Aval de la STEP)	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas caviae</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
Eau aquaculture	Chine	<i>qnrS2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Eau aquaculture	Chine	<i>qnrB2</i> et <i>aac(6')-lb-cr</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Wen <i>et al.</i> , 2016)
Eau de sortie de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
Eau d'entrée de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
Eau de sortie de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)



Eau d'entrée de la station d'épuration	Portugal	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	pas indiqué	PCR	<i>Aeromonas spp</i>	(Varela, Nunes and Manaia, 2016)
Eaux usées	Allemagne	<i>qnrB1</i> , <i>qnrB2</i> et <i>QqnrB5</i>	AMP 100µg/ml ou CTX 1µg/ml ou CXM 15µg/ml	PCR	Extraction de plasmide	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
STEP	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
STEP	Espagne	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>qnrS2</i>	CIP 5 µg/mL	PCR	<i>Aeromonas media</i>	(Marti <i>et al.</i> , 2014)
STEP	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>oqxAB</i>	Milieu Mac conkey avec CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)
STEP	Brésil	<i>aac(6')-lb-cr</i> et <i>oqxAB</i>	Milieu Mac conkey avec CTX 2µg/ml	PCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Conte <i>et al.</i> , 2017)





**Annexe 3 : Concentration des fluoroquinolones détectées dans les effluents hospitaliers**

<b>Molécule</b>	<b>Pays</b>	<b>Nombre de lit</b>	<b>Concentration (ng/L)</b>	<b>Référence</b>
<b>Ciprofloxacin</b>	France	87	50-73000	(Oberlé <i>et al.</i> , 2012)
	France	360	5800	(Dinh <i>et al.</i> , 2017)
	France	450	46200 ± 30600	(Chonova <i>et al.</i> , 2016)
	France	non précisé	0-400	(Passerat <i>et al.</i> , 2010)
	Suisse	1000	21200 ± 3600	(Giger <i>et al.</i> , 2003)
	Suisse	non précisé	3000-87000	(Hartmann <i>et al.</i> , 1998)
	Espagne	400	8305,1-13779,7	(Rodriguez-Mozaz <i>et al.</i> , 2014)
	Espagne	400	5329-7494	(Gros, Rodriguez-Mozaz and Barceló, 2013)
	Italie	300	10000 - 15000	(Verlicchi and Zambello, 2016)
		900	1400-26000	(Verlicchi and Zambello, 2016)
	Suisse	346	31980 ± 14060	(Kovalova <i>et al.</i> , 2012)
		346	15700 ± 8000	(Kovalova <i>et al.</i> , 2012)
	Danemark	non précisé	6000-7600	(Nielsen <i>et al.</i> , 2013)
	Portugal	non précisé	2,893.0	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)
		non précisé	1,554.5	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)
	Portugal	non précisé	1,926.9	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)
		1456	2259-38689	(Santos <i>et al.</i> , 2013)
		350	457-13344	(Santos <i>et al.</i> , 2013)
		110	120-1334	(Santos <i>et al.</i> , 2013)
		96	101-2000	(Santos <i>et al.</i> , 2013)
	Portugal	1120	880 (<130-2530)	(Varela <i>et al.</i> , 2014)
	Norvège	1200	<38 - 54049	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
		non précisé	<38 - 39843	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
Suède	non précisé	3600 - 101000	(Lindberg <i>et al.</i> , 2004)	
Allemagne	non précisé	2-51000	(Ohlsen <i>et al.</i> , 2003)	



USA	non précisé	2000	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
	non précisé	850	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
Brésil	270	54000 ± 2100	(Martins <i>et al.</i> , 2008)
	270	65000 ± 45000	(Martins <i>et al.</i> , 2008)
Australie	non précisé	2500 - 15000	(Watkinson <i>et al.</i> , 2009)
Vietnam	non précisé	42800	(Vo <i>et al.</i> , 2016)
	non précisé	21500	(Vo <i>et al.</i> , 2016)
	non précisé	19100	(Vo <i>et al.</i> , 2016)
	non précisé	7100	(Vo <i>et al.</i> , 2016)
Vietnam	220	7900- 87300	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
	520	5600-53300	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
	220	1700 - 40400	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
	520	600-40200	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
Vietnam	500	7000 ± 100	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
	1500	10900 ± 800	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
	1200	1200 ± 200	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
	700	2100 ± 100	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
	630	1100 ± 100	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
	400	25800 ± 8100	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
Vietnam	non précisé	5300 ± 4800	(Vo <i>et al.</i> , 2016)
Corée	873-2743	3080	(Sim <i>et al.</i> , 2011)
Chine	800	197	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		92,5	(Li <i>et al.</i> , 2016)
	2410	163	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		90,2	(Li <i>et al.</i> , 2016)
	500	227	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		92,6	(Li <i>et al.</i> , 2016)
	1400	345	(Li <i>et al.</i> , 2016)



		87,2	(Li <i>et al.</i> , 2016)
	1000	246	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		78,6	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Chine	non précisé	136 ± 26	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
	non précisé	217 ± 41	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
	non précisé	11 ± 2	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
Singapour	1597	8740-76440	(Le <i>et al.</i> , 2016a)
	1500	1720-4340	(Le <i>et al.</i> , 2016a)
Taiwan	non précisé	2730 ± 371	(Xu <i>et al.</i> , 2015)
Inde	350	259-1530	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
	570	214-868	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
Pakistan	non précisé	200-18000	(Ashfaq <i>et al.</i> , 2016)
Arabie Saoudite	non précisé	5600 ± 660	(Al Qarni <i>et al.</i> , 2016)
	non précisé	2180 ± 250	(Al Qarni <i>et al.</i> , 2016)
Kenya	non précisé	70 ± 10	(Kimosop <i>et al.</i> , 2016)
	non précisé	70 ± 10	(Kimosop <i>et al.</i> , 2016)
	non précisé	540 ± 20	(Kimosop <i>et al.</i> , 2016)
	non précisé	80 ± 20	(Kimosop <i>et al.</i> , 2016)
France	87	780- 68000	(Oberlé <i>et al.</i> , 2012)
France	360	17,9	(Dinh <i>et al.</i> , 2017)
France	non précisé	1000-2000	(Passerat <i>et al.</i> , 2010)
Italie	300	13000-20000	(P Verlicchi <i>et al.</i> , 2012)
	900	3300-37000	(P Verlicchi <i>et al.</i> , 2012)
Espagne	400	4750-14377,8	(Rodriguez-Mozaz <i>et al.</i> , 2014)
Espagne	1000	1547-4778	(Mendoza <i>et al.</i> , 2015)
Espagne	400	2978-10368	(Gros, Rodríguez-Mozaz and Barceló, 2013)
Portugal	1456	3135-24811	(Santos <i>et al.</i> , 2013)

**Ofloxacine**



	350	1986-12865	(Santos <i>et al.</i> , 2013)	
	110	nd-662	(Santos <i>et al.</i> , 2013)	
Portugal	non précisé	2,289.0	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)	
	non précisé	3,008.3	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)	
	non précisé	353.3	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)	
Portugal	1120	590 (<130-1420)	(Varela et al 2014)	
Suède	non précisé	200-7600	(Lindberg et al 2004)	
Allemagne	non précisé	31000	(Ohlsen <i>et al.</i> , 2003)	
Vietnam		220	4,6	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
		220	2,1	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
		520	23,6	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
		520	5	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
Vietnam	non précisé	10900 ± 8100	(Vo <i>et al.</i> , 2016)	
Chine		800	678	(Li <i>et al.</i> , 2016)
			377	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		2410	845	(Li <i>et al.</i> , 2016)
			455	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		500	894	(Li <i>et al.</i> , 2016)
			496	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		1400	783	(Li <i>et al.</i> , 2016)
			423	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		1000	942	(Li <i>et al.</i> , 2016)
			507	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Chine	non précisé	4240 ± 221	(Chang <i>et al.</i> , 2010)	
	non précisé	3440 ± 429	(Chang <i>et al.</i> , 2010)	
	non précisé	2340 ± 365	(Chang <i>et al.</i> , 2010)	
	non précisé	1600 ± 225	(Chang <i>et al.</i> , 2010)	
Taiwan	non précisé	7262 ± 1533	(Li and Lin, 2015)	





<b>Norfloxacine</b>	Inde	350	48-660	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
		570	26-230	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
	Inde	350	259-1530	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
		570	214-868	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
	Pakistan	non précisé	4400-66000	(Ashfaq <i>et al.</i> , 2016)
		non précisé	7300-39100	(Ashfaq <i>et al.</i> , 2016)
	USA	non précisé	25500	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
		non précisé	34500	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
		non précisé	35500	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
		non précisé	4900	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
	France	87	100	(Oberlé <i>et al.</i> , 2012)
		360	12,1	(Dinh <i>et al.</i> , 2017)
	France	non précisé	0-200	(Passerat <i>et al.</i> , 2010)
	Allemagne	non précisé	44000	(Ohlsen <i>et al.</i> , 2003)
	Suisse	346	3140 ± 1820	(Kovalova <i>et al.</i> , 2012)
		346	5933 ± 3390	(Kovalova <i>et al.</i> , 2012)
	Suisse	1000	5600 ± 1800	(Alder et al 2004)
	Italie	300	40-100	(Verlicchi et al 2012)
		900	23-510	(Verlicchi et al 2012)
	Portugal	non précisé	228.9	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)
non précisé		134.5	(Seifrtová <i>et al.</i> , 2008)	
Espagne	400	327	(Gros, Rodriguez-Mozaz and Barceló, 2013)	
Chine	800	447	(Li <i>et al.</i> , 2016)	
	800	135	(Li <i>et al.</i> , 2016)	
	2410	544	(Li <i>et al.</i> , 2016)	



		2410	308	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		500	778	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		500	325	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		1400	554	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		1400	242	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		1000	624	(Li <i>et al.</i> , 2016)
		1000	258	(Li <i>et al.</i> , 2016)
	Chine	non précisé	303 ± 41	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
		non précisé	1620 ± 242	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
		non précisé	136 ± 28	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
	Taiwan	non précisé	241 ± 72	(Li et al 2015)
	Inde	570	160	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
	Vietnam	500	15200 ± 300	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
		1500	3400 ± 400	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
		700	13600 ± 300	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
		400	8400 ± 2500	(Duong <i>et al.</i> , 2008)
	Vietnam	non précisé	9600 ± 9800	(Vo <i>et al.</i> , 2016)
	Australie	non précisé	90	(Watkinson <i>et al.</i> , 2009)
<b>Enoxacine</b>	Italie	300	330 – 480	(P Verlicchi <i>et al.</i> , 2012)
		900	58–450	(P Verlicchi <i>et al.</i> , 2012)
<b>Levofloxacin</b>	Inde	350	51–750	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
		570	61–150	(Diwan, Stålsby Lundborg and Tamhankar, 2013b)
<b>Lomefloxacin</b>	Chine	non précisé	190 ± 39	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
		non précisé	1,162 ± 285	(Chang <i>et al.</i> , 2010)
		non précisé	313 ± 52	(Chang <i>et al.</i> , 2010)



**Annexe 4 : Concentration des bêtalactamines détectées dans les effluents hospitaliers**

<b>Familles</b>	<b>Molécule</b>	<b>Pays</b>	<b>Nombre de lit</b>	<b>Concentration (ng/L)</b>	<b>Réfèrences</b>
<b>Pénicilline</b>	Péniciline G	USA	non précisé	5200	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
		USA	non précisé	850	(Brown <i>et al.</i> , 2006)
		Portugal	1120	860 (<120-1390)	(Varela <i>et al.</i> , 2014)
	Penicilline V	Portugal	1120	(<130-630)	(Varela <i>et al.</i> , 2014)
	Oxacilline	Taiwan	non précisé	986 ± 181	(Li et al 2015)
			535	53050 ± 80	Szekeres et al 2017
	Roumanie		113	15580 ± 0.050	Szekeres et al 2017
			453	8070 ± 50	Szekeres et al 2017
			non précisé	610 ± 80	(Kimosop et al. 2016)
	Ampicilline	Kenya	non précisé	160 ± 50	(Kimosop <i>et al.</i> , 2016)
			non précisé	170 ± 10	(Kimosop <i>et al.</i> , 2016)
			non précisé	790 ± 70	(Kimosop <i>et al.</i> , 2016)
			France	87	800
	Amoxicilline	Espagne	400	<31,6-218	(Gros, Rodríguez-Mozaz and Barceló, 2013)
		Danemark	non précisé	33-43	(Nielsen et al 2013)
Australie			90	(Watkinson et al 2009)	



<b>Céphalosporine</b>	Kenya	non précisé	120 ± 20	(Dinh <i>et al.</i> , 2017)	
		non précisé	60 ± 10	(Kimosop et al. 2016)	
		non précisé	70 ± 20	(Kimosop et al. 2016)	
		non précisé	80 ± 30	(Kimosop et al. 2016)	
	France	360	110	(Dinh <i>et al.</i> , 2017)	
	Tazobactam	Roumanie	453	10260±0.080	(Szekeres <i>et al.</i> , 2017)
	Ceftazidime	Roumanie	535	3660±30	(Szekeres <i>et al.</i> , 2017)
			113	10460 ± 640	(Szekeres <i>et al.</i> , 2017)
		Vietnam	220	2800 - 11000	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
			220	2600 - 5000	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
			520	0	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
			520	0	(Lien <i>et al.</i> , 2016)
	Cefuroxime axetil	Espagne	non précisé	24040	(Gros et al 2013)
		Danemark	non précisé	150-210	(Nielsen et al 2013)
	Cefotaxime	Espagne	400	89	(Gros et al 2013)
		Espagne	non précisé	143,7-240,4	(Rodriguez et al 2015)
France		non précisé	160000	(Oberlé <i>et al.</i> , 2012)	
Taiwan		non précisé	0,3 ± 0,1	(Li et al 2015)	
France		360	0	(Dinh <i>et al.</i> , 2017)	
Cephalexine	Taiwan	non précisé	2228 ± 205	(Li et al 2015)	





	Australie	non précisé	4100	(Watkinson et al 2009)
	Cephadrine	Taiwan	non précisé	166+-40 (Li et al 2015)
	Cephazoline	Taiwan	non précisé	4905 ± 1236 (Li et al 2015)
		Espagne	400	<49,2-83,4 (Rodriguez et al 2015)
	Cefepime	Roumanie	113	8520 ± 440 (Szekeres <i>et al.</i> , 2017)
			453	5180 ± 230 (Szekeres <i>et al.</i> , 2017)
	Imipénème	Roumanie	453	14420 ± 390 (Szekeres <i>et al.</i> , 2017)
<b>Carbapénème</b>	Méropénème	Singapour	1597	<030,3 - 190 (Le <i>et al.</i> , 2016a)
				<30,3 - 1010 (Le <i>et al.</i> , 2016a)
			1500	<30,3 - 1070 (Le <i>et al.</i> , 2016a)



## **Annexe 5 : Communications scientifiques**

### **Publications**

- **Ory J**, Bricheux J, Bonnet JL, Forestier F, Traore O. Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent. *Environmental Pollution*, Avril 2016 (IF :4.839)

### **Communications orales**

#### **- Internationales**

- **Ory J.**, Bricheux G., Togola A., Bonnet JL., Forestier C., Traore O. Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent, European Congress of Clinical Microbiology and infectious diseases (ECCMID), Amsterdam (Netherlands), Avril 2016

#### **- Nationales**

- **Ory J.**, Bricheux G., Togola A., Bonnet JL., Forestier C., Traore O. Effluents hospitaliers : source de pollution en antibiotiques et de résistances bactériennes potentiellement transmissibles via un biofilm? Journée des écoles doctorales (JED) Clermont-Ferrand (France), Mai 2017
- **Ory J.**, Bricheux G., Togola A., Bonnet JL., Forestier C., Traore O. Effluents hospitaliers : source de pollution en antibiotiques et de résistances bactériennes potentiellement transmissibles via un biofilm? Journée des Doctorants Laboratoire Microorganisme Génome et Environnement, Clermont-Ferrand (France), Février 2017
- **Ory J.**, Bricheux G., Togola A., Bonnet JL., Forestier C., Traore O. Effluents hospitaliers : source d'antibiotiques micropolluants et de biofilms générateurs de bactéries multirésistantes? Congrès AFEM, Anglet (France), Novembre 2015
- **Ory J.**, Bricheux G., Togola A., Bonnet JL., Forestier C., Traore O. Effluents hospitaliers : Sources d'antibiotiques micropolluants ? Facilitateurs de résistances bactériennes dans les biofilms ? Journée des Doctorants Laboratoire Microorganisme Génome et Environnement, Clermont-Ferrand (France), Février 2015

### **Posters**

#### **- Internationaux**

- **Ory J.**, Bricheux G., Forestier C., Traore O. Biofilm in hospital effluent : a carbapenemase hotspot between hospital and environment? International Consortium for Prevention&Infection Control (ICPIC), Genève (Suisse), Juin 2017
- **Ory J.**, Bricheux G., Togola A., Bonnet JL., Forestier C., Traore O. Antibio-resistance: biofilms and antibiotics in the hospital effluents, 2015 Meeting Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, Tours (France), Juillet 2015

#### **- Nationaux**

- **Ory J.**, Bricheux G., Forestier C., Traore O. Biofilm des effluents hospitaliers : hotspot de carbapénémases entre hôpital et environnement ? , Congrès SF2H, Nice (France) Juin 2017
- **Ory J.**, Bricheux G, Portelli C, Forestier C, Traore O. Antibiotiques et pathogènes dans les effluents - hospitaliers, sources de pollutions des eaux. Xème Congrès de la société Française de Microbiologie (SFM), Paris (France), Avril 2014

