



HAL
open science

Etude des gènes de résistance aux antibiotiques d'intérêt clinique au sein d'un réseau trophique marin

Erwan Bourdonnais

► To cite this version:

Erwan Bourdonnais. Etude des gènes de résistance aux antibiotiques d'intérêt clinique au sein d'un réseau trophique marin. Alimentation et Nutrition. Université du littoral côte d'Opale, 2022. Français. NNT: . tel-03971592

HAL Id: tel-03971592

<https://hal.science/tel-03971592>

Submitted on 3 Feb 2023

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

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

Thèse de Doctorat

*Mention Sciences agronomiques et écologiques
Spécialité Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment*

présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université du Littoral Côte d'Opale

par

Erwan Bourdonnais

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

*Etude des gènes de résistance aux antibiotiques d'intérêt
clinique au sein d'un réseau trophique marin*

Soutenue le 02 Décembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M Sébastien MONCHY, Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale	Président
M ^{me} Gwenaëlle LE BLAY, Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
M Xavier BELLANGER, Maître de conférence, HDR, Université de Lorraine	Rapporteur
M Jean-Yves MADEC, Directeur de recherche, ANSES, Lyon	Examineur
M Cédric LE BRIS, Maître de Conférence, Université du Littoral Côte d'Opale	Examineur
M ^{me} Sandrine GUILLOU, Ingénieur de recherche, HDR, Oniris, Nantes	Examineur
M ^{me} Graziella MIDELET, Chargée de projet recherche, HDR, ANSES, Boulogne-sur-Mer	Directrice de thèse
M Thomas BRAUGE, Chargé de projet recherche, ANSES, Boulogne-sur-Mer	Co-encadrant

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier la région Hauts-de-France et le Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale pour le financement de ces travaux de thèse. Merci également à la Structure Fédérative de Recherche pour leur soutien dans la publication de mon tout premier article scientifique dans *Frontiers in Microbiology*. Un grand merci à Laurent LALOUX, directeur du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'ANSES pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de celui-ci sur le site de Boulogne-sur-Mer.



Je souhaite bien évidemment remercier Sébastien MONCHY, Gwenaëlle LE BLAY, Xavier BELLANGER, Jean-Yves MADEC et Sandrine GUILLOU pour leur participation au jury de thèse afin d'évaluer mes travaux de recherche.

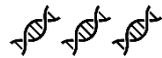
Merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse : Sophie GRANIER, Pierre CRESSON, Christophe AUDEBERT, Olivier BARRAUD et Didier HOCQUET. Vous avez su me conseiller et me guider dans le vaste monde de l'antibiorésistance tout en m'ouvrant les yeux sur les données que j'avais déjà acquises. Pour toutes ces conversations très enrichissantes, je vous remercie.



Je tiens à exprimer mon immense reconnaissance à Graziella MIDELET, la meilleure directrice de thèse qu'on puisse espérer. Tu m'as accordé ta confiance pour mener à bien cette thèse, ce « bébé ». Tu m'as fait grandir non seulement scientifiquement mais également humainement en me montrant que j'étais capable de mener à bien cette thèse. J'ai trouvé nos échanges très enrichissants au fil des années, même nos discussions sur les fèces de goélands tard le soir. Même si tu as dû me maudire par moment (je sais que c'est dur de supporter deux doctorants en même temps), je te remercie pour ta patience, ton oreille attentive, ta persévérance et ta métaphore de l'entonnoir qui va me poursuivre à tout jamais.

A Thomas BRAUGE, qui n'a pas été le meilleur directeur de thèse mais le meilleur co-encadrant ! Pendant ces trois années tu m'as poussé à me surpasser, à vaincre ma timidité en m'ouvrant aux personnes qui m'entourent. Je suis ravi d'être parti avec toi pour les congrès, tu as été d'un très grand soutien. Bon évidemment je te suis reconnaissant d'avoir dépensé l'équivalent du PIB du Yémen pour m'offrir des breuvages divers et variés. Tu as toujours été là, que ce soit pour répondre à toutes mes interrogations ou pour m'accompagner à la STEF ou à Leclerc chercher du poisson. Même en dehors de la thèse je pouvais compter sur toi.

Un grand merci à Cédric LE BRIS pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Tu as toujours été à l'écoute, pertinent, ton esprit critique et le recul que tu as eu pour mes travaux de thèse ont été d'une très grande aide.



Sabine et Anthony, merci infiniment pour votre aide précieuse dans la réalisation des manips, surtout pour les dissections de poissons et de mollusques dès le matin. Et vraiment désolé de vous avoir exploité (enfin « désolé » est un bien grand mot). Grâce à vous, j'ai pu avancer convenablement dans ma thèse. Guylaine, merci pour ta bonne humeur quotidienne. J'ai enfin trouvé une adversaire de taille dans la consommation de café. Cindy, la meilleure des préparatrices au monde ! Mais quelle joie d'avoir été ton chouchou ! Merci infiniment pour toute l'aide que tu m'as apporté en préparant des milieux absolument parfaits. J'aimerais également dire un grand merci à Stéphanie, Virginie et Odile. Vous avez su m'aider et me conseiller pour toutes mes interrogations lors de mes manips.

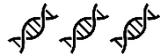
Merci aux doctorants du labo, les plus jeunes comme les plus vieux :

A Julia et Maureen, merci pour tous vos précieux conseils sur la thèse, ça m'a évité plusieurs galères ! A Sylvain et Alix, avec qui j'ai partagé le bureau des doctorants quand je n'étais pas en télétravail (merci le Covid hein). Et à toi Fleurine, sans doute la meilleure rencontre à Boulogne city ! Grâce à toi, ces trois années ont été bien rythmées par des conversations très profondes dans ton bureau et des soirées en tout genre ! Que ce soit à ta canapière, le temps d'un week-end en Normandie ou en sirotant des moscow mule en terrasse sous une armée de goélands, tous ces moments passés à tes côtés resteront gravés pour un long moment. Et je n'aurai qu'une chose à dire pour finir : « p**** ta chaise ».

Merci à vous Simge et Pauline pour les petits moments papotages au labo, ça faisait un bien fou de s'évader un peu ! Alexandre, je te remercie pour tous les dépannages sur RStudio. Sans toi, l'ordinateur ou moi aurions fini dans le port. Je voudrais également remercier les autres membres du laboratoire : Mélanie, Guillaume, Roxane, Charlotte, Marie-Ange, Gaëlle, Sophie K, Sophie Z, Karine et Corinne. Darina, tu as été la première stagiaire que j'ai eu la chance d'encadrer. Que ce soit à la paillasse ou pour ton aide dans la rédaction de l'article, je te remercie pour tout. T'encadrer pendant tes six mois de stage m'a beaucoup appris, notamment à être plus pédagogue. Merci également de t'être mouillée les pieds pour les prélèvements d'eau !

Je tiens également à remercier l'équipe scientifique de la campagne océanographique IBTS 2020 avec qui j'ai eu la chance d'embarquer à bord du Thalassa pendant une dizaine de jours pour une expérience vraiment incroyable. J'aimerais remercier tout particulièrement Coline et Arnaud pour m'avoir permis de prendre part à cette campagne. Merci à Camille, Rémy et Valérie pour m'avoir tant appris sur le

plan scientifique et pour avoir joué les photographes. Merci à Marie et Clara pour la bonne humeur au quotidien, sans oublier Michel et les autres membres de l'équipe pour les moments conviviaux dans le labo d'hydrologie.



A mes amies de très longue date, Fanny et Pauline. Cela fait maintenant 10 ans que vous me supportez moi, mes histoires hyper intéressantes et mon humour très raffiné. Pendant ces trois années de thèse, vous m'avez aidé à m'évader que ce soit le temps d'un week-end à Paris, à Lille, ou pendant ces deux super semaines en Corse. Même si on s'est peu vu pendant cette dernière année, je vous promets de me rattraper dès 2023. A vous, Marylène et Jérémy. En couple ou en troupe, je peux toujours compter sur vous pour passer des moments absolument fabuleux ! A Vitloire, à la braderie de Lille, au Mont-Saint-Michel, à Caen, à Lancieux, à Avranches, nos week-ends auront toujours été chargés en émotion, en musique et en amour. Je ne sais pas ce que l'avenir me réserve, mais une chose est sûre : je ne pourrais jamais me passer de vous. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu la joie de passer des moments formidables en Normandie : Fon, Vanessa, Ashaley, Nico et Fabien.

A mes parents, pour leur soutien infailible toutes ces années, qui m'ont toujours encouragé dans cette voie. Vous avez toujours cru en moi quand j'avais des doutes. Je vous remercie. A mes deux grands frères, François et Florian. Vous avez toujours été là pour veiller sur moi malgré la distance. Je ne vous le dis peut-être pas assez, mais chacun à votre manière vous êtes des modèles pour moi. A la meilleure des belles-sœurs, Marion (en même temps t'es la seule, donc facile). Ton arrivée dans la famille a été une bouffée d'air frais dans cette fratrie. Tu m'as offert le plus merveilleux des cadeaux : Arthur. Je te dédie cette thèse à toi Arthur, toi qui fais de moi le plus heureux et le plus gaga des parrains.

« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information »

Albert EINSTEIN

« Le vin peut-être à bon droit considéré comme la plus saine, la plus hygiénique des boissons »

Louis PASTEUR

Sommaire

Liste des abréviations	9
Glossaire	11
Liste des tableaux	12
Liste des figures	15
Introduction	19
Etude bibliographique	25
I. Les produits de la pêche et de l'aquaculture : production, consommation et risques pour le consommateur	26
I.1. La production et la consommation des produits de la pêche et d'aquaculture	26
I.2. Les risques liés aux bactéries pathogènes dans les aliments et plus spécifiquement dans les produits aquatiques	27
II. La résistance aux antimicrobiens	29
II.1. La résistance aux antimicrobiens : préoccupation de premier plan pour la santé humaine	29
II.2. Les origines et les mécanismes de la résistance aux antimicrobiens	30
II.3. Les vecteurs de dissémination de la résistance aux antimicrobiens	33
II.3.A. Les plasmides	34
II.3.B. Les transposons	36
II.3.C. Les îlots génomiques	37
II.3.D. Les intégrons	38
II.4. Les systèmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens à l'échelle nationale et européenne	39
III. La dissémination de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin	43
III.1. Les sources de contamination de l'environnement marin par les contaminants biologiques	43
III.1.A. Les eaux usées hospitalières, domestiques et industrielles	44
III.1.B. Les stations de traitement des eaux usées (STEU)	47
III.1.C. Les effluents de rivières	48
III.1.D. Les effluents d'aquaculture	49
III.2. La propagation de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin	50
III.2.A. L'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans l'eau de mer	51
III.2.B. L'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans les sédiments marins	54
III.2.C. L'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens associés aux animaux marins	55
IV. Les méthodes d'analyses moléculaires de la résistance aux antimicrobiens	58

IV.1.	Les approches ciblées pour l'analyse des résistances aux antimicrobiens	59
IV.2.	Les approches non ciblées pour l'analyse des résistances aux antimicrobiens	60
Chapitre I : Développement d'outils moléculaires pour l'étude de la résistance aux antimicrobiens dans le milieu marin		63
I.	Contexte	64
II.	Partie 1 : Comparaison de méthodes d'extraction d'ADN appliquées à des échantillons marins.....	66
II.1.	Matériel et méthodes.....	66
II.1.A.	Nature des échantillons analysés.....	66
II.1.B.	Préparation des échantillons.....	67
II.1.C.	Préparation et ajout du contrôle positif de processus dans les échantillons	69
II.1.D.	Méthodes d'extraction d'ADN.....	70
II.1.E.	Evaluation de l'efficacité des protocoles d'extraction d'ADN.....	74
II.1.E.a.	Estimation de la concentration et de la pureté des extraits d'ADN totaux	75
II.1.E.b.	Quantification de l'ADN bactérien par PCR quantitative (qPCR)	75
II.1.F.	Analyse des données	77
II.2.	Résultats	78
II.2.A.	Concentration et pureté des ADN extraits	79
II.2.B.	Quantification de l'ADN bactérien	85
II.2.C.	Quantification du contrôle positif de processus	90
III.	Partie 2 : Optimisation des méthodes de quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens	93
III.1.	Matériel et méthodes.....	93
III.1.A.	Souches bactériennes et plasmides	93
III.1.B.	Extraction de l'ADN plasmidique et génomique	95
III.1.C.	Optimisation des qPCR	96
III.1.C.a.	Réactions utilisant le colorant SYBR Green	96
III.1.C.b.	Réactions utilisant la technologie de sonde TaqMan	97
III.1.C.c.	Amplification de l'ADN	98
III.1.D.	Evaluation de la performance des réactions de qPCR.....	98
III.2.	Résultats	100
III.2.A.	Sélection du pré-mix pour la qPCR SYBR Green ciblant le gène <i>tetA</i>	100
III.2.B.	Sélection de la concentration en amorces pour les qPCR SYBR Green ciblant les gènes <i>tetA</i> et <i>bla_{TEM}</i>	103
III.2.C.	Sélection de la concentration en amorces pour les qPCR TaqMan ciblant les gènes <i>sul1</i> et <i>int11</i>	107

III.2.D. Sélection de la concentration de la sonde pour les qPCR TaqMan ciblant les gènes <i>sul1</i> et <i>int11</i>	110
IV. Discussion	113
IV.1. Partie 1 : Sélection d'une méthode d'extraction d'ADN optimale à partir d'échantillons marins.....	113
IV.2. Partie 2 : Optimisation des réactions de qPCR ciblant quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens.....	119
V. Conclusion	123
Chapitre II : Occurrence de gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les eaux de surface.....	125
I. Contexte	126
II. Matériel et méthodes.....	128
II.1. Prélèvements des échantillons d'eaux fluviales et d'eaux côtières.....	128
II.2. Prélèvements des échantillons d'eau de mer (campagne IBTS 2020)	129
II.3. Enrichissements des échantillons.....	131
II.4. Filtration des échantillons d'eau	131
II.5. Extraction de l'ADN total à partir des filtres et des enrichissements d'eau	131
II.6. Quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens <i>tetA</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>sul1</i> , <i>int11</i> et de la population bactérienne par le gène <i>tuf</i>	133
II.7. Analyses des données et traitements statistiques.....	135
III. Résultats	136
III.1. Validation des protocoles de filtration d'eau et d'extraction d'ADN.....	136
III.2. Occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les eaux fluviales et côtières.....	139
III.3. Occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène <i>tuf</i> dans la Manche et la Mer du Nord.....	142
IV. Discussion	145
V. Conclusion	157
Chapitre III : Occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans un réseau trophique benthique	159
I. Contexte	160
II. Matériel et méthodes.....	162
II.1. Plan d'échantillonnage	162
II.2. Echantillonnage	163
II.3. Préparation des échantillons.....	167
II.4. Extraction de l'ADN total des échantillons marins.....	168
II.5. Quantification des gènes <i>tetA</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>sul1</i> , <i>int11</i> et <i>tuf</i>	168
II.6. Analyse des données et traitements statistiques	168

III.	Résultats	170
III.1.	Occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord	170
III.1.A.	Phytoplancton	171
III.1.B.	Zooplancton.....	172
III.1.C.	Poissons plats	173
III.1.D.	Mollusques bivalves	178
III.2.	Distribution géographique des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord	179
III.3.	Influence de facteurs biotiques et abiotiques sur l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens.....	183
III.4.	Accumulation des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens le long d'un réseau trophique benthique	188
IV.	Discussion	195
V.	Conclusion	209
Chapitre IV : Mise au point d'une méthode de métagénomique fonctionnelle sur des souches de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolées de produits de la pêche pour l'identification des gènes de résistance aux antimicrobiens		
211		
I.	Contexte	212
II.	Matériel et méthodes.....	215
II.1.	Sélection des souches bactériennes et du vecteur plasmidique.....	215
II.2.	Construction des bibliothèques métagénomiques	216
II.2.A.	Etape 1 : Extraction de l'ADN génomique de <i>Vibrio</i> et plasmidique d' <i>E. coli</i>	218
II.2.B.	Etape 2 : Fragmentation et réparation de l'ADN génomique de <i>Vibrio</i>	218
II.2.C.	Etape 3 : Digestion et déphosphorylation du vecteur plasmidique pZE21-MCS.....	219
II.2.D.	Etape 4 : Clonage des fragments d'ADN de <i>Vibrio</i> dans le vecteur plasmidique	220
II.2.E.	Etape 5 : Transformation des plasmides recombinants dans l'hôte bactérien <i>E. coli</i>	221
II.2.F.	Comparaison des efficacités des deux méthodes de transformation bactérienne	222
II.3.	Analyse des bibliothèques métagénomiques.....	224
II.3.A.	Etape 6 : Criblage des bibliothèques métagénomiques	224
II.3.B.	Etape 7 : Séquençage des inserts conférant une résistance aux clones	226
II.3.C.	Etape 8 : Traitement des séquences d'ADN	226
II.3.D.	Etape 9 : Analyse des séquences.....	227
III.	Résultats	227
III.1.	Identification des gènes de résistance aux antimicrobiens des souches de <i>V. parahaemolyticus</i> par séquençage complet du génome	227
III.2.	Extraction et fragmentation de l'ADN génomique de <i>Vibrio</i>	229

III.3. Extraction et clivage du vecteur plasmidique pZE21-MCS.....	230
III.4. Comparaison de l'efficacité des méthodes de transformation bactérienne par choc thermique et par électroporation	231
III.5. Taille des bibliothèques métagénomiques de <i>V. parahaemolyticus</i>	233
III.6. Criblage des bibliothèques métagénomiques sur antibiotiques.....	237
III.7. Analyse des séquences des inserts plasmidiques des clones résistants aux antibiotiques.....	241
III.7.A. Clones des trois souches de <i>Vibrio</i> résistants à l'érythromycine	242
III.7.B. Clones de la souche 13-B3PA-2931 résistants à la tétracycline	244
III.7.C. Clones de la souche 16-B3PA-0006 résistants au sulfaméthoxazole	246
IV. Discussion	249
V. Conclusion	258
Conclusion et perspectives	261
Valorisation des travaux de thèse	275
Références bibliographiques	281
Annexes	295

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Blast	Basic local alignment search tool
BLSE	β -lactamases à spectre étendu
BRA	Bactérie résistante aux antimicrobiens
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CARD	The Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CGFS	Channel Ground Fish Survey
cm ²	Centimètre carré
Cq	Cycle de quantification
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
EGM	Élément génétique mobile
EPT	Eau peptonée tamponnée
EPSA	Eau peptonée saline alcaline
ERV	<i>Enterococcus faecium</i> résistant à la vancomycine
FAO	Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (de l'anglais <i>Food and Agriculture Organization</i>)
g	Gramme
GNS	Gélose nutritive salée
GRA	Gène de résistance aux antimicrobiens
IBTS	International Bottom Trawl Survey
ICES	International Council for the Exploitation of the Sea
L	Litre
LB	Lysogeny broth

ml	Millilitre
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Séquençage nouvelle génération (de l'anglais <i>Next-Generation Sequencing</i>)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (de l'anglais <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
STEU	Station de traitement des eaux usées
THG	Transfert horizontal de gènes
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
T _m	Température de fusion
TSAYe	Gélose tryptone soja avec de l'extrait de levure
UE	Union Européenne
WGS	Séquençage de génome complet (de l'anglais <i>Whole Genome Sequencing</i>)

Glossaire

Abiotique : facteur lié au milieu et indépendant des êtres vivants (température, luminosité, pH, pression) ou d'une surface inerte (sédiments).

Abondance absolue : concentration réelle des gènes dans l'échantillon obtenue en normalisant le nombre de copies des gènes cibles dans les échantillons obtenus par qPCR par le volume ou la masse d'échantillon analysé. L'unité de l'abondance absolue peut être : copies/g (matrices solides comme la chair de mollusque bivalve, les branchies et les viscères de poissons), copies/L (matrice liquide comme l'eau de mer), copies/ml d'échantillon (comme le phytoplancton et le zooplancton), copies/cm² (pour la peau des poissons).

Abondance absolue totale : correspond à la somme de l'abondance absolue de l'ensemble des gènes cibles dans un même échantillon.

Abondance relative : l'abondance relative permet d'estimer la proportion de bactéries résistantes aux antimicrobiens dans la communauté microbienne de l'échantillon. Elle est obtenue en normalisant l'abondance absolue du gène cible par l'abondance absolue du gène bactérien *tuf*.

Biotique : éléments vivants dans l'environnement comme les plantes et les animaux.

Co-occurrence : présence simultanée de deux ou plusieurs gènes au sein d'un même échantillon ou d'une même zone.

Occurrence : présence d'un gène au sein d'un échantillon ou d'une zone.

Prévalence : correspond au nombre d'individus/échantillons avec une détection/quantification d'un gène cible divisé par le nombre d'individus/échantillons analysés, exprimée en pourcentage.

Prévalence globale : correspond au pourcentage d'échantillons dans lesquels au moins un gène a été détecté/quantifié.

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : DETERMINANTS GENETIQUES PROPOSES COMME INDICATEURS DE CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT PAR LA RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS, D'APRES BERENDONK ET AL. (2015).....	42
TABLEAU 2: AMORCES ET SONDE UTILISEES DANS LES REACTIONS DE QPCR.....	75
TABLEAU 3: CONDITIONS UTILISEES POUR LES REACTIONS DE QPCR.....	76
TABLEAU 4 : CRITERES DE VALIDATION DES METHODES D'EXTRACTION D'ADN POUR CHAQUE NATURE D'ECHANTILLON MARIN. PH : PHYTOPLANCTON ; ZO : ZOOPLANCTON ; CH : CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES ; PE : PEAU DE POISSON PLAT ; BR : BRANCHIES DE POISSON PLAT ; VI : VISCERES DE POISSON PLAT. CPP : CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS.....	79
TABLEAU 5 : SOUCHES D'E.COLI CONTENANT LES DIFFERENTS PLASMIDES UTILISES DANS LES REACTIONS DE QPCR. LES GENES D'INTERET POUR CHAQUE QPCR SONT INDICUES EN VERT.....	94
TABLEAU 6 : SOUCHES DE V. PARAHAEMOLYTICUS UTILISEES COMME TEMOINS DANS LES REACTIONS DE QPCR.....	94
TABLEAU 7 : AMORCES ET SONDES UTILISEES DANS LES REACTIONS DE QPCR POUR CIBLER LES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLATEM, SUL1 ET INT11.....	97
TABLEAU 8 : CALCUL DU BIAIS DE LA LINEARITE SELON LA NORME NF U47-600-2:2015.....	100
TABLEAU 9 : COMPARAISON DES PARAMETRES DES QPCR CIBLANT LE GENE TETA EN UTILISANT A) LE PRE-MIX TAKARA ET B) LE PRE-MIX ROCHE AVEC UNE CONCENTRATION EN AMORCES DE 0,4 µM. NOMBRE EN ROUGE : VALEUR SUPERIEURE A LA VALEUR CRITIQUE DE BIAIS.....	102
TABLEAU 10 : COMPARAISON DES PARAMETRES DES QPCR CIBLANT LE GENE TETA EN UTILISANT LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,8 µM ET B) 1,0 µM. ND : NON DETERMINE. NOMBRE EN ROUGE : VALEUR SUPERIEURE A LA VALEUR CRITIQUE DE BIAIS.....	104
TABLEAU 11 : COMPARAISON DES PARAMETRES DES QPCR CIBLANT LE GENE BLATEM EN UTILISANT LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,4 µM, B) 0,8 µM ET C) 1,0 µM. ND : NON DETERMINE. NOMBRE EN ROUGE : VALEUR SUPERIEURE A LA VALEUR CRITIQUE DE BIAIS.....	106
TABLEAU 12 : COMPARAISON DES PARAMETRES DES QPCR CIBLANT LE GENE SUL1 EN UTILISANT LA SONDE A UNE CONCENTRATION FINALE DE 0,2 µM ET LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,4 µM, B) 0,8 µM ET C) 1,0 µM. NOMBRE EN ROUGE : VALEUR SUPERIEURE A LA VALEUR CRITIQUE DE BIAIS.....	108
TABLEAU 13 : COMPARAISON DES PARAMETRES DES QPCR CIBLANT LE GENE INT11 EN UTILISANT LA SONDE A UNE CONCENTRATION FINALE DE 0,2 µM ET LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,4 µM, B) 0,8 µM ET C) 1,0 µM. NOMBRE EN ROUGE : VALEUR SUPERIEURE A LA VALEUR CRITIQUE DE BIAIS.....	109
TABLEAU 14 : COMPARAISON DES PARAMETRES DES QPCR CIBLANT LE GENE SUL1 EN UTILISANT LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FIXE DE 0,4 µM ET LA SONDE A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,05 µM, B) 0,1 µM ET C) 0,2 µM. NOMBRE EN ROUGE : VALEUR SUPERIEURE A LA VALEUR CRITIQUE DE BIAIS.....	111
TABLEAU 15 : COMPARAISON DES PARAMETRES DES QPCR CIBLANT LE GENE INT11 EN UTILISANT LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FIXE DE 0,4 µM ET LA SONDE A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,05 µM, B) 0,1 µM ET C) 0,2 µM. NOMBRE EN ROUGE : VALEUR SUPERIEURE A LA VALEUR CRITIQUE DE BIAIS.....	112
TABLEAU 16 : CONDITIONS VALIDEES POUR LA QUANTIFICATION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLATEM, SUL1 ET INT11 PAR QPCR.....	113
TABLEAU 17 : AMORCES ET SONDES UTILISEES POUR LA QUANTIFICATION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS ET LA POPULATION BACTERIENNE PAR QPCR.....	133
TABLEAU 18 : SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES UTILISES DANS LES REACTIONS DE QPCR.....	135
TABLEAU 19 : CONDITIONS APPLIQUEES POUR LES REACTIONS DE QPCR EN SYBR GREEN ET EN TAQMAN.....	135
TABLEAU 20 : DETECTION ET QUANTIFICATION (LOG COPIES/L D'EAU) DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLATEM, SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS D'EAU DE LA LIANE (EL), DE LA PLAGE DE BOULOGNE-SUR-MER (EB) ET DE LA PLAGE DE WIMEREUX (EW) APRES ENRICHISSEMENT EN EPT/EPSA ET SANS ENRICHISSEMENT. VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE.....	140
TABLEAU 21 : DETECTION ET QUANTIFICATION (LOG COPIES/L D'EAU) DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLATEM, SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS D'EAU DE MER (EM) APRES UN ENRICHISSEMENT EN EPT/EPSA ET SANS ENRICHISSEMENT. VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE. ECH : ECHANTILLON. CEA : COTE EST DE L'ANGLETERRE ; CMN : CENTRE DE LA MER DU NORD ; CNP : COTE DU NORD DES PAYS-BAS ; COP : COTE OUEST DES PAYS-BAS ; ET : EMOUCHURE DE LA TAMISE ; ME : MANCHE EST. AA : ABONDANCE ABSOLUE.....	143

TABLEAU 22 : DETERMINATION ARBITRAIRE DES NIVEAUX DE CONTAMINATION DES ECHANTILLONS MARINS SELON L'ABONDANCE ABSOLUE TOTALE DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS MESUREE. PH : PHYTOPLANCTON ; ZO : ZOOPLANCTON ; PE : PEAU DE POISSONS PLATS ; BR : BRANCHIES DE POISSONS PLATS ; VI : VISCERES DE POISSONS PLATS ; CH : CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES.....	169
TABLEAU 23 : DETECTION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS DE PHYTOPLANCTON (PH) APRES ENRICHISSEMENT EN EPT ET EN EPSA ET ABONDANCE ABSOLUE DES GENES (AA ; EN LOG COPIES DU GENE/ML D'ECHANTILLON). VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE.....	172
TABLEAU 24 : DETECTION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS DE ZOOPLANCTON (ZO) APRES ENRICHISSEMENT EN EPT ET EN EPSA, ET ABONDANCE ABSOLUE DES GENES (AA ; EN LOG COPIES DU GENE/ML D'ECHANTILLON). VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE.....	173
TABLEAU 25 : DETECTION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS DE PEAU DE POISSONS PLATS (PE) APRES ENRICHISSEMENT EN EPT ET EN EPSA, ET ABONDANCE ABSOLUE DES GENES (AA ; EN LOG COPIES DU GENE/CM ² DE PEAU). VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE.....	175
TABLEAU 26 : DETECTION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS DE BRANCHIES DE POISSONS PLATS (BR) APRES ENRICHISSEMENT EN EPT ET EN EPSA, ET ABONDANCE ABSOLUE DES GENES (AA ; EN LOG COPIES DU GENE/G DE BRANCHIES). VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE.....	176
TABLEAU 27 : DETECTION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS DE VISCERES DE POISSONS PLATS (VI) APRES ENRICHISSEMENT EN EPT ET EN EPSA, ET ABONDANCE ABSOLUE DES GENES (AA ; EN LOG COPIES DU GENE/G DE VISCERES). VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE.....	177
TABLEAU 28 : DETECTION DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS DE CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES (CH) APRES ENRICHISSEMENT EN EPT ET EN EPSA, ET ABONDANCE ABSOLUE DES GENES (AA ; EN LOG COPIES DU GENE/G DE CHAIR). VERT : PRESENCE ; ORANGE : ABSENCE.....	178
TABLEAU 29 : EXEMPLES D'ETUDES AYANT UTILISE LA METAGENOMIQUE FONCTIONNELLE POUR CARACTERISER LES GENES DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS DANS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES.	215
TABLEAU 30 : AMORCES UTILISEES POUR LES REACTIONS DE PCR CIBLANT LE SITE MULTIPLE DE CLONAGE DU PLASMIDE PZE21-MCS.	223
TABLEAU 31 : ANTIBIOTIQUES UTILISES POUR LE CRIBLAGE DES LIBRAIRIES METAGENOMIQUES. C3G : CEPHALOSPORINE DE 3 ^{EME} GENERATION. LES CMI UTILISEES ONT ETE TIREES DES TRAVAUX DE BOOLCHANDANI ET AL. (2017) ET SU ET AL. (2014).....	224
TABLEAU 32 : IDENTIFICATION DES GENES DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS DES SOUCHES DE V. PARAHAEMOLYTICUS PAR UN SEQUENÇAGE COMPLET DU GENOME AVEC LA BASE DE DONNEES RESFINDER.	228
TABLEAU 33 : DENOMBREMENTS BACTERIENS DES LIBRAIRIES METAGENOMIQUES DES SOUCHES DE V. PARAHAEMOLYTICUS POUR LES DEUX METHODES DE TRANSFORMATION BACTERIENNE TESTEES (EN LOG UFC/ML). ATB : ANTIBIOTIQUE ; (+) : NOMBRE DE COLONIES > 300 ; (-) : NOMBRE DE COLONIES < 30.....	232
TABLEAU 34 : EFFICACITE MOYENNE DE TRANSFORMATION BACTERIENNE DU PLASMIDE TEMOIN ET DES PLASMIDES RECOMBINES AVEC LES DEUX METHODES DE TRANSFORMATION. ND : NON DENOMBRABLE.	233
TABLEAU 35 : CRIBLAGE DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE 12-B3PA-1629 EN PRESENCE DE KANAMYCINE (KAN), SULFAMETHOXAZOLE (SUL), CEFOTAXIME (CEF), CIPROFLOXACINE (CIP), COLISTINE (COL), DORIPENEME (DOR), ERYTHROMYCINE (ERY) ET TETRACYCLINE (TET).....	239
TABLEAU 36 : CRIBLAGE DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE 13-B3PA-2931 EN PRESENCE DE KANAMYCINE (KAN), SULFAMETHOXAZOLE (SUL), CEFOTAXIME (CEF), CIPROFLOXACINE (CIP), COLISTINE (COL), DORIPENEME (DOR), ERYTHROMYCINE (ERY) ET TETRACYCLINE (TET).....	240
TABLEAU 37 : CRIBLAGE DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE 16-B3PA-0006 EN PRESENCE DE KANAMYCINE (KAN), SULFAMETHOXAZOLE (SUL), CEFOTAXIME (CEF), CIPROFLOXACINE (CIP), COLISTINE (COL), DORIPENEME (DOR), ERYTHROMYCINE (ERY) ET TETRACYCLINE (TET).....	241
TABLEAU 38 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 13-B3PA-2931 RESISTANTS A LA TETRACYCLINE AVEC LA BASE DE DONNEES CARD. % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE ; BACTERIE : ESPECE BACTERIENNE DANS LAQUELLE LE GENE A ETE IDENTIFIE.	244
TABLEAU 39 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 13-B3PA-2931 RESISTANTS A LA TETRACYCLINE AVEC LA BASE DE DONNEES ARG-ANNOT. % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE.	244
TABLEAU 40 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 13-B3PA-2931 RESISTANTS A LA TETRACYCLINE AVEC LA BASE DE DONNEES RESFINDERFG. NOM DU HIT : CORRESPOND AU GENE, A LA	

PROTEINE OU A LA FONCTION DU GENE/DE LA PROTEINE IDENTIFIE PAR LE BLAST ; % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE ; ANTIBIOTIQUE CIBLE : ANTIBIOTIQUE CONTRE LEQUEL LE GENE IDENTIFIE CONFERE UNE RESISTANCE.	245
TABLEAU 41 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 13-B3PA-2931 RESISTANTS A LA TETRACYCLINE AVEC LA BASE DE DONNEES DU NCBI. PRODUIT : PROTEINE OU FONCTION DE LA PROTEINE CODEE PAR LE GENE IDENTIFIE ; QUERY COVER : POURCENTAGE CORRESPONDANT A LA LONGUEUR DE LA SEQUENCE BLASTEE COUVRANT LA SEQUENCE CIBLE ; % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE ; BACTERIE : ESPECE BACTERIENNE DANS LAQUELLE LE GENE A ETE IDENTIFIE.	246
TABLEAU 42 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006 RESISTANTS AU SULFAMETHOXAZOLE AVEC LA BASE DE DONNEES CARD. % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE ; BACTERIE : ESPECE BACTERIENNE DANS LAQUELLE LE GENE A ETE IDENTIFIE.	247
TABLEAU 43 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006 RESISTANTS AU SULFAMETHOXAZOLE AVEC LA BASE DE DONNEES ARG-ANNOT. % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE.	247
TABLEAU 44 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006 RESISTANTS AU SULFAMETHOXAZOLE AVEC LA BASE DE DONNEES RESFINDER. % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE ; PHENOTYPE DE RESISTANCE : ANTIBIOTIQUE CONTRE LEQUEL LE GENE IDENTIFIE CONFERE UNE RESISTANCE.	248
TABLEAU 45 : ANALYSE DES SEQUENCES INSEREES DANS LES PLASMIDES DES CLONES DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006 RESISTANTS AU SULFAMETHOXAZOLE AVEC LA BASE DE DONNEES DU NCBI. PRODUIT : PROTEINE OU FONCTION DE LA PROTEINE CODEE PAR LE GENE IDENTIFIE ; QUERY COVER : POURCENTAGE CORRESPONDANT A LA LONGUEUR DE LA SEQUENCE BLASTEE COUVRANT LA SEQUENCE CIBLE ; % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE ; BACTERIE : ESPECE BACTERIENNE DANS LAQUELLE LE GENE A ETE IDENTIFIE.	249

Liste des figures

FIGURE 1 : PRODUCTION HALIEUTIQUE ET AQUACOLE MONDIALE EN MILLIONS DE TONNES. ZONE ROUGE : PECHE DANS LES EAUX CONTINENTALES ; ZONE ORANGE : PECHE DANS LES EAUX MARINES ; ZONE BLEUE FONCEE : AQUACULTURE DANS LES EAUX CONTINENTALES ; ZONE BLEUE CLAIRE : AQUACULTURE DANS LES EAUX MARINES (FAO, 2020).	26
FIGURE 2 : TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES DECLAREES EN FRANCE EN 2020 SELON LE TYPE D'ALIMENT SUSPECTE (AUTRES ALIMENTS : PLATS CUISINES, PLATS CONTENANT PLUSIEURS INGREDIENTS) ET PAR PATHOGENE POUR LA CONSOMMATION DE POISSONS, CRUSTACES ET COQUILLAGES (AUTRE : VIRUS, LISTERIA MONOCYTOGENES, VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS, SHIGELLA, STEC...) D'APRES SANTE PUBLIQUE FRANCE (2021).	28
FIGURE 3 : SCHEMA DE LA DISSEMINATION DES ANTIBIOTIQUES (ATB) ET DES GENES DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS (GRA) DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN (D'APRES ZHENG ET AL. (2021)). STEU : STATION DE TRAITEMENT DES EAUX USEES ; EGM : ELEMENTS GENETIQUES MOBILES ; COT : CARBONE ORGANIQUE TOTAL.	44
FIGURE 4 : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES ETUDES REALISEES SUR L'OCCURRENCE DES ANTIBIOTIQUES ET DES GENES DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS (GRA) DANS LES ENVIRONNEMENTS COTIERS ET ESTUARIENS D'APRES ZHENG ET AL. (2021).	51
FIGURE 5 : REPARTITION DES ESPACES MARINES DANS LA COLONNE D'EAU (AQUAPORTAIL.COM).	56
FIGURE 6 : PRELEVEMENT DU MUCUS D'UNE PLIE COMMUNE (ECHANTILLON « PEAU DE POISSON PLAT »).	68
FIGURE 7 : PRELEVEMENT DES BRANCHIES SUR UNE PLIE COMMUNE (ECHANTILLON « BRANCHIES DE POISSON PLAT »).	68
FIGURE 8 : PRELEVEMENT DE L'INTESTIN SUR UNE PLIE COMMUNE (ECHANTILLON « VISCERES DE POISSON PLAT »).	69
FIGURE 9 : CALCUL DU NOMBRE D'UNITES GENOMES DE L. MONOCYTOGENES POUR UNE CONCENTRATION D'ADN DEFINIE.	77
FIGURE 10 : CONCENTRATIONS D'ADN EXTRAIT (NG/ μ L) A PARTIR DES ECHANTILLONS MARINS EN UTILISANT LES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION D'ADN. (●) : AVEC CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. (▲) : SANS CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. A) PHYTOPLANCTON. B) ZOOPLANCTON. C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES. D) PEAU DE POISSON PLAT. E) BRANCHIES DE POISSON PLAT. F) VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL ; CT : EXTRACTION D'ADN PAR CHOC THERMIQUE. N = 6 ECHANTILLONS PAR MATRICE.	81
FIGURE 11 : RATIOS A260NM/A280NM DE L'ADN EXTRAIT DES ECHANTILLONS MARINS EN UTILISANT LES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION D'ADN. (●) : AVEC CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. (▲) : SANS CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. A) PHYTOPLANCTON. B) ZOOPLANCTON. C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES. D) PEAU DE POISSON PLAT. E) BRANCHIES DE POISSON PLAT. F) VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL ; CT : EXTRACTION D'ADN PAR CHOC THERMIQUE. N = 6 ECHANTILLONS PAR MATRICE. BANDE GRISE : ECHANTILLONS D'ADN PURS (RATIOS ENTRE 1,8 ET 2,0).	83
FIGURE 12 : RATIOS A260NM/A230NM DE L'ADN EXTRAIT DES ECHANTILLONS MARINS EN UTILISANT LES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION D'ADN. (●) : AVEC CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. (▲) : SANS CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. A) PHYTOPLANCTON. B) ZOOPLANCTON. C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES. D) PEAU DE POISSON PLAT. E) BRANCHIES DE POISSON PLAT. F) VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL ; CT : EXTRACTION D'ADN PAR CHOC THERMIQUE. N = 6 ECHANTILLONS PAR MATRICE. BANDE GRISE : ECHANTILLONS D'ADN PURS (RATIOS ENTRE 2,0 ET 2,2).	85
FIGURE 13 : VALEURS DE CQ OBTENUES POUR LA QUANTIFICATION DU GENE BACTERIEN TUF A PARTIR DES ADN EXTRAITS DES ECHANTILLONS MARINS AVEC LES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION. (●) : AVEC CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. (▲) : SANS CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. A) PHYTOPLANCTON. B) ZOOPLANCTON. C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES. D) PEAU DE POISSON PLAT. E) BRANCHIES DE POISSON PLAT. F) VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL ; CT : EXTRACTION D'ADN PAR CHOC THERMIQUE. N = 6 ECHANTILLONS PAR MATRICE.	87
FIGURE 14 : VALEURS DE CQ OBTENUES POUR LA QUANTIFICATION DU GENE BACTERIEN RPOB A PARTIR DES ADN EXTRAITS DES ECHANTILLONS MARINS AVEC LES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION. (●) : AVEC CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. (▲) : SANS CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. A) PHYTOPLANCTON. B) ZOOPLANCTON. C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES. D) PEAU DE POISSON PLAT. E) BRANCHIES DE POISSON PLAT. F) VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL ; CT : EXTRACTION D'ADN PAR CHOC THERMIQUE. N = 6 ECHANTILLONS PAR MATRICE.	89

FIGURE 15 : NOMBRE D'UNITES GENOME DU GENE HLYA DANS LES ADN EXTRAITS DES ECHANTILLONS MARINS AVEC LE CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS EN UTILISANT LES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION. A) PHYTOPLANCTON. B) ZOOPLANCTON. C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES. D) PEAU DE POISSON PLAT. E) BRANCHIES DE POISSON PLAT. F) VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL ; CT : EXTRACTION D'ADN PAR CHOC THERMIQUE. N = 3 ECHANTILLONS PAR MATRICE.....	91
FIGURE 16 : TAUX DE FAUX NEGATIFS CALCULES PAR (A) METHODE D'EXTRACTION ET (B) NATURE D'ECHANTILLON. PH : PHYTOPLANCTON ; ZO : ZOOPLANCTON ; CH : CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES ; PE : PEAU DE POISSON PLAT ; BR : BRANCHIES DE POISSON PLAT ; VI : VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL ; CT : EXTRACTION D'ADN PAR CHOC THERMIQUE.	92
FIGURE 17 : CALCUL DE LA CONCENTRATION D'ADN POUR OBTENIR UN NOMBRE D'UNITES GENOME DEFINI.....	96
FIGURE 18 : LOCALISATION DES SITES DE PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS D'EAUX FLUVIALES ET D'EAUX COTIERES A PROXIMITE DE BOULOGNE-SUR-MER (FRANCE). EL : EAU DE LA LIANE ; EB : EAU DE LA PLAGE DE BOULOGNE-SUR-MER ; EW : EAU DE LA PLAGE DE WIMEREUX.	128
FIGURE 19 : CARTE D'ECHANTILLONNAGE DES PRELEVEMENTS D'EAU DE MER REALISES LORS DE LA CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE IBTS 2020 DANS LA MANCHE ET LA MER DU NORD. YXXXX : NUMERO DE STATION DE PRELEVEMENT.....	130
FIGURE 20 : CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE INTERNATIONAL BOTTOM TRAWL SURVEY (IBTS 2020) A) LE THALASSA, NAVIRE OCEANOGRAPHIQUE DE L'IFREMER, B) BOUTEILLE NISKIN UTILISEE POUR LE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS D'EAU DE MER.	130
FIGURE 21 : CONCENTRATION DES EXTRAITS D'ADN ISSUS DE LA FILTRATION DES ECHANTILLONS D'EAU SANS ENRICHISSEMENT (N=3). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT LA VARIABILITE DES CONCENTRATIONS D'ADN AUTOUR DE LA MOYENNE. EB : EAU DE LA PLAGE DE BOULOGNE-SUR-MER ; EW : EAU DE LA PLAGE DE WIMEREUX ; EL : EAU DE LA LIANE.	137
FIGURE 22 : CONCENTRATION DES EXTRAITS D'ADN APRES UN ENRICHISSEMENT DES ECHANTILLONS D'EAU EN EPT ET EN EPSA (N=1). EB : EAU DE LA PLAGE DE BOULOGNE-SUR-MER ; EW : EAU DE LA PLAGE DE WIMEREUX ; EL : EAU DE LA LIANE.....	138
FIGURE 23 : ABONDANCE ABSOLUE DU GENE TUF DANS LES ECHANTILLONS D'ADN EXTRAITS DES FILTRES DE 0,45 ET 0,22 µM (N=3). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT LA VARIABILITE DE L'ABONDANCE ABSOLUE DU GENE TUF AUTOUR DE LA MOYENNE. EB : EAU DE LA PLAGE DE BOULOGNE-SUR-MER ; EW : EAU DE LA PLAGE DE WIMEREUX ; EL : EAU DE LA LIANE.	138
FIGURE 24 : ABONDANCE RELATIVE DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS D'EAUX FLUVIALES ET COTIERES EN FONCTION DU FILTRE UTILISE. EB : EAU DE LA PLAGE DE BOULOGNE-SUR-MER ; EW : EAU DE LA PLAGE DE WIMEREUX ; EL : EAU DE LA LIANE.....	141
FIGURE 25 : ABONDANCE RELATIVE (LOG) DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS TETA, BLA _{TEM} , SUL1 ET INT11 DANS LES ECHANTILLONS D'EAU DE MER (EM ; n=36) PRELEVES DANS LA MANCHE ET LA MER DU NORD PAR ZONE DE PRELEVEMENT. CEA : COTE EST DE L'ANGLETERRE ; CMN : CENTRE DE LA MER DU NORD ; CNP : COTE DU NORD DES PAYS-BAS ; COP : COTE OUEST DES PAYS-BAS ; ET : EMBOUCHURE DE LA TAMISE ; ME : MANCHE EST.	145
FIGURE 26 : REPARTITION DES ESPECES MARINES ANALYSEES DANS LA COLONNE D'EAU ET LEUR APPARTENANCE A UN NIVEAU TROPHIQUE DEFINI. IMAGES TIREES DES SITES AQUAPORTAIL.COM ; EC.EUROPA.EU ET DE BIORENDER.COM SOUS LE NUMERO D'AGREMENT AS24394NSB.	163
FIGURE 27 : STATIONS D'ECHANTILLONNAGE DES PRELEVEMENTS DE PHYTOPLANCTON (N = 16) ET DE ZOOPLANCTON (N = 16) DANS LES DIFFERENTES ZONES DEFINIES DANS LA MANCHE ET LA MER DU NORD. ETOILES ROUGES : MANCHE EST (ME) ; VIOLETTES : EMBOUCHURE TAMISE (ET) ; BLEUES : COTE EST ANGLETERRE (CEA) ; VERTES : CENTRE MER DU NORD (CMN) ; JAUNES : COTE OUEST DES PAYS-BAS (COP) ; ROSES : COTE DU NORD DES PAYS-BAS (CNP).	164
FIGURE 28 : EQUIPEMENTS UTILISES LORS DE LA CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE IBTS 2020. A) FILET BABYNET DE 20 µM POUR LES PRELEVEMENTS DE PHYTOPLANCTON. B) FILET WP2 DE 200 µM POUR LES PRELEVEMENTS DE ZOOPLANCTON. C) BATHYSONDE POUR LES MESURES DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX. D) CHALUT DE FOND A GOV (GRANDE OUVERTURE VERTICAL). E) SCHEMA DU CHALUTAGE DE FOND (D'APRES LE COMITE NATIONAL DES PECHEES (2019)).	165
FIGURE 29 : STATIONS D'ECHANTILLONNAGE DES MOLLUSQUES BIVALVES (N = 40 ; 10 INDIVIDUS PAR STATION) DANS LA MANCHE EST.	165
FIGURE 30 : STATIONS D'ECHANTILLONNAGE DES POISSONS PLATS (N = 350 ; 10 INDIVIDUS PAR STATION) DANS LES DIFFERENTES ZONES DEFINIES DANS LA MANCHE ET LA MER DU NORD. ETOILES ROUGES : MANCHE EST (ME) ; VIOLETTES : EMBOUCHURE TAMISE (ET) ; BLEUES : COTE EST ANGLETERRE (CEA) ; VERTES : CENTRE MER DU NORD (CMN) ; JAUNES : COTE OUEST DES PAYS-BAS (COP) ; ROSES : COTE DU NORD DES PAYS-BAS (CNP).	166
FIGURE 31 : ESTIMATION DE LA SUPERFICIE DES POISSONS PLATS EN CM ²	167

FIGURE 32 : CARTOGRAPHIE DES NIVEAUX DE CONTAMINATION PAR LES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS DES ECHANTILLONS DE (A) PHYTOPLANCTON, (B) ZOOPLANCTON, (C) PEAU DE POISSONS PLATS, (D) BRANCHIES DE POISSONS PLATS, (E) VISCERES DE POISSONS PLATS ET (F) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES DANS LA MANCHE ET LA MER DU NORD. CEA : COTE EST ANGLETERRE ; CMN : CENTRE MER DU NORD ; CNP : COTE NORD PAYS-BAS ; COP : COTE OUEST PAYS-BAS ; ET : EMOUCHURE TAMISE ; ME : MANCHE EST.	182
FIGURE 33 : CORRELOGRAMME DE L'ABONDANCE ABSOLUE DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS, DU GENE TUF ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES AUX ECHANTILLONS D'EAU DE MER (RESULTATS OBTENUS DANS LE CHAPITRE II PARTIE III.3). PR : PRESSION ; TEMP : TEMPERATURE DE L'EAU ; SAL : SALINITE ; TURB : TURBIDITE ; OXYG : SATURATION EN OXYGENE ; ALG : CONCENTRATION EN ALGUES.	186
FIGURE 34 : CORRELOGRAMME DE L'ABONDANCE ABSOLUE DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS, DU GENE TUF ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES AUX ECHANTILLONS DE PHYTOPLANCTON. PR : PRESSION ; TEMP : TEMPERATURE DE L'EAU ; SAL : SALINITE ; TURB : TURBIDITE ; OXYG : SATURATION EN OXYGENE ; ALG : CONCENTRATION EN ALGUES.	187
FIGURE 35 : CORRELOGRAMME DE L'ABONDANCE ABSOLUE DES GENES INDICATEURS DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES AUX ECHANTILLONS DE ZOOPLANCTON. PR : PRESSION ; TEMP : TEMPERATURE DE L'EAU ; SAL : SALINITE ; TURB : TURBIDITE ; OXYG : SATURATION EN OXYGENE ; ALG : CONCENTRATION EN ALGUES.	187
FIGURE 36 : MODELES DE REGRESSIONS LOCALES (DE TYPE LOWESS) DE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE TETA EN FONCTION DU NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPOND AUX ECHANTILLONS DE (A) PEAU DE POISSONS PLATS, (B) BRANCHIES DE POISSONS PLATS ET (C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES.	191
FIGURE 37 : MODELES DE REGRESSIONS LOCALES (DE TYPE LOWESS) DE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE BLA _{TEM} EN FONCTION DU NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPOND AUX ECHANTILLONS DE (A) PEAU DE POISSONS PLATS, (B) BRANCHIES DE POISSONS PLATS ET (C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES.	192
FIGURE 38 : MODELES DE REGRESSIONS LINEAIRES DE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE SUL1 EN FONCTION DU NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPOND AUX ECHANTILLONS DE (A) PEAU DE POISSONS PLATS, (B) BRANCHIES DE POISSONS PLATS ET (C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES.	193
FIGURE 39 : MODELES DE REGRESSIONS LINEAIRES DE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE INT11 EN FONCTION DU NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPOND AUX ECHANTILLONS DE (A) PEAU DE POISSONS PLATS, (B) BRANCHIES DE POISSONS PLATS ET (C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES.	194
FIGURE 40 : SCHEMA DECRIVANT LES ETAPES DE LA CONSTRUCTION DES LIBRAIRIES METAGENOMIQUES A PARTIR DES SOUCHES DE <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i> . LES TRIANGLES JAUNES INDIQUENT UNE ETAPE DE PURIFICATION DE L'ADN APRES LES REACTIONS ENZYMATIQUES. CE SCHEMA A ETE REALISE AVEC BIORENDER.COM SOUS LE NUMERO D'AGREMENT RD24C9PAOF.	217
FIGURE 41 : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB.	219
FIGURE 42 : SCHEMA DECRIVANT LES ETAPES DE CRIBLAGE DES LIBRAIRIES METAGENOMIQUES ET DE L'ANALYSE DES SEQUENCES (BIORENDER.COM ; NUMERO D'AGREMENT AG24D8MKTP). GRA : GENES DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS.	225
FIGURE 43 : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DE L'ADN GENOMIQUE DES SOUCHES DE <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i> 12-B3PA-1629 (PUIT 1), 13-B3PA-2931 (PUIT 2) ET 16-B3PA-0006 (PUIT 3). M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB.	229
FIGURE 44 : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DE LA LINEARISATION DU PLASMIDE pZE21-MCS PAR L'ENZYME DE RESTRICTION HINCII. M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB ; PUIT 1 : ADN GENOMIQUE DE <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i> 16-B3PA-0006 FRAGMENTE ; PUIT 2 : ADN GENOMIQUE DE <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i> 16-B3PA-0006 ; PUIT 3 : ADN PLASMIDIQUE NON COUPE ; PUIT 4 : ADN PLASMIDIQUE COUPE PAR L'ENZYME HINCII ; PUIT 5 : ADN PLASMIDIQUE COUPE PAR L'ENZYME HINCII ET DILUE AU 1/10. LES CERCLES EN POINTILLES REPRESENTENT L'ADN SOUS FORME CIRCULAIRE (CERCLE DU HAUT) ET SUPER-ENROULE (CERCLE INFERIEUR).	231
FIGURE 45 : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DES AMPLICONS DE LA PCR SUR LES TRANSFORMANTS DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE DE <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i> 12-B3PA-1629. M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB ; PUIITS 1 A 15 : CLONES ; PUIT 16 : MELANGE REACTIONNEL SEUL (TEMOIN NEGATIF) ; PUIT 17 : EAU NUCLEASE-FREE (TEMOIN NEGATIF) ; PUIT 18 : ADN DU PLASMIDE pZE21-MCS SANS INSERT ; PUIITS 19 A 33 : CLONES. LES PUIITS EN ROUGE INDIQUENT UN INSERT DE TAILLE > 500 PB. LA LIGNE BLANCHE INDIQUE LA TAILLE DES AMPLICONS QUAND LE PLASMIDE EST VIDE. FR : NOMBRE DE REACTIONS RATEES ; NI : NOMBRE DE CLONES AVEC UN PLASMIDE VIDE ; LS : NOMBRE DE CLONES POSSEDANT UN PLASMIDE AVEC UN INSERT < 500 PB ; AI : MOYENNE DE LA TAILLE DES INSERTS (PB) ; TC : NOMBRE TOTAL DE CLONES (UFC/ML) ; TR : NOMBRE TOTAL DE REACTIONS PCR ; TAILLE : TAILLE TOTALE DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE (Gb).	235
FIGURE 46 : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DES AMPLICONS DE LA PCR SUR LES TRANSFORMANTS DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE DE <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i> 13-B3PA-2931. M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB ; PUIITS 1 A 15 : CLONES ; PUIT 16 : EAU NUCLEASE-FREE (TEMOIN NEGATIF) ; PUIT 17 : ADN DU PLASMIDE pZE21-MCS SANS INSERT ;	

PUITS 18 A 32 : CLONES ; PUIT 33 : MELANGE REACTIONNEL SEUL (TEMOIN NEGATIF) ; PUIT 34 : ADN DU PLASMIDE PZE21-MCS SANS INSERT. LES PUIITS EN ROUGE INDIQUENT UN INSERT DE TAILLE > 500 PB. LA LIGNE BLANCHE INDIQUE LA TAILLE DES AMPLICONS QUAND LE PLASMIDE EST VIDE. FR : NOMBRE DE REACTIONS RATEES ; NI : NOMBRE DE CLONES AVEC UN PLASMIDE VIDE ; LS : NOMBRE DE CLONES POSSEDANT UN PLASMIDE AVEC UN INSERT < 500 PB ; AI : MOYENNE DE LA TAILLE DES INSERTS (PB) ; TC : NOMBRE TOTAL DE CLONES (UFC/ML) ; TR : NOMBRE TOTAL DE REACTIONS PCR ; TAILLE : TAILLE TOTALE DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE (Gb)..... 236

FIGURE 47 : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DES AMPLICONS DE LA PCR SUR LES TRANSFORMANTS DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE DE V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006. M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB ; PUIITS 1 A 30 : CLONES ; PUIT 31 : EAU NUCLEASE-FREE (TEMOIN NEGATIF). LES PUIITS EN ROUGE INDIQUENT UN INSERT DE TAILLE > 500 PB. LA LIGNE BLANCHE INDIQUE LA TAILLE DES AMPLICONS QUAND LE PLASMIDE EST VIDE. FR : NOMBRE DE REACTIONS RATEES ; NI : NOMBRE DE CLONES AVEC UN PLASMIDE VIDE ; LS : NOMBRE DE CLONES POSSEDANT UN PLASMIDE AVEC UN INSERT < 500 PB ; AI : MOYENNE DE LA TAILLE DES INSERTS (PB) ; TC : NOMBRE TOTAL DE CLONES (UFC/ML) ; TR : NOMBRE TOTAL DE REACTIONS PCR ; TAILLE : TAILLE TOTALE DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE (Gb)..... 237

Introduction

La résistance aux antimicrobiens est une préoccupation de premier plan pour la santé humaine. La mauvaise utilisation et l'utilisation abusive des antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire mais également dans le domaine de l'industrie ont exercé une pression de sélection sur les populations bactériennes augmentant ainsi l'émergence et la propagation des gènes de résistance aux antimicrobiens (GRA). En 2019, environ 1,27 millions de décès ont été attribués aux bactéries résistantes aux antimicrobiens (BRA) à travers le monde (Murray *et al.*, 2022). Si aucune action n'est entreprise pour lutter contre la résistance aux antimicrobiens, ce chiffre pourrait augmenter ces prochaines années.

Les produits aquatiques (pêche et aquaculture) sont des aliments de plus en plus consommés à travers le monde, apportant des bienfaits pour la santé des consommateurs. La consommation des produits aquatiques était de 20,5 kg/habitant dans le monde en 2018 et de 24,0 kg/habitant dans l'Union Européenne (UE) en 2019 (FAO, 2020, EUMOFA, 2021). Mais cette consommation peut également être une source de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Selon le CDC (Centers for Disease Control and Prevention), près de 48 millions de maladies d'origine alimentaire surviennent chaque année dans le monde entraînant 128 000 hospitalisations et 3 000 décès. En 2020, plus de 3 080 TIAC ont été signalées en Europe touchant environ 20 017 personnes (EFSA, 2021). La même année, environ 1 000 cas de TIAC liés aux produits aquatiques ont été recensés en France dont environ 20 % étaient d'origine bactérienne (Santé Publique France, 2021).

La présence de BRA et de GRA associés aux produits aquatiques constitue deux risques principaux pour la santé du consommateur. En cas d'infection alimentaire, le traitement aux antibiotiques peut s'avérer être moins efficace voire conduire à une impasse thérapeutique. De plus, ces résistances aux antimicrobiens peuvent être transférées à la flore résidente ou transitoire du consommateur et constituer un pool génétique susceptible de se propager dans l'environnement.

La contamination des produits aquatiques par les BRA et les GRA peut se faire lors de leur manipulation ou de leur transformation mais également directement dans l'environnement marin. En

effet, certains gènes peuvent être naturellement présents sous forme d'ADN libre ou portés par les bactéries indigènes du milieu marin. Mais l'environnement marin est également sujet à diverses contaminations d'origine anthropique comme les effluents qui transportent ces contaminants tels que les rivières qui reçoivent les eaux usées hospitalières, domestiques et industrielles après un traitement plus ou moins efficace dans les stations de traitement des eaux usées (STEU) (Gao *et al.*, 2018). L'environnement marin constitue alors le récepteur final de ces effluents d'origine anthropique et peut être considéré comme un réservoir potentiel de GRA. Ainsi, des gènes de résistance à des antibiotiques critiques en santé humaine tels que *bla*_{TEM}, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetB*, *qnrB*, *ermB* ou le gène *int11* associé aux intégrons de classe 1 ont été identifiés dans les eaux côtières de la Mer Jaune (Su *et al.*, 2020) mais également associés à diverses surfaces biotiques comme des poissons dans la Mer Méditerranée (Brahmi *et al.*, 2018), des mollusques bivalves prélevés près des côtes norvégiennes (Grevskott *et al.*, 2017) et même du plancton prélevé dans une rivière en Chine (Xue *et al.*, 2021). L'accumulation des GRA associés à différentes espèces marines peut se faire par le contact de leur surface avec l'eau de mer ou les sédiments, par la respiration ou par l'alimentation via les réseaux trophiques.

Cependant, les études concernant le rôle de l'environnement marin dans l'accumulation et la transmission des résistances aux antimicrobiens entre les différentes espèces marines organisées en réseaux trophiques sont peu nombreuses (ANSES, 2020a). De plus, il n'existe aucune donnée sur l'occurrence des GRA dans la Manche et la Mer du Nord, une zone économiquement importante en raison d'une forte activité de pêche, de transports maritimes et d'exploitation de ressources énergétiques (parcs éoliens offshore et plates-formes pétrolières). Du fait de ces activités humaines et de la présence de plusieurs pays côtiers avec des politiques d'utilisation des antibiotiques différentes, la Manche et la Mer du Nord sont soumises à de nombreux effluents potentiellement contaminés par des GRA. Ce danger des GRA constitue un risque pour la santé publique par la consommation de produits de la pêche contaminés comme les mollusques bivalves et les poissons plats qui constituent le dernier niveau trophique d'un réseau trophique benthique et sont sujets à l'accumulation des GRA par la consommation des espèces de niveau trophique inférieur contaminées.

La multiplicité des méthodes employées pour l'analyse des GRA dans les différents compartiments environnementaux associée à la diversité des GRA rend difficile la comparaison entre les études. Le besoin de disposer d'indicateurs génétiques pour le suivi et la surveillance de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement est une problématique connue et abordée dans de nombreuses études. Par définition, un gène indicateur doit être relativement simple à suivre, informer sur la dynamique de résistance globale, indiquer une pression anthropique et peut être couplé avec la recherche de GRA pour apprécier la dynamique de transfert (ANSES, 2020a). Etant donné que seulement 1 % de la flore bactérienne dans l'environnement est cultivable, il est assez complexe de définir des bactéries indicatrices de contamination de l'environnement marin par la résistance aux antimicrobiens similairement à *E. coli* dans le milieu terrestre. Berendonk *et al.* (2015) ont proposé des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens tels que *bla*_{TEM}, *sul1*, *sul2*, *tetM* et *int11* pour surveiller la contamination de l'environnement par la résistance aux antimicrobiens. Ces gènes ont été choisis en raison de leur pertinence clinique, leur prévalence dans les compartiments environnementaux soumis aux activités anthropiques et leur association avec des éléments génétiques mobiles (EGM) ou tout autre vecteur de transmission de la résistance. Cependant, ce concept de gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens n'a pas encore été établi principalement en raison du manque de données sur la diversité et la quantité des GRA dans l'environnement marin. Afin d'identifier les GRA et les EGM de manière ciblée mais également d'en identifier de nouveaux, de nouvelles technologies commencent à se développer comme la métagénomique fonctionnelle. Cette technique constitue un outil puissant et innovant mais encore très peu développé qui pourrait s'appliquer à des matrices complexes comme des échantillons marins. Mais une mise au point importante de cette nouvelle technique est nécessaire pour standardiser et valider un protocole sur des échantillons connus comme des souches bactériennes telles que *Vibrio parahaemolyticus* avant de l'appliquer sur des échantillons complexes inconnus. En effet, *V. parahaemolyticus* est une espèce pathogène alimentaire indigène du milieu marin qui possède une certaine plasticité génétique et qui

a été proposée comme indicateur de la résistance aux antibiotiques pour le milieu aquatique (Banerjee and Farber, 2018).

L'objectif de ces travaux de recherche a été d'acquérir des connaissances sur l'occurrence des quatre gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* proposés comme indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans un réseau trophique benthique et les eaux de surface dans la Manche et la Mer du Nord.

Dans un premier temps, nous avons mené une analyse comparative de méthodes d'extraction d'ADN bactérien total pour sélectionner une méthode optimale à partir d'échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats représentatifs d'un réseau trophique benthique. Ensuite, nous avons optimisé des méthodes de qPCR pour la détection et la quantification des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens à partir des ADN bactérien extraits.

Dans un second temps, nous avons étudié l'occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par qPCR dans les ADN bactériens extraits à partir des prélèvements d'eaux de surface fluviales, côtières et dans la Manche et la Mer du Nord pour réaliser une cartographie de ces gènes et regarder les potentielles sources de contamination des zones de prélèvements.

Dans un troisième temps, nous avons caractérisé l'occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par qPCR dans les ADN bactériens extraits à partir des prélèvements de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats représentatifs d'un réseau trophique benthique. Nous avons identifié les paramètres environnementaux ainsi que les potentielles sources de contamination pouvant avoir un impact sur l'abondance d'un ou de plusieurs gène(s) dans un ou plusieurs compartiment(s) de ce réseau et dans l'eau de mer.

Dans un dernier temps, afin d'identifier les gènes impliqués dans la résistance à des antibiotiques cibles et découvrir potentiellement de nouveaux GRA dans les échantillons marins, nous avons développé une méthode de métagénomique fonctionnelle par criblage haut-débit sur des souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche.

Etude bibliographique

I. Les produits de la pêche et de l'aquaculture : production, consommation et risques pour le consommateur

I.1. La production et la consommation des produits de la pêche et d'aquaculture

Les produits de la pêche et de l'aquaculture représentent une source importante d'alimentation et de revenus pour des millions de personnes à travers le monde. Source de protéines, d'oméga-3, de vitamine D et d'iode, ils ont un impact positif pour la santé humaine (ANSES, 2016). En effet, ils sont bénéfiques pour le développement neuronal, visuel et cognitif pendant la gestation et la petite enfance, et ils permettent de diminuer les risques de maladies cardiovasculaires. En 2018, la production halieutique mondiale, comprenant la pêche de capture et l'aquaculture, a atteint une valeur record d'environ 179 millions de tonnes (Figure 1) (FAO, 2020). Si la production liée à la pêche de capture n'a que peu augmentée ces dernières années, celle liée à l'aquaculture est en augmentation. Après une légère diminution entre 2005 et 2016, la production de pêche de capture a atteint 96,4 millions de tonnes en 2018 contre 89,6 millions de tonnes en 2016.

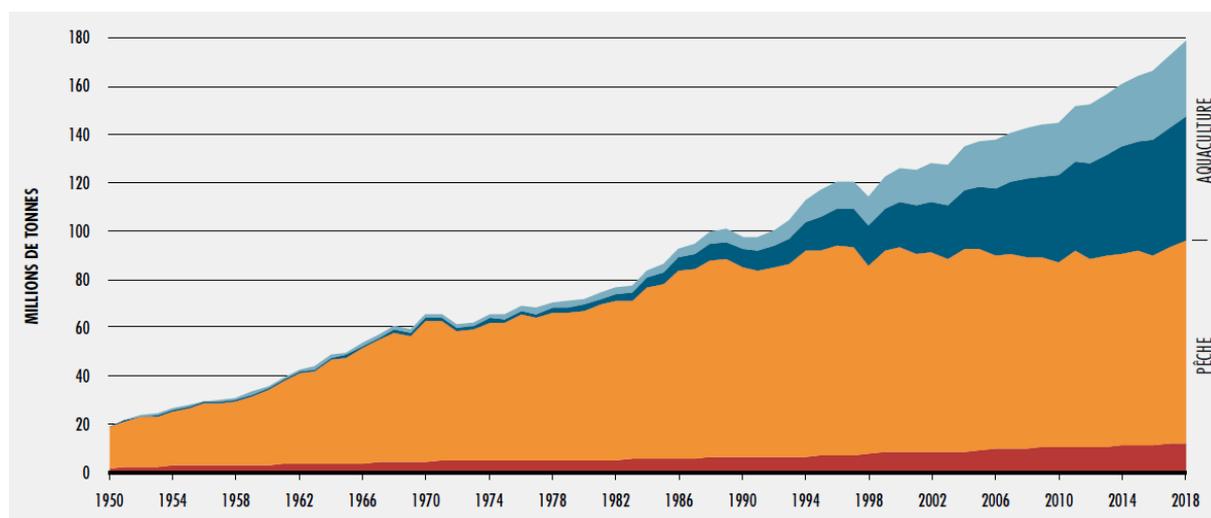


Figure 1 : Production halieutique et aquacole mondiale en millions de tonnes. Zone rouge : pêche dans les eaux continentales ; zone orange : pêche dans les eaux marines ; zone bleu foncée : aquaculture dans les eaux continentales ; zone bleu claire : aquaculture dans les eaux marines (FAO, 2020).

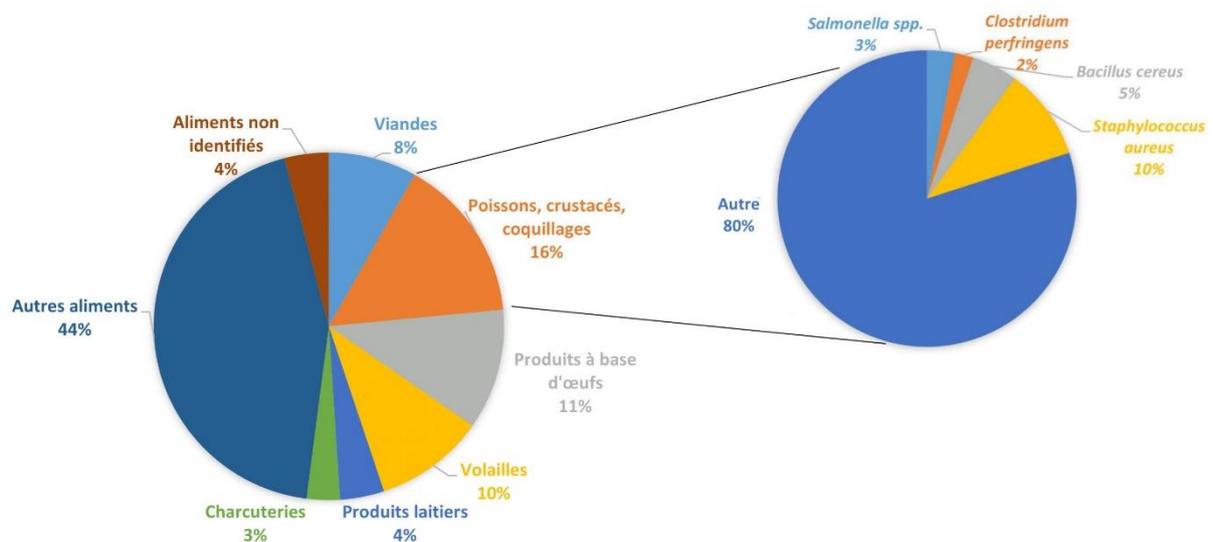
En 2019, les principaux pays producteurs de pêche de capture étaient la Chine (15 % du volume total de la pêche de capture), l'Indonésie (8 %) et l'Inde (6 %). L'ensemble de l'Union Européenne (UE) représentait uniquement 5 % du volume total de pêche de capture (EUMOFA, 2021). En France, plus de 338 000 tonnes de poissons, 47 000 tonnes de coquillages et 16 000 tonnes de crustacés ont été débarquées en 2016.

La consommation des produits aquatiques dans le monde a également augmenté de 19,9 kg/habitant en 2016 à 20,5 kg/habitant en 2018 (FAO, 2020). En 2019, au sein de l'UE, cette consommation était de 24,0 kg/habitant dont 18,3 kg étaient des produits de pêche de capture (EUMOFA, 2021). En France, cette consommation était supérieure à la moyenne européenne avec 33,3 kg/habitant en 2019. Afin de répondre à une demande croissante, une partie des produits aquatiques consommés en France est importée. En 2019, l'approvisionnement de l'UE en produits aquatiques était estimé à 11,4 millions de tonnes avec 3,7 millions issus de la production intérieure et 7,7 millions issus des importations. Les principaux pays d'importation des produits de la pêche et d'aquaculture de l'UE étaient la Norvège (saumon frais et entier, cabillaud congelé, entier ou en filets), la Russie (cabillaud congelé) ainsi que l'Equateur, le Vietnam, l'Inde et l'Argentine (crevettes congelées) (EUMOFA, 2018). Outre les effets bénéfiques pour la santé humaine que peut avoir la consommation de poissons, de crustacés et de coquillages, ceux-ci peuvent être porteurs de dangers bactériens et présenter un risque pour le consommateur. En effet, un certain nombre d'épidémies alimentaires ont été reportées suite à l'ingestion d'aliments contaminés.

I.2. Les risques liés aux bactéries pathogènes dans les aliments et plus spécifiquement dans les produits aquatiques

Chaque année, les micro-organismes pathogènes d'origine alimentaire causent des millions de cas de maladies à travers le monde. Selon le CDC (Centers for Disease Control and Prevention), près de 48 millions de maladies d'origine alimentaire surviennent chaque année dans le monde, entraînant 128 000 hospitalisations et 3 000 décès pour une perte financière totale de 14 milliards de dollars comprenant notamment les dépenses liées aux hospitalisations et aux traitements médicaux. En 2020,

plus de 3 080 toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été signalées en Europe touchant environ 20 017 personnes (EFSA, 2021). En France, les TIAC sont soumises à déclaration obligatoire et sont définies par l'apparition de deux cas symptomatiques similaires liés à une même origine alimentaire. En 2020, ce sont 1 010 TIAC qui ont été déclarées en France touchant 6 814 personnes dont 396 ont été hospitalisées et 9 sont décédées (Santé Publique France, 2021). La consommation de produits aquatiques était à l'origine de 15 % de ces cas de TIAC (8 % pour les poissons, 6 % pour les coquillages et 1 % pour les crustacés) (Figure 2). Les agents pathogènes bactériens confirmés ou suspectés responsables de ces infections alimentaires étaient principalement *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. D'autres bactéries ont été également à l'origine d'infections alimentaires liées à la consommation de produits aquatiques comme *Vibrio* spp. et *Listeria monocytogenes*.



La présence de bactéries pathogènes dans les produits aquatiques peut être attribuée à plusieurs sources de contamination. La première source de contamination des produits aquatiques est l'environnement marin avec la présence de bactéries indigènes comme *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*

et *Vibrio*. La deuxième source de contamination des produits aquatiques peut être liée aux navires de pêche lors de la phase de capture (surfaces du navire, hygiène du personnel). La troisième source de contamination peut être les industries où ont lieu la manipulation et la transformation des produits aquatiques à cause des installations, des équipements ou du personnel. Pour ces deux dernières sources de contamination, les bactéries présentes sont dites non-indigènes comme *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* et *Staphylococcus*. Afin de limiter la présence de contaminants biologiques, un ensemble de textes réglementaires sont regroupés dans le « Paquet hygiène » qui est entré en vigueur en 2006 au sein de l'UE et qui concerne toutes les filières agro-alimentaires. Ces réglementations ont pour objectif de veiller à ce que les produits alimentaires ne présentent aucun risque pour le consommateur. Les professionnels des filières agro-alimentaires sont fortement encouragés à mettre en pratique des guides de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH) afin de maîtriser la sécurité sanitaire des aliments et à respecter les obligations réglementaires. Cependant, il n'y a aucune exigence de mise en place des GBPH à bord des bateaux étant donné la variété des méthodes de pêche, des navires et des espèces pêchées (OFIMER, 2006). Même si la présence de bactéries pathogènes dans les produits aquatiques constitue un risque pour la santé du consommateur, il existe un risque supplémentaire si ces bactéries sont porteuses de résistance aux antimicrobiens.

II. La résistance aux antimicrobiens

II.1. La résistance aux antimicrobiens : préoccupation de premier plan pour la santé humaine

Selon l'Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture, la résistance aux antimicrobiens est définie comme la capacité des microorganismes, en particulier des bactéries, à devenir insensibles aux effets de médicaments antimicrobiens comme les antibiotiques précédemment efficaces dans le traitement des infections bactériennes. En 2019, environ 1,27 millions de décès ont été attribués aux bactéries résistantes aux antimicrobiens (BRA) dans le monde dont environ 73 700 décès survenus en Europe Centrale, Europe de l'Est et en Asie Centrale (Murray *et al.*, 2022). Le taux de morbidité dû aux

BRA était le plus élevé en Afrique subsaharienne occidentale et le plus bas en Australie et Nouvelle-Zélande.

La présence potentielle de ces BRA dans les denrées alimentaires comme les produits aquatiques constitue un danger direct avec un risque pour la santé du consommateur. Ce danger peut avoir pour conséquence une augmentation du nombre d'hospitalisations, du risque d'infections invasives et du nombre de décès notamment à cause d'une diminution de l'efficacité des traitements aux antimicrobiens voire leur inefficacité. En lien avec les BRA, il y a plus spécifiquement les gènes de résistance aux antimicrobiens (GRA) qui peuvent être portés par des bactéries pathogènes mais également non pathogènes pour l'Homme, associés à l'ADN des bactériophages ou sous forme d'ADN libre. Ceci constitue un risque indirect pour la santé humaine car ces résistances vont constituer un pool génétique à partir duquel des bactéries vont pouvoir capter ces résistances et potentiellement les transférer à des bactéries pathogènes. Une étude a démontré que des plasmides contenant des GRA et des gènes de virulence pouvaient être transférés entre une souche clinique et une souche alimentaire d'*Enterococcus faecalis* pendant le processus de fermentation de saucisses et de fromages (Coconcelli *et al.*, 2003). Le transfert des résistances aux antimicrobiens vers les bactéries commensales de l'Homme peut accroître le réservoir de résistances que constitue le microbiote. Ces résistances peuvent ensuite diffuser vers l'environnement.

II.2. Les origines et les mécanismes de la résistance aux antimicrobiens

Les bactéries présentes dans l'environnement peuvent être naturellement résistantes aux antimicrobiens, on parle alors de résistances intrinsèques qui déterminent le phénotype sauvage de résistance des bactéries. Le phénotype de résistance est propre à une espèce bactérienne en raison de ses caractéristiques structurelles mais aussi fonctionnelles. Par exemple, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux glycopeptides (comme la vancomycine) à cause de la taille de ces molécules qui ne peuvent pas entrer dans les porines de la membrane externe des bactéries. Ce type de résistance est porté sur le chromosome bactérien et est donc transféré verticalement lors de la

division cellulaire. Il est reconnu que les bactéries indigènes de l'environnement synthétisent des molécules antimicrobiennes naturelles qui peuvent avoir des effets délétères sur d'autres espèces bactériennes présentes dans l'environnement dans un but de lutter contre celles-ci avec lesquelles elles sont en compétition (accès aux nutriments, colonisation du milieu). Des travaux menés sur des souches de *Vibrio* isolées d'intestins et de surfaces de grands animaux marins ont démontré que la moitié des souches étaient capables d'inhiber la croissance d'au moins une autre souche de Vibrionaceae par la production d'antibiotiques tels que des lipopeptides cycliques qui entraînaient une dépolarisation des membranes ou la formation de pores déclenchant ainsi une lyse cellulaire (Cordero *et al.*, 2012). D'autres bactéries retrouvées dans l'environnement étaient également capables de synthétiser des molécules aux propriétés antimicrobiennes, comme celles du genre *Streptomyces* (Mak *et al.*, 2014). La streptomycine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides produit par *Streptomyces griseus* qui a été isolée de plusieurs compartiments environnementaux comme des sédiments marins profonds dans l'Océan Atlantique et Pacifique (Nachtigall *et al.*, 2011). L'espèce *Streptomyces rimosus* produit quant à elle de l'oxytétracycline et a notamment été isolée de sols forestiers en Inde (Singh and Rai, 2012). La production de faibles concentrations d'antibiotiques est également impliquée dans la communication inter-bactérienne favorisant par exemple la formation de biofilms et donc la tolérance aux antibiotiques, ce qui a été démontré dans des souches de *S. aureus* à des concentrations sub-inhibitrices de β -lactamines (Kaplan *et al.*, 2012). En produisant des molécules aux propriétés antimicrobiennes, les bactéries possèdent au sein de leur génome les mécanismes d'auto-résistance contre ces antibiotiques qu'elles produisent. Entre autres, les gènes de résistance *otrA* et *otrB* codant pour une protéine de protection ribosomale et une pompe à efflux étaient impliquées dans la résistance à l'oxytétracycline de *S. rimosus*, l'espèce bactérienne productrice de cet antibiotique (Singh and Rai, 2012). La coexistence de souches productrices et non productrices d'antibiotiques dans l'environnement a entraîné une coévolution des mécanismes de résistance et serait à l'origine de nouvelles résistances dans les isolats cliniques (Surette and Wright, 2017).

Les résistances posant un vrai problème en santé humaine sont les résistances acquises traduisant l'émergence d'une résistance à un antibiotique au sein d'une ou plusieurs souches d'une même espèce bactérienne normalement sensible(s). Ces résistances peuvent résulter de deux mécanismes. Le premier mécanisme est l'apparition de mutations au niveau du chromosome bactérien. Ce phénomène est rare et naturel, et peut être favorisé par une pression de sélection des antibiotiques et être transmis verticalement. Le second phénomène d'acquisition de résistances aux antibiotiques est le transfert horizontal de gènes. Ce mécanisme est le plus courant, le plus préoccupant et le plus observé dans les domaines cliniques et environnementaux. Il peut concerner plusieurs familles d'antibiotiques à la fois mais aussi engendrer l'apparition de bactéries multirésistantes aux antibiotiques (résistantes à au moins 3 familles d'antibiotiques) voire de bactéries pan-résistantes. Ces dernières sont résistantes à l'ensemble des antibiotiques utilisés en santé humaine et peuvent conduire à une impasse thérapeutique.

Ce n'est qu'au début du XX^e siècle que les premières résistances acquises aux antimicrobiens ont été observées en réponse à l'utilisation de la pénicilline, premier antibiotique découvert par Alexander Fleming en 1928. Cette résistance a été observée dans le genre *Staphylococcus* et se traduisait par la production d'une enzyme, la pénicillinase, qui pouvait dégrader la pénicilline. A partir des années 1940, la production d'autres molécules antimicrobiennes plus puissantes que la pénicilline a entraîné une pression de sélection sur les bactéries. Cette pression de sélection a conféré aux bactéries des mécanismes de résistance supplémentaires. La production d'une enzyme modifiant ou détruisant l'antibiotique est l'un des mécanismes permettant aux bactéries de résister à l'action des antimicrobiens. Ce processus est notamment observé dans les entérobactéries qui résistent aux β -lactamines par la production d'un grand nombre de β -lactamases. Ces enzymes peuvent avoir des spectres d'activité différents agissant sur les β -lactamines de 1^{ère} génération (pénicillinases) comme de dernière génération (carbapénémases) (Alekhshun and Levy, 2007). La modification de la cible de l'antibiotique est un second mécanisme impliqué dans la résistance aux antimicrobiens. L'exemple le plus connu est la résistance à la méticilline de l'espèce *S. aureus* qui se traduit par l'acquisition du gène

mecA codant pour la protéine PLP2A (protéine liant la pénicilline 2A) qui a une faible affinité pour les β -lactamines (Dumitrescu *et al.*, 2010). Enfin, le dernier mécanisme de résistance aux antimicrobiens est l'imperméabilisation de la membrane bactérienne ou l'efflux actif de l'antibiotique. L'imperméabilité de la membrane est principalement due à la modification ou à l'inactivation des porines membranaires ce qui a pour conséquence un transport passif des molécules antimicrobiennes à travers la membrane bactérienne. D'autre part, le mécanisme d'efflux actif est basé sur des pompes transmembranaires qui expulsent de manière plus ou moins spécifique la molécule antimicrobienne à l'extérieur de la cellule bactérienne. Un exemple de ce mécanisme de résistance est la formation de la pompe à efflux de la tétracycline médiée par le gène *tetA* retrouvé dans de nombreuses espèces de bactéries Gram négatives (Grossman, 2016).

II.3. Les vecteurs de dissémination de la résistance aux antimicrobiens

Le transfert horizontal des GRA entre les bactéries peut se produire par les processus de conjugaison, de transduction et de transformation. La transduction est un phénomène de transfert horizontal d'ADN bactérien partiel d'une cellule à une autre par l'intermédiaire d'un vecteur viral. Le transfert par l'intermédiaire d'un bactériophage se fait par intégration de cet ADN partiel qui peut renfermer des GRA dans une capsid phagique qui va ensuite infecter une autre cellule bactérienne. Ces phages peuvent infecter uniquement les bactéries et sont les entités biologiques les plus abondantes dans l'environnement. L'étude de Calero-Cáceres and Muniesa (2016) a mis en évidence que l'ADN de bactériophages isolés de sédiments et d'eau de rivière renfermait une prévalence similaire des gènes de résistance *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} (résistance aux β -lactamines), *qnrA*, *qnrS* (résistance aux quinolones) et *sul1* (résistance aux sulfonamides). Le transfert des GRA résulte de l'absorption de l'ADN sous forme libre par une cellule receveuse comme par exemple *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria* et *Pneumococcus* et son incorporation au sein de leur chromosome (Mayer and Camberlein, 2013). Ce mécanisme de transduction a également été largement décrit dans les eaux de surface. Les bactériophages sont relativement stables dans l'environnement grâce à leur enveloppe protéique qui les protège des stress environnementaux (Davison, 1999). Cependant, le transfert de gènes médié par

les bactériophages s'opère majoritairement entre des membres d'une même famille de bactéries. Le transfert entre des espèces différentes peut se produire si le bactériophage possède une large gamme d'hôtes.

En ce qui concerne la conjugaison, celle-ci est considérée comme le mécanisme le plus efficace et le plus répandu dans l'échange de matériel génétique entre les bactéries que ce soit dans l'environnement ou le monde hospitalier. Ce mécanisme nécessite un contact physique direct entre deux bactéries (une donneuse et une receveuse) d'une même espèce ou d'espèces éloignées grâce à la formation de pili afin de réaliser le transfert d'éléments génétiques mobiles (EGM). Les EGM impliqués dans la dissémination des GRA sont principalement les plasmides, les transposons, et les îlots génomiques.

II.3.A. Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN majoritairement circulaires, extrachromosomiques, capables d'autoréplication et pouvant avoir une taille généralement comprise entre 2 et 200 kilobases et plus exceptionnellement entre 1 et plus de 1000 kilobases. Les plasmides contiennent au minimum l'information génétique requise pour leur réplication mais peuvent également renfermer un large panel de GRA. Les plasmides de grande taille sont généralement conjugatifs. Ils possèdent des gènes permettant leur propre transfert comme une région de transfert *oriT* (origine de transfert) et des régions codantes *tra* (permettant de générer les pili). Les plasmides de plus petite taille sont en général mobilisables étant pourvus de l'origine de transfert mais dépourvus des gènes codant la formation des pili nécessaires à la conjugaison. Ces plasmides peuvent profiter de la machinerie de conjugaison mise en place par les plasmides conjugatifs afin de s'intégrer à la cellule bactérienne receveuse. Les plasmides peuvent également exister et persister sous forme d'ADN extracellulaire dans l'environnement et être intégrés dans les cellules bactériennes par transformation. Ce phénomène de persistance a été décrit dans la littérature dans des eaux marines et fluviales, des eaux de surface des lacs, du sol et même des plantes avec une dégradation de l'ADN plasmidique observée entre 24 h et

plusieurs semaines (Nielsen *et al.*, 2007). Le transfert horizontal des plasmides peut se faire de manière intra- et inter-espèces, favorisant la dissémination des GRA en particulier dans les milieux possédant une forte densité et diversité bactérienne. Parmi les GRA à médiation plasmidique, les gènes codant pour des résistances aux β -lactamines sont les plus fréquemment détectés. Le gène *bla*_{TEM-1}, conférant une résistance aux pénicillines par la production d'une enzyme appelée β -lactamase, a été identifié initialement dans des souches *E. coli* et *Salmonella* en 1965 puis il s'est répandu dans les Enterobacteriaceae dans les années 1970. De nos jours, il existe plus de 480 séquences du gène *bla*_{TEM} selon la base de données TEM Lactamase Engineering (Zeil *et al.*, 2016) résultant de mutations ponctuelles du gène et entraînant une résistance aux céphalosporines en plus des pénicillines par la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) (van Hoek *et al.*, 2011). Certains gènes *bla*_{TEM} tels que *bla*_{TEM-52b} ont été largement identifiés au sein de plasmides portés par des souches *E. coli* et *Salmonella* isolées de viandes de bœuf, de volaille et même d'isolats cliniques en France, au Danemark, aux Pays-Bas et en Belgique (Bielak *et al.*, 2011).

Une autre résistance à médiation plasmidique répandue est la résistance aux quinolones codée par les gènes *qnr*. Le gène *qnrA* a été découvert dans les années 1990 lors de l'étude de la résistance aux β -lactamines, codée par un plasmide qui s'est avéré être multirésistant et facilement transférable dans des souches de *Citrobacter*, *Salmonella* et *P.aeruginosa*. Depuis, des mutations de ce gène ont été observées avec l'apparition de plusieurs déterminants de résistance plasmidique aux quinolones comme *qnrB* et *qnrS* (Hooper and Jacoby, 2015). Comme pour les gènes de β -lactamases, les gènes *qnr* ont été retrouvés dans des isolats cliniques et animaux mais également dans des espèces bactériennes d'origine aquatique comme *Vibrio*, *Citrobacter* et *Aeromonas* (Poirel *et al.*, 2012). De plus, certains plasmides portant le gène *qnr* peuvent aussi héberger des gènes conférant des résistances à d'autres antibiotiques comme les β -lactamines, les aminoglycosides, le chloramphénicol, la tétracycline, les sulfonamides, le triméthoprime et la rifampicine. Cela favorise non seulement la dissémination des GRA dans l'environnement mais également l'apparition de bactéries multirésistantes.

II.3.B. Les transposons

Les transposons ou éléments transposables sont des éléments d'ADN linéaires capables de se déplacer d'une molécule d'ADN (chromosome ou plasmide) à une autre par transposition. Contrairement aux plasmides, ils sont incapables de s'autorépliquer et vont être répliqués avec la molécule d'ADN qui les porte. De plus, certains transposons peuvent se déplacer d'une bactérie à une autre s'ils sont associés à une structure génétique capable de se transférer horizontalement comme les plasmides (Roberts *et al.*, 2008). Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion (SI), de petite taille, composés d'un gène codant pour la transposase encadré par deux séquences inversées répétées.

Les transposons composites sont de plus grande taille, composés de deux SI aux extrémités et pouvant mobiliser un fragment d'ADN au milieu, contenant par exemple un ou plusieurs GRA. La transposase reconnaît les séquences inversées répétées et déplace le fragment d'ADN central d'un site à un autre. Ces transposons sont souvent impliqués dans la dissémination des GRA comme les transposons Tn 5, Tn 10 ou Tn 1. Le transposon composite Tn 5 comprend des gènes de résistance à la kanamycine, à la bléomycine (un agent anti-cancéreux) et à la streptomycine flanqués de deux copies de la séquence d'insertion IS50. Ce transposon a été isolé de souches de *Caulobacter*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* (Babakhani and Oloomi, 2018) mais également d'échantillons environnementaux comme l'eau de ruisseau (Leff *et al.*, 1993). Le transposon Tn 10, également impliqué dans la transmission des GRA entre bactéries, contient les gènes *tetA*, *tetC*, *tetD* et *tetR* codant la résistance à la tétracycline par la mise en place de pompes à efflux et leur régulation. Il a été identifié dans des souches de *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella* et *Vibrio*. Le transposon Tn 1 possède quant à lui le gène de β -lactamase *bla*_{TEM} et a été retrouvé au sein de plasmides et de chromosomes de nombreuses bactéries notamment de souches commensales d'*E. coli* (Bailey *et al.*, 2011). Il existe également des transposons non composites qui ne contiennent pas de séquences d'insertion à leurs extrémités mais des séquences inversées répétées nécessaires à la transposition. Parmi ces

transposons, le transposon Tn 3 contient le gène de résistance *bla*_{TEM-1} ainsi que les gènes *tnpA* et *tnpB* codant pour la transposase et la resolvase, respectivement (Barbu *et al.*, 2018).

II.3.C. Les îlots génomiques

Les îlots génomiques sont des EGM dont la taille varie de quelques kilobases à plus de 500 kilobases capables de s'intégrer et de s'exciser de l'ADN chromosomique ou plasmidique des bactéries Gram positives et Gram négatives (Li and Wang, 2021). Ces îlots génomiques comprennent les ICE (Integrative and Conjugative Elements) qui contiennent les gènes codant pour la machinerie nécessaire à son transfert par conjugaison, et les IME (Integrative and Mobilizable Elements) qui eux ne sont pas conjuguatifs mais mobilisables, contenant les éléments indispensables à leur excision et intégration. Contrairement aux plasmides, les ICE et les IME ne peuvent pas s'autorépliquer, leur réplication dépend de la structure génétique sur laquelle ils sont localisés. Outre les gènes intervenant dans l'excision, l'intégration et la régulation des ICE et des IME, ces éléments génétiques peuvent également contenir des GRA faisant d'eux des vecteurs clés dans la propagation de la résistance aux antimicrobiens. Parmi les ICE, le transposon conjugatif Tn 916 code pour la résistance à la tétracycline. L'étude menée par Johnson and Grossman (2015) a démontré que ce transposon pouvait être transféré entre des souches d'*E. faecalis* par conjugaison en absence de plasmide puisqu'il contient les gènes nécessaires à son propre transfert et à son intégration dans l'ADN plasmidique et chromosomique de la cellule receveuse. Un autre ICE, Tn 4371, a été identifié dans une souche de *P. aeruginosa* isolée d'un échantillon d'eaux usées aux Etats-Unis et contenait deux copies du gène de résistance *bla*_{KPC-2} associées aux gènes *bla*_{SHV-12} et *qnrB19* (Botelho *et al.*, 2018). L'ICE SXT, d'une taille d'environ 100 kb et faisant partie de la famille SXT/R391, a initialement été isolé d'une souche clinique de *V. cholerae* O139 en Inde et lui conférait une résistance aux sulfonamides, au triméthoprime, au chloramphénicol et à la streptomycine (Waldor *et al.*, 1996). Dalsgaard *et al.* (2001) ont également rapporté la présence d'un ICE de la famille SXT/R391 dans une souche clinique de *V. cholerae* O1 isolée en Afrique du Sud qui médiait la résistance à la tétracycline (gène *tetA*) en plus des quatre résistances exposées précédemment.

II.3.D. Les intégrons

Les intégrons sont des éléments génétiques retrouvés principalement dans les bactéries Gram négatives et fournissent une plateforme pour la capture et l'expression de gènes sous forme de cassettes. Ces structures ne sont pas mobiles mais vont se propager dans les bactéries en étant localisées sur des EGM tels que les plasmides et les transposons. Les intégrons peuvent acquérir ou perdre ces cassettes de gènes mobiles, capables d'être intégrés ou excisés dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique de site catalysé par une intégrase. Ces intégrons sont principalement constitués du gène *intI* (codant pour l'intégrase), du site de recombinaison *attI* et d'un promoteur P_c qui contrôle le niveau de transcription des gènes intégrés dans la cassette. En revanche, la plupart des gènes présents dans ces cassettes sont dépourvus de promoteur, leur régulation dépend alors du promoteur situé dans le segment 5' conservé (Hall and Collis, 1995). Au niveau de la cassette de gènes se trouve le site de recombinaison *attC* qui permet l'intégration de la cassette de gènes par recombinaison avec le site *attI*. Ils sont regroupés en différentes classes en fonction de la séquence nucléique des gènes d'intégrase. Les intégrons de classe 1 (*intI1*), de classe 2 (*intI2*) et de classe 3 (*intI3*) sont impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques, mais c'est l'intégron de classe 1 qui est le plus communément retrouvé dans la plupart des isolats cliniques et environnementaux (Gillings *et al.*, 2008).

Les intégrons peuvent être localisés sur le chromosome des bactéries mais aussi sur des transposons (ex : Tn 21, Tn 1696) eux-mêmes situés sur des plasmides conjugatifs ou sur des ICE/IME. Ils sont considérés comme le principal acteur dans la propagation de la résistance aux antimicrobiens en raison de leur capacité à incorporer un grand nombre de GRA et à les rendre fonctionnels grâce à un système d'expression génétique adapté (Deng *et al.*, 2015). Les cassettes sont constituées de gènes codant pour des résistances à un large panel d'antibiotiques mais la plupart des intégrons de classe 1 contiennent un gène de résistance aux aminoglycosides (gène *aadA*). En aval de la cassette de gènes se trouvent généralement les gènes *qacEΔ1* et *sul1*, codant respectivement pour la résistance aux sels d'ammonium quaternaire et aux sulfonamides. A ce jour, plus de 130 cassettes différentes ont été

caractérisées contenant des gènes impliqués dans la résistance aux β -lactamines, aux aminoglycosides, au chloramphénicol, à l'érythromycine, aux quinolones et au triméthoprim. Seule la résistance à la tétracycline n'a pas été caractérisée dans ces cassettes de gènes. La prévalence des intégrons de classe 1 a été couramment observée dans les bactéries à Gram négatif d'origine clinique mais ils ont aussi été identifiés dans quelques bactéries à Gram positif comme *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Aerococcus*.

II.4. Les systèmes de surveillance de la résistance aux antimicrobiens à l'échelle nationale et européenne

Face au problème sanitaire que représente la résistance aux antimicrobiens et leur dissémination, l'Autorité européenne de sécurité des aliments a mis en place par la Directive 2003/99/EC des plans de surveillance des résistances aux antimicrobiens dans les bactéries zoonotiques alimentaires pour l'Homme (comme *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp.) et les bactéries indicatrices de résistance aux antimicrobiens (comme *E. coli*) dans les animaux producteurs d'aliments et les viandes dérivées (European Food Safety Authority, 2022). Entre 2019 et 2020, les résultats des plans de surveillance ont permis de constater des niveaux élevés de résistance à l'ampicilline, aux sulfonamides et aux tétracyclines dans des souches humaines de *Salmonella* spp. et des niveaux très élevés de ces mêmes résistances dans des souches animales. Le taux de souches humaines multirésistantes était de 25 %. Le suivi d'*E. coli* par l'isolement de la bactérie et la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) pour les antimicrobiens d'importance clinique a montré des niveaux élevés voire très élevés de résistances à l'ampicilline, aux sulfonamides, au triméthoprim, aux quinolones et aux tétracyclines dans toutes les catégories d'animaux. Mais cette surveillance ne concerne que les filières de bovins, de volailles et de porcs. Aucune surveillance n'a été établie concernant les produits de la pêche et de l'aquaculture en Europe. Seule une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline a été détectée parmi 103 échantillons de tissus de poissons d'eau douce sauvages en Allemagne.

En 2015, le système GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System) a été lancé à l'échelle mondiale. Ce programme soutient le plan d'action mondial sur la résistance aux antimicrobiens avec pour principal objectif le renforcement des bases de données grâce à une surveillance et une recherche mondiale améliorées. Le but est d'aider dans la prise de décisions et de conduire des actions régionales, nationales et mondiales (WHO, 2020). Au niveau européen, le réseau Ears-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) a été mis en place en 1998. Coordonné par le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies depuis 2012, c'est le plus grand système financé par l'Europe pour la surveillance de la résistance aux antimicrobiens. Les bactéries ciblées par cette surveillance sont *Streptococcus* spp. et *Staphylococcus aureus* depuis 1999, *E. coli*, *E. faecalis* et *E. faecium* depuis 2001, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* depuis 2005 et *Acinetobacter* spp. depuis 2012 (ECDC, 2020).

En France, le plan EcoAntibio 2 a été mis en place par le Ministère de l'Agriculture entre 2017 et 2022, faisant suite au plan EcoAntibio 1 de 2012 à 2016. Le principal objectif de ce plan est de maintenir dans la durée la diminution de l'exposition des animaux domestiques et d'élevage aux antibiotiques afin de lutter contre la résistance aux antimicrobiens. Le premier plan EcoAntibio a d'ailleurs permis d'observer une diminution de l'exposition des animaux aux antibiotiques de 20 % entre 2012 et 2015 (Moulin *et al.*, 2017). Toujours au niveau national, le réseau d'épidémiologie de la résistance aux antimicrobiens des bactéries pathogènes animales (RESAPATH) a été créé en 1982. Ce réseau vise à collecter l'ensemble des résultats d'antibiogrammes réalisés par des laboratoires de diagnostic vétérinaire afin de suivre la résistance aux antimicrobiens de bactéries pathogènes animales et de contribuer au bon usage des agents antimicrobiens dans le monde animal. Les données ainsi obtenues sont mises en relation avec les données collectées pour l'Homme grâce à son intégration à l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Les souches bactériennes sont collectées par plus de 70 laboratoires d'analyses vétérinaires et conservées afin de procéder à des études approfondies sur les mécanismes d'antibiorésistance des bactéries. Le champ d'action de RESAPATH était d'abord restreint aux bactéries pathogènes bovines, puis porcines et de

volailles, avant de s'étendre à l'ensemble des animaux (ovins, caprins, lapins, équidés, chiens, chats). Concernant les produits aquatiques, le dernier rapport RESAPATH recense des données d'antibiogrammes en majorité pour une seule espèce bactérienne, *Aeromonas salmonicida*, isolée de poissons d'élevage (truites arc-en-ciel, bars et turbots) (ANSES, 2020b).

En raison de la diversité des GRA dans les différents compartiments environnementaux comme les sols et les eaux, le suivi de chaque gène prend beaucoup de temps et de moyens. La multiplicité des méthodes de détection et de quantification des GRA couplée aux diverses techniques d'échantillonnage et de traitement des échantillons rend la comparaison des résultats obtenus dans les études difficile. Une harmonisation des méthodes d'analyse des GRA et la mise en place d'indicateurs de contamination par la résistance aux antimicrobiens est donc nécessaire pour que les résultats puissent être complémentaires. Le besoin de disposer de ces indicateurs génétiques pour le suivi et la surveillance de la résistance aux antimicrobiens est une problématique connue et abordée dans de nombreuses études. Un gène indicateur doit par définition être relativement simple à suivre, informer sur la dynamique de résistance globale, indiquer une pression anthropique et peut être couplé avec la recherche de GRA pour étudier la dynamique de transfert (ANSES, 2020a). Le suivi de gènes indicateurs plutôt que de bactéries indicatrices permet de palier la perte rapide de cultivabilité des bactéries dans l'environnement et de suivre le devenir spatio-temporel à grande échelle de la résistance aux antimicrobiens. Un projet interdisciplinaire à l'échelle européenne nommé DARE (Detecting Evolutionary Hotspots of Antibiotic Resistance in Europe) a été lancé en 2009 (Berendonk *et al.*, 2015). Le consortium de ce projet a proposé des indicateurs bactériens mais aussi génétiques pour le suivi de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement. Un certain nombre de déterminants génétiques impliqués dans la résistance aux antimicrobiens ont donc été proposés comme indicateurs de résistance aux antimicrobiens sur la base de différents critères (Tableau 1). Ces critères sont entre autres la pertinence clinique des gènes, leur prévalence dans les compartiments environnementaux soumis aux activités anthropiques et leur association avec des EGM ou tout autre vecteur de transmission de la résistance.

Le suivi de ces indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les différentes niches écologiques serait le premier pas pour une normalisation des études afin de pouvoir comparer les données à travers le monde et d'obtenir une vision globale du résistome environnemental. En effet, chaque niche écologique (environnements terrestres et aquatiques) possède des particularités en terme de conditions environnementales et donc de diversité bactérienne, de BRA et de GRA. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur la présence des BRA, des GRA et des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans le milieu marin qui constitue un environnement peu exploré.

Tableau 1 : Déterminants génétiques proposés comme indicateurs de contamination de l'environnement par la résistance aux antimicrobiens, d'après Berendonk *et al.* (2015).

Déterminants génétiques	Protéines codées	Familles d'antibiotiques ciblées
<i>sul1, sul2</i>	<i>sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase</i>	sulfonamides
<i>bla_{TEM}, bla_{CTX-M}</i>	β -lactamases fréquemment identifiées dans les <i>Enterobacteriaceae</i>	β -lactamines
<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>New Delhi Metallo-β-lactamase</i>	β -lactamines
<i>bla_{VIM}</i>	carbapénémase fréquente dans <i>P. aeruginosa</i>	carbapénèmes
<i>bla_{KPC}</i>	<i>K. pneumoniae carbapenemase</i>	carbapénèmes
<i>qnrS</i>	<i>quinolone pentapeptide repeat family</i>	quinolones
<i>aac-(6')-Ib-cr</i>	<i>aminoglycoside acetyltransferase</i>	aminosides et fluoroquinolones
<i>vanA</i>	gène de l'opéron de résistance à la vancomycine	glycopeptides
<i>mecA</i>	protéine de liaison aux pénicillines	β -lactamines
<i>ermB, ermF</i>	<i>rRNA adenine N-6-methyltransferase</i>	macrolides
<i>tetM</i>	protéine de protection ribosomale	tétracyclines
<i>aph</i>	<i>aminoglycoside phosphotransferase</i>	aminosides
<i>int1</i>	intégrase des intégrons de classe 1	-

III. La dissémination de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin

III.1. Les sources de contamination de l'environnement marin par les contaminants biologiques

Il est maintenant reconnu que les principales sources de contamination de l'environnement marin par des polluants biologiques tels que les GRA sont d'origine anthropique notamment par les effluents d'eaux usées (Figure 3). Ces GRA provenant des eaux usées hospitalières, urbaines et industrielles vont converger vers les stations de traitement des eaux usées (STEU). Les boues d'épuration qui sont le principal déchet produit suite au traitement des eaux usées sont alors souvent utilisées pour fertiliser les terres agricoles alors qu'elles contiennent encore des GRA. En temps de fortes pluies, il peut se produire un ruissellement agricole qui va entraîner un écoulement d'eau de surface sur les zones de culture, la formation de boues contaminées et un déversement dans le bassin versant. En parallèle de ces boues d'épuration, les eaux traitées des STEU mais impropres à la consommation sont rejetées directement dans les rivières toujours chargées en GRA et vont alors se propager jusqu'au milieu marin constituant le récepteur final. La pollution de l'environnement marin peut aussi provenir d'effluents contaminés venant de secteurs dépourvus d'installations d'assainissement et de traitement des eaux usées qui vont alors se déverser dans les rivières voire dans l'environnement marin. Il existe également un impact lié aux activités aquacoles par les effluents des bassins basés à terre rejetés dans les eaux marines ou par les échanges directs entre l'environnement marin et les exploitations en système ouvert ou semi-ouvert. Ces compartiments environnementaux ont été caractérisés comme des points chauds ou « hotspots » pour la résistance aux antimicrobiens et sont développés dans les paragraphes suivants (Kunhikannan *et al.*, 2021).

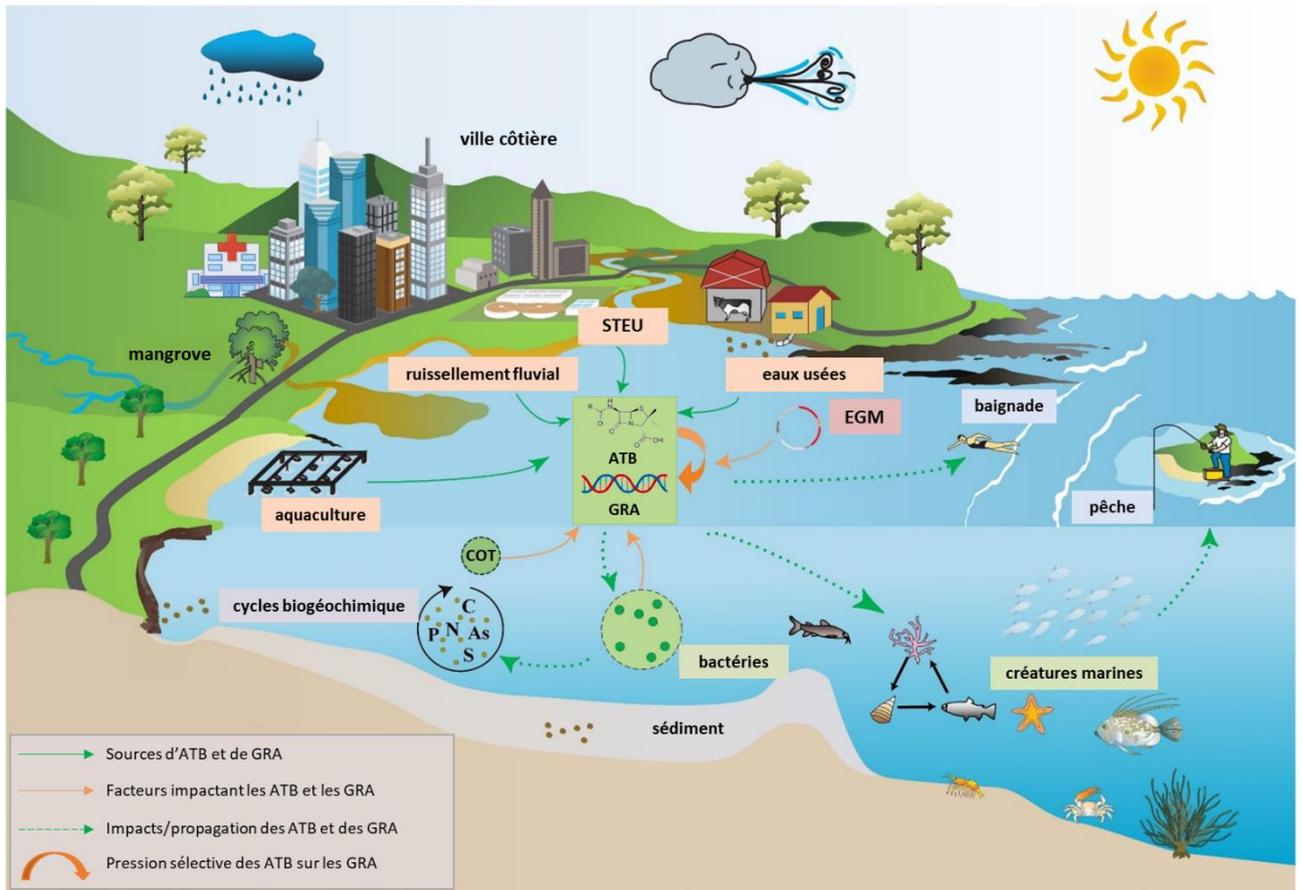


Figure 3 : Schéma de la dissémination des antibiotiques (ATB) et des gènes de résistance aux antimicrobiens (GRA) dans l'environnement marin (d'après Zheng *et al.* (2021)). STEU : station de traitement des eaux usées ; EGM : éléments génétiques mobiles ; COT : carbone organique total.

III.1.A. Les eaux usées hospitalières, domestiques et industrielles

L'abondance accrue des GRA dans les eaux usées hospitalières représente un risque élevé de dissémination dans l'environnement en raison d'une utilisation intensive d'antibiotiques en santé humaine entraînant une pression de sélection constante sur les bactéries. En effet, les établissements de santé comme les hôpitaux concentrent une forte proportion de patients traités aux antibiotiques et une forte prévalence de GRA. Une méta-analyse réalisée en 2020 a regroupé 21 études internationales dont 11 menées en Europe (Roumanie, Belgique, Portugal, France, Pays-Bas, Suisse et Espagne) sur l'abondance des GRA dans les effluents hospitaliers (Zhang *et al.*, 2020). Parmi les gènes les plus abondants ont été identifiés des gènes codant pour des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}), des gènes de résistance aux carbapénèmes (*bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}), aux

tétracyclines (*tetB*, *tetC*, *tetM*, *tetO*), aux quinolones (*qnrA*, *qnrS*) mais également le gène de l'intégrase de l'intégron de classe 1 (*intI1*). D'autres gènes moins abondants ont également été quantifiés comme des gènes de résistance aux sulfonamides (*sul1*, *sul2*), aux tétracyclines (*tetA*) et les gènes des intégrases des intégrons de classes 2 et 3 (*intI2* et *intI3*). En France, de fortes concentrations en intégrons de classe 1 ainsi que des concentrations plus faibles en intégrons de classes 2 et 3 ont également été rapportées dans les eaux usées d'un hôpital (Stalder *et al.*, 2014). Les cassettes de gènes associées aux intégrons dans ces échantillons codaient principalement pour des résistances aux aminoglycosides (gènes *aacA4* et *aadB*). D'autres cassettes de gènes ont également été observées et codaient pour des résistances aux β -lactamines (gènes *bla_{BEL}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXa}*), au triméthoprim (gènes de type *dfr*) et à l'érythromycine (gènes de type *ere*). Certains de ces intégrons et cassettes de gènes ont même été détectés dans l'effluent de la station d'épuration municipale recevant l'effluent de l'hôpital révélant que les activités humaines sont une source importante d'intégrons de classe 1 associés à une grande diversité de GRA.

Les eaux usées domestiques peuvent aussi être contaminées par les GRA et présenter des concentrations voire une diversité différente des eaux usées hospitalières. Entre 2012 et 2015, une étude comparative a été réalisée sur 126 échantillons d'eaux usées domestiques et hospitalières en Haute-Savoie (France) (Buelow *et al.*, 2019). Ces eaux usées domestiques et hospitalières avaient des signatures distinctes en termes de résistome. Une dominance des gènes *bla_{VIM}*, *bla_{CTX-M}*, *vatB* (résistance aux streptogramines), *ermB* (résistance aux macrolides) et des gènes de transposase *ISS1N/ISEc9* a été observée dans les eaux usées domestiques. Cette abondance de GRA a été reliée à une prescription en streptogramine et en macrolide plus importante en ville ciblant des pathogènes différents du milieu hospitalier. Dans les eaux usées hospitalières, les gènes *qnr*, *tetW* et *intI1* étaient principalement identifiés. La présence des gènes de transposase et d'intégron de classe 1 reflétait une forte dissémination des GRA à partir de ces eaux usées. A l'échelle européenne, les GRA ont été quantifiés dans les affluents (eaux entrant dans les STEU) et effluents de STEU urbaines au Portugal, à Chypre, en Irlande, en Allemagne en Norvège et en Finlande afin de caractériser le résistome urbain

(Pärnänen *et al.*, 2019). Tous les échantillons analysés contenaient des gènes de résistance aux aminoglycosides (*aadA* et *strB*), aux β -lactamines (*bla_{GES}*, *bla_{OXA}*, *bla_{VEB}*), aux sulfonamides (*sul1*), aux tétracyclines (*tetM*, *tetQ*) ainsi que des éléments génétiques impliqués dans le transfert des gènes comme *int11*. Certains gènes critiques en santé humaine ont également été identifiés dans certains affluents de STEU au Portugal, en Espagne, à Chypre et en Allemagne comme le gène *bla_{VIM}* codant pour une β -lactamase capable d'hydrolyser toutes les β -lactamines (excepté les monobactames) et d'échapper aux inhibiteurs des β -lactamines. En Italie, les gènes *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *ermB*, *qnrS*, *sul2*, *tetA* et *int11* ont été détectés dans l'affluent d'une STEU recevant des eaux usées domestiques (Di Cesare *et al.*, 2016).

Les eaux usées industrielles constituent également un réservoir de résistance aux antimicrobiens, notamment les effluents des industries pharmaceutiques et des abattoirs. Etant donné que la majorité des antibiotiques consommés en France sont produits à l'étranger, la contamination de l'environnement par les effluents des industries pharmaceutiques n'est pas documentée. En Croatie, une étude a été réalisée sur le rôle des effluents d'industries pharmaceutiques dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans les compartiments récepteurs (González-Plaza *et al.*, 2019). Cette étude a été menée au niveau d'industries pharmaceutiques produisant des antibiotiques comme les macrolides, sulfonamides, tétracyclines, fluoroquinolones et β -lactamines, dont les effluents ont été déversés dans des rivières voisines. Des traces de certains de ces antibiotiques ont été retrouvées dans les effluents de ces industries mais aussi dans l'eau et les sédiments des rivières réceptrices. De plus, certains gènes comme *int11*, *sul1*, *sul2* et *tetA* ont également été identifiés, portés par des plasmides du groupe IncP-1 pouvant se transférer et se répliquer dans pratiquement toutes les bactéries à Gram négatif. Si certains déchets sont directement acheminés vers les sols et rivières, les eaux usées hospitalières, domestiques, industrielles et agricoles sont majoritairement acheminées, mélangées et traitées dans les STEU.

III.1.B. Les stations de traitement des eaux usées (STEU)

Les rejets des STEU constituent la principale source de contamination des milieux aquatiques par les BRA et les GRA. En effet, les STEU ont été créées et optimisées dans le but d'éliminer les matières organiques et particulaires mais pas d'éliminer les BRA et GRA. L'arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif a introduit des indications quant au suivi des micropolluants tels que les pesticides et les métaux dans les eaux usées traitées, mais aucune exigence n'a été fixée pour les BRA et les GRA. Le niveau de contamination des STEU est dépendant de l'origine des eaux usées mais également des traitements qui leur sont appliqués. Trois opérations sont principalement mises en place dans le traitement des eaux usées. Le pré-traitement et le traitement primaire comprennent le dégrillage, le dessablage, le déshuilage et la décantation primaire pour éliminer les déchets volumineux, les corps gras de l'eau et pour extraire le sable afin de récupérer la boue au fond des bassins. Le traitement secondaire des eaux usées consiste principalement à acheminer les eaux dans un bassin où se sont développées des bactéries qui vont dégrader les matières organiques et les transformer en boues généralement utilisées comme engrais en agriculture. Des études menées sur des boues actives de STEU ont démontré une forte concentration de GRA, comme en Chine, où ces boues présentaient de fortes abondances des gènes *sul1*, *sul2*, *int11*, *tet33*, *tet36*, *tetC* et *tetM* (Wang *et al.*, 2013). Les eaux usées traitées sont ensuite majoritairement rejetées dans les eaux de surface. En Espagne, une étude a été réalisée sur l'abondance de GRA dans l'affluent et l'effluent d'une STEU afin de déterminer leur élimination lors du processus de traitement des eaux (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2015). Les résultats ont montré une forte abondance des gènes *bla_{TEM}*, *sul1*, *tetW*, *ermB* et *qnrS* dans l'affluent de la STEU (jusqu'à 6 log copies de gène/ml d'eau) avec une diminution de celle-ci dans l'effluent de la STEU (une diminution pouvant aller jusqu'à 2 ou 3 log copies de gène/ml d'eau) donc une dégradation partielle de ces contaminants. Une étude menée en Pologne a mis en évidence des concentrations élevées des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*, *tetA*, *sul1* et *mefA* dans les effluents de plusieurs STEU (jusqu'à 7 log copies de gène/ml d'eau) (Osińska *et al.*, 2020). Dans une de ces STEU, il a été observé une réduction de 90 % de

l'abondance du gène *tetB*. En revanche, une augmentation de la concentration des gènes *bla_{SHV}*, *sul1* et *tetX* dans les eaux usées traitées par rapport aux eaux usées brutes a également été observée dans une autre STEU. Cela indiquait des conditions favorables à une forte pression sélective et au transfert horizontal des GRA à l'intérieur des STEU entraînant un flux de ces gènes dans l'environnement avec les eaux usées traitées. Une autre étude s'est intéressée à l'abondance des GRA dans les effluents de STEU à l'échelle européenne (Cacace *et al.*, 2019). Globalement, les gènes *sul1* et *int11* étaient les plus abondants, suivi des gènes *tetM*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*. Le gène de résistance à la colistine *mcr-1*, qui est un antibiotique de dernier recours en santé humaine, a été détecté dans les effluents de STEU en France, en Italie, en Norvège, au Portugal, en Allemagne, aux Pays-Bas, à Chypre, au Royaume-Uni et en Autriche. Des études ont démontré que l'abondance des GRA déversés dans l'environnement pouvait également être dépendante des précipitations. En temps de fortes pluies, les gènes *sul1* et *int11* étaient plus abondants qu'en période sèche en raison d'une surcharge au niveau des STEU ce qui a entraîné un déversement d'eaux usées brutes dans l'environnement (Lee *et al.*, 2022).

III.1.C. Les effluents de rivières

La présence de BRA et de GRA a été caractérisée dans des systèmes fluviaux partout à travers le monde (Singh *et al.*, 2019). La plus grande diversité de GRA a été observée dans les pays asiatiques (principalement en Chine et en Inde) avec une dominance des gènes de résistance aux sulfonamides (*sul1*, *sul2*, *sul3*) et aux tétracyclines (majoritairement les gènes *tetA* et *tetB*). Concernant l'Europe, ce sont les gènes codant pour des BLSE qui prédominaient en Autriche (*bla_{CTX-M}*) et au Royaume-Uni (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*), et les gènes de résistance aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) en Espagne et en Suisse. La majorité de ces GRA était associée à des déterminants génétiques impliqués dans le transfert de gènes comme des plasmides conjugatifs, des transposons, des intégrons de classes 1 et 2 ainsi que des bactériophages. Les niveaux de BRA et GRA détectés dans les rivières sont en partie liés aux activités humaines notamment au niveau des rejets des STEU et dépendent de la densité de la population et des traitements des eaux usées. L'étude menée par Chaturvedi *et al.* (2021) en Inde a mis en évidence une forte prévalence des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *sul1*, *sul2* et *int11* dans 4

systèmes fluviaux fortement impactés par les déchets domestiques, hospitaliers et industriels. En Pologne, Koczura *et al.* (2016) ont suivi l'abondance des gènes *sul1*, *sul2* et *int11* à différentes localisations d'une rivière. Ils ont mis en évidence une plus forte abondance de ces gènes en aval de la rivière, à 5 km des rejets de STEU, par rapport aux sites localisés en amont de la rivière (soumis à une faible pression anthropique) et au niveau de la ville (soumis aux rejets de STEU), démontrant une dissémination et une accumulation des GRA jusqu'à des endroits de la rivière soumis à peu d'impacts anthropiques, loin des rejets d'eaux usées. De manière semblable, de fortes concentrations des gènes *bla_{TEM}*, *sul1* et *qnrS* (jusqu'à 5 log copies de gène/ml d'eau) ont été observées dans le cours inférieur d'un fleuve en Espagne juste avant son déversement dans la Mer Méditerranée (Calero-Cáceres *et al.*, 2017). Ces gènes étaient également associés à l'ADN de bactériophages, témoignant du potentiel de dissémination et de transfert des GRA entre bactéries par transduction. En Belgique, les gènes de résistance *sul1*, *sul2*, *tetW*, *tetO*, *bla_{TEM}* et *qnrS* ont été quantifiés le long de la Senne, une rivière traversant la capitale et soumise aux rejets de deux STEU (Proia *et al.*, 2018). Des concentrations plus élevées de ces gènes ont été observées au niveau de la capitale bruxelloise et en aval des rejets des STEU démontrant une augmentation de l'abondance des GRA de l'amont à l'aval des rivières avec un impact significatif des activités urbaines. Les BRA et GRA pénètrent dans les rivières réceptrices en plus ou moins grande quantité par les eaux usées traitées et sont soumis à différents facteurs impactant leur dispersion comme leur dilution dans le milieu. Les GRA persistent plus longtemps que les bactéries dans l'environnement aquatique pouvant se retrouver hors des cellules bactériennes sous forme d'ADN libre ou associés à l'ADN des bactériophages.

III.1.D. Les effluents d'aquaculture

Depuis 2001 en Europe, l'utilisation prophylactique des antibiotiques est interdite en aquaculture (Directive 2001/82/EC). En France, seuls 5 antibiotiques disposant d'une autorisation de mise sur le marché peuvent être utilisés dans la filière piscicole, à savoir l'oxytétracycline, le florfénicol, la fluméquine, l'acide oxolinique et la combinaison triméthoprim-sulfonamide. Une étude a révélé que 17 composés antimicrobiens étaient utilisés dans 32 piscicultures au Vietnam, principalement les

fluoroquinolones, phénicol, sulfonamides et tétracyclines (Rico *et al.*, 2013). Cette utilisation d'antibiotiques en aquaculture entraîne une forte pression de sélection sur les bactéries présentes dans les bassins et/ou associées aux animaux d'élevage. En Australie, des souches de *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* et *Staphylococcus* présentant des résistances phénotypiques acquises à l'ampicilline, l'amoxicilline, la céfalexine et l'érythromycine ont été isolées de crustacés, de poissons et d'échantillons d'eau de milieux aquacoles (Akinbowale *et al.*, 2006). Une étude a été menée dans plusieurs étangs aquacoles en Chine présentant une forte densité d'individus et une utilisation de sulfonamides, de tétracyclines, de β -lactamines et de quinolones à des fins prophylactiques. L'analyse des sédiments de ces étangs a révélé une forte abondance des gènes de résistance *sul1*, *tetW*, *bla_{OXA}*, *bla_{CMY}* mais aussi du gène *int11* (Cheng *et al.*, 2021). Ces travaux ont notamment démontré que l'environnement aquacole constitue un réservoir de BRA et de GRA. Dans un élevage de crevettes en Chine, les gènes de résistance *sul1*, *floR* et *cmlA* (résistance au chloramphénicol) ont été quantifiés dans les sédiments, l'eau des étangs, une rivière à proximité (la source d'eau des étangs) mais aussi dans l'effluent des bassins (Wang *et al.*, 2019). En effet, les GRA étaient légèrement moins abondants dans l'effluent que dans l'eau des bassins avec une différence d'un demi log pour certains gènes démontrant une élimination partielle de ces GRA. Ceci constitue un risque à la fois par la consommation des produits de l'aquaculture et par la dissémination des GRA directement dans l'environnement marin.

III.2. La propagation de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin

Il a été estimé que 80 % de la pollution marine était d'origine anthropique, émanant principalement de rejets directs sous forme d'effluents provenant d'activités terrestres ou maritimes et du ruissellement des fleuves (Amara, 2010). Cette pollution est d'autant plus importante au niveau des littoraux, marqués par des pressions anthropiques plus accentuées en raison d'une urbanisation en constante augmentation.

III.2.A. L'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans l'eau de mer

Les eaux côtières sont à l'interface entre les écosystèmes terrestres, les eaux douces et les eaux de pleine mer. La présence des BRA et GRA dans les eaux côtières représente non seulement un risque en santé humaine par la consommation de produits aquatiques contaminés mais aussi un risque par les activités de baignade. En France, un baigneur ayant plongé dans la Mer Méditerranée et aspiré de l'eau de mer dans ses poumons a contracté une pneumonie à *S. algae*. Cette souche a été isolée d'un lavage broncho-alvéolaire et présentait les gènes de β -lactamases *ampC* et *bla_{OXA-55}*, le gène de résistance aux quinolones *qnr4*, un gène de transposase et un ensemble de gènes permettant son adaptation et sa survie dans l'environnement marin (Cimmino *et al.*, 2016). La résistance aux antimicrobiens dans l'écosystème marin reste peu étudiée malgré la prédisposition de ce milieu à recevoir de nombreux effluents contaminés et constituer ainsi un réservoir potentiel de GRA. La majorité des études concernant l'occurrence des GRA dans cet environnement est limitée aux eaux côtières et estuariennes. Géographiquement, ces études ont pour la plupart été réalisées en Asie où la production et la consommation de composés antimicrobiens sont élevées (Figure 4).

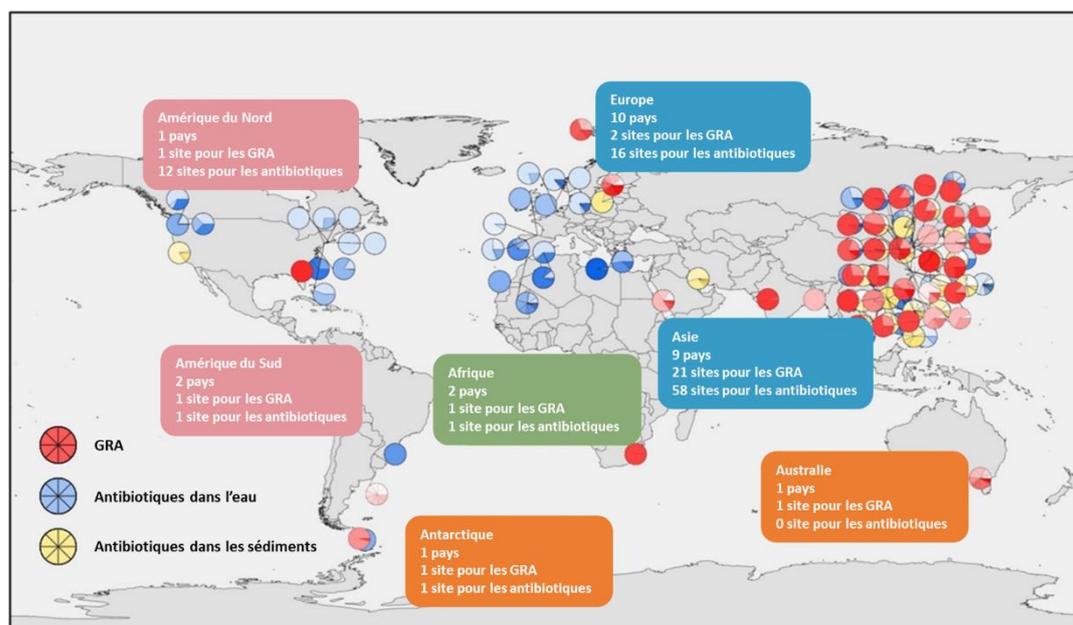


Figure 4 : Distribution géographique des études réalisées sur l'occurrence des antibiotiques et des gènes de résistance aux antimicrobiens (GRA) dans les environnements côtiers et estuariens d'après Zheng *et al.* (2021).

Su *et al.* (2020) ont réalisé une étude spatiale sur les GRA en Chine, le long de la rivière Haihe jusqu'aux eaux de baignade de la Mer Jaune. Ils ont observé une prévalence plus faible des GRA dans les eaux côtières par rapport aux eaux de rivière. Toutefois, les gènes *tetC*, *tetM*, *tetQ*, *sul1* et *sul2* étaient présents dans 100 % des échantillons d'eau de mer et les gènes *bla_{TEM}*, *ampC*, *sul3*, *qnrA* et *ermB* dans au moins 50 % des échantillons. Les gènes les plus abondants en terme de concentration étaient *ermB*, *sul1*, *sul2* et *bla_{TEM}* avec des concentrations comprises entre 10^5 et 10^7 copies/L d'eau. De manière surprenante, le gène *ermB* était plus abondant dans l'eau de mer que dans l'eau de rivière pouvant témoigner d'un fort potentiel de dissémination de ce gène dans les eaux côtières. Des abondances de 10^7 copies/L d'eau de mer des gènes *sul1*, *sul2* et *int11* ont également été rapportées dans les eaux de baignade à proximité de la Mer Jaune (Na *et al.*, 2014). Ces observations étaient en concordance avec l'étude menée par Lu *et al.* (2019) qui ont étudié la résistance aux antimicrobiens dans la Mer Jaune et la Mer Bohai au niveau des eaux côtières mais aussi extracôtières. L'abondance de GRA comme *sul1*, *sul2*, *tetB*, *tetG*, *tetX*, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* était de 10^4 - 10^6 copies/L dans les eaux extracôtières et de 10^7 - 10^8 copies/L dans les eaux côtières. Ils ont observé une abondance plus élevée pour les gènes *sul1* et *sul2* (jusqu'à 10^6 copies/L) suivi du gène *tetX* (10^5 copies/L). De plus, ils ont quantifié le gène *int11* dans l'ensemble des échantillons d'eaux côtières et extracôtières jusqu'à 10^7 copies/L. Ces résultats démontrent que l'impact de la pollution anthropique sur l'occurrence des GRA est plus importante au niveau des côtes mais que ces gènes sont tout de même bien présents plus au large des côtes. Ces résultats peuvent également démontrer un portage des GRA par une population bactérienne qui diffère entre la zone côtière soumise aux arrivées d'eau douce et la zone extracôtière.

Plus au sud de la Chine, dans la Baie de Dapeng, les gènes *floR* (résistance au florfénicol), *cmIA*, *sul1* et *int11* ont été quantifiés jusqu'à 10^8 copies/L dans des échantillons d'eau prélevés dans un espace d'aquaculture en cage de palomines (*Trachinotus ovatus*) et de dorades marbrées (*Siganus oramin*), dans une zone à 1 km de cet espace d'aquaculture mais aussi dans une zone de tourisme, reflétant la pluralité des apports de pollution anthropique (Li *et al.*, 2020). En Europe, peu de données existent sur l'abondance des GRA dans les eaux marines. Une étude a été menée entre 2008 et 2009 au Nord de

l'Europe dans la Mer Baltique, qui est soumise aux impacts anthropiques de 9 pays côtiers ayant une utilisation des antibiotiques et des politiques de traitement des eaux usées différentes (Tiirik *et al.*, 2014). Les GRA les plus abondants dans les échantillons d'eau de mer prélevés au niveau de la surface étaient *tetA* (à 10^4 copies/L), *tetB* et *bla_{SHV}* (à 10^3 copies/L) qui montraient des concentrations stables entre les différents sites d'échantillonnage. En revanche, une variation dans les concentrations des gènes *tetM* et *sul1* (de 10 à 10^4 copies/L) entre les sites d'échantillonnage a été observée, avec des concentrations plus élevées dans les zones plus éloignées des côtes.

Afin de comparer le niveau des résistances aux antimicrobiens entre les zones avec et sans influences humaines, une étude a été menée sur l'abondance des GRA dans l'eau de mer au niveau de la côte méditerranéenne et de la côte antarctique (Blanco-Picazo *et al.*, 2020). L'abondance des gènes de résistance *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *sul1* et *tetW* dans l'eau de mer était jusqu'à trois fois plus élevée en Mer Méditerranée que dans l'Antarctique avec des concentrations moyennes de 6 log copies/L d'eau de mer, les gènes les plus abondants étant *bla_{TEM}* et *tetW*. Ces résultats démontrent non seulement que les GRA sont plus abondants dans les zones soumises aux impacts anthropiques mais aussi que ces gènes peuvent être présents dans des environnements relativement vierges, faisant des eaux marines un réservoir de GRA. Si peu de données existent sur l'abondance des GRA dans les eaux marines européennes, certaines études ont été réalisées sur la détection de GRA dans des bactéries isolées à partir de ces eaux comme *E. coli*. Dans l'Archipel de Berlengas, à 10 km à l'ouest du Portugal, plus de 300 souches d'*E. coli* ont été isolées dans des échantillons d'eaux côtières (Alves *et al.*, 2014). Les gènes les plus couramment détectés étaient *bla_{TEM}* (69 % des souches), *sul1* (29 %), *sul2* (64 %), *tetA* (69 %) et *tetB* (31 %). En Angleterre, ce sont des souches d'*E. coli* porteuses de gènes *bla_{CTX-M}* (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-15}* et *bla_{CTX-M-27}*) qui ont été isolées dans des eaux de baignade (Leonard *et al.*, 2018). Outre l'identification de souches d'*E. coli* porteuses de résistance, le genre *Vibrio* spp. est également recherché en raison de leur prévalence dans l'environnement marin, de la pathogénicité de certaines souches pour l'Homme et de leur capacité à transmettre du matériel génétique. Des souches de *V. cholerae* résistantes aux carbapénèmes ont été isolées d'eaux côtières allemandes, en Mer Baltique

et en Mer du Nord (Hammerl *et al.*, 2017). Une analyse génétique a permis d'identifier le gène *bla_{VCC-1}* comme responsable de cette résistance phénotypique, codant pour une carbapénémase. Sur la côte Ouest de la Norvège, ce sont 60 souches de *Vibrio* qui ont été isolées dans les eaux côtières, appartenant aux espèces *V. alginolyticus*, *V. cholerae* et *V. fluvialis* (Håkonsholm *et al.*, 2020). En plus de posséder différents gènes de virulence, 74 % des souches étaient résistantes à l'ampicilline, 33 % à l'acide oxolinique, 21 % à l'imipénème et 17 % à la tobramycine. La plupart des isolats étaient porteurs du gène *bla_{CARB}*, un isolat possédait le gène *varG* (codant également pour une β -lactamase) mais toutes les souches de *V. alginolyticus* étaient porteuses des gènes de résistance à la tétracycline *tet34* et *tet35*.

III.2.B. L'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans les sédiments marins

Les sédiments marins, qui couvrent la majeure partie de la surface de la planète, sont également considérés comme un réservoir de GRA. Cette occurrence de la résistance aux antimicrobiens a été constatée dans des sédiments issus de milieux marins possédant des caractéristiques et des apports anthropiques différents. Une étude menée sur les sédiments marins dans la région arctique, où les impacts anthropiques sont très limités, a démontré une prévalence élevée des gènes de résistance aux sulfonamides (*sul1*, *sul2*, *sul3*), aux tétracyclines (*tetA*, *tetB*), aux quinolones (*qepA*, *qnrB*), aux β -lactamines (*bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*) et une prévalence encore plus élevée du gène *int11* (Tan *et al.*, 2018). L'isolement et le séquençage des souches bactériennes présentes dans ces échantillons de sédiments marins ont fournis des preuves que les GRA étaient d'origine naturelle mais résultaient également d'une contamination humaine récente. Dans la Mer Rouge, une des mers les plus salées au monde, une grande diversité bactérienne ainsi qu'une forte abondance des gènes *bla_{TEM}*, *qnrS* et *ermC* ont été observées (Ullah *et al.*, 2019). En effet, les bactéries peuvent être sous différentes formes dans l'environnement marin, soit libres dans la colonne d'eau ou alors accrochées aux particules sédimentaires, sous forme de biofilm par exemple. Les sédiments marins renferment une grande concentration de matière organique nécessaire à la croissance des bactéries et leur

fournissent des conditions idéales à la colonisation du substrat par la formation de biofilm pour leur survie. En raison de la densité bactérienne et du contact rapproché entre les cellules au sein de ces biofilms, l'échange de GRA par transferts horizontaux est plus fréquent qu'entre les bactéries sous forme libre dans la colonne d'eau (Abe *et al.*, 2020). En Chine, Lu *et al.* (2019) ont étudié la distribution des GRA entre la colonne d'eau et les sédiments marins. Ils ont démontré que les GRA avaient tendance à s'accumuler dans les sédiments avec des abondances plus élevées des GRA et de l'intégron de classe 1 que dans l'eau de mer. Cette étude a également mis en évidence une influence des activités anthropiques sur l'occurrence des GRA dans les sédiments marins suggérant une propagation des résistances de la terre à la mer. Les BRA et les GRA associés aux sédiments marins peuvent être remis en suspension dans la colonne d'eau suite aux courants marins et au déplacement de la faune marine benthique. La remise en suspension de ces BRA et GRA dans les eaux marines peut s'accompagner de leur assimilation par les animaux filtreurs et les poissons par la respiration ou l'alimentation.

III.2.C. L'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens associés aux animaux marins

Il a été suggéré que la transmission des GRA des animaux à l'Homme se faisait par la chaîne alimentaire. En effet, les animaux marins peuvent être naturellement colonisés par des bactéries au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal, des branchies, de l'exosquelette et même de la coquille pour les mollusques bivalves. Cette colonisation va dépendre de plusieurs facteurs comme la position des animaux dans la colonne d'eau (Figure 5). La flore bactérienne des espèces benthiques comme les poissons plats et les mollusques reflète principalement les bactéries associées aux sédiments et celle des espèces pélagiques les bactéries libres dans la colonne d'eau.

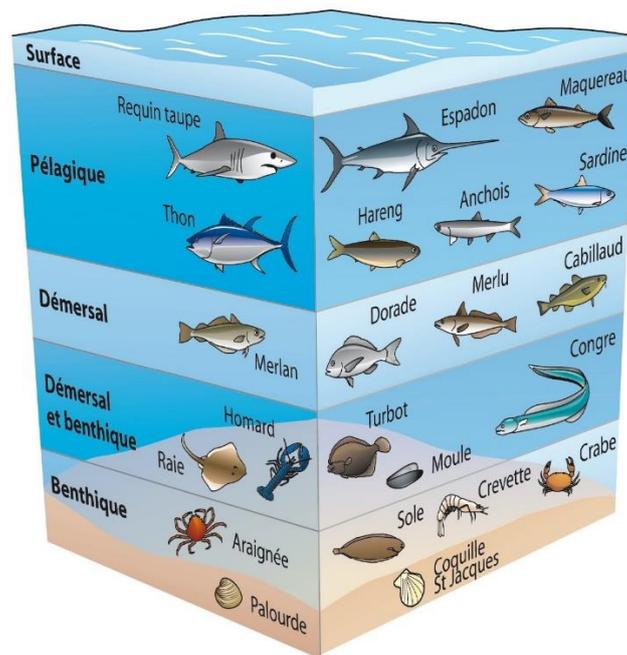


Figure 5 : Répartition des espèces marines dans la colonne d'eau (aquaportail.com).

Les GRA associés aux espèces marines sauvages sont peu décrits dans la littérature. L'étude menée par Muziasari *et al.* (2017) sur le résistome de la peau, des branchies et des intestins de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et de lavarets (*Coregonus lavaretus*) élevés dans des systèmes de cages ouvertes au Nord de la Mer Baltique a révélé la présence du gène *emrB*, codant pour une pompe à efflux et impliquée dans la multi-résistance aux antibiotiques. Une plus grande diversité de GRA a été observée dans les échantillons d'intestins des poissons où les gènes *sul1*, *tet32*, *tetM*, *tetO*, *tetW*, *aadA1* et *aadA2* ont été quantifiés. La plupart de ces GRA étaient associés aux gènes *int11* et *tnpA* (transposase), et étaient similaires aux gènes retrouvés dans les sédiments marins. L'abondance du gène *emrB* était plus élevée dans les échantillons de peau et de branchies. En effet, les branchies sont les organes respiratoires des poissons et constituent une surface d'échanges avec l'environnement marin. Par la filtration de l'eau de mer, les branchies vont être exposées aux GRA et les concentrer facilitant ainsi les échanges de matériel génétique entre les bactéries. Des souches d'*Enterobacteriaceae* productrices de BLSE et porteuses des gènes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *sul1*, *qnrS* et *qnrB* ont été isolées de branchies et d'intestins de poissons sauvages prélevés dans les eaux côtières de la Mer Méditerranée (Brahmi *et al.*, 2018). Les poissons porteurs de ces résistances étaient des

espèces pélagiques comme la sardine (*Sardina pilchardus*), le chinchard (*Trachurus trachurus*), l'anchois (*Engraulis encrasicolus*), une espèce vivant sur les fonds rocheux (la saupe, *Sarpa salpa*) et une espèce se déplaçant dans la colonne d'eau (la bogue, *Boops boops*). Près des côtes brésiliennes dans l'Océan Atlantique, l'analyse de prélèvements cloacaux de poissons a permis d'identifier deux souches d'*E. coli* présentant un large panel de GRA : *bla*_{CTX-M} (porté par un plasmide), *bla*_{TEM}, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetB*, *dfrA* (Sellera *et al.*, 2018).

En dehors des poissons, d'autres animaux marins filtreurs sont sujets à une forte contamination par les GRA. Les mollusques bivalves sont des suspensivores qui filtrent, retiennent et concentrent activement les particules dans l'eau qui les entourent y compris les bactéries libres ou liées à des particules. Pour ces raisons, des mollusques bivalves comme les moules sont de plus en plus utilisés comme indicateurs de contamination de l'environnement par les métaux lourds (Yusof *et al.*, 2004) et les coliformes fécaux (Ayat *et al.*, 1989). Par exemple, Ayat *et al.* (1989) ont démontré un nombre de coliformes fécaux jusqu'à 50 fois plus élevé dans les tissus de moules que dans l'eau de mer. Dans des individus de moules vivants sur les côtes brésiliennes, une souche d'*E. faecium* résistante à la vancomycine (ERV) a été isolée des tissus mous (Sacramento *et al.*, 2019). Cette souche disposait d'un opéron codant la résistance à la vancomycine (composé des gènes *vanA*, *vanX*, *vanR*, *vanH* et *vanS*) ainsi que des gènes de résistance aux aminoglycosides, aux macrolides, au lincosamide et au triméthoprim dont la plupart étaient localisés au niveau de structures de transposons comme le transposon Tn1546. Dans une baie à l'Ouest de l'Espagne, des souches d'*Aeromonas* sp. porteuses des gènes *bla*_{CTX-M}, *qnrS*, *sul1* et *int11* et des souches d'*E. coli* porteuses des gènes *bla*_{TEM} et *int11* ont été isolées de moules (López Cabo *et al.*, 2020). Plus de 20 souches de *Vibrio* ont été isolées de poissons, de crevettes, de crabes et de homards pêchés dans le Golfe Persique, dont 90 % possédaient le gène *strB*, 30 % le gène *tetS* et 25 % le gène *ermB* (Raissy *et al.*, 2012).

Les oursins de mer (*Paracentrotus lividus*) ont également montré une contamination par la résistance aux antibiotiques, comme des gènes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} et *ermB* portés par *S. algae* (da Costa *et*

al., 2020). Cette contamination s'est faite au niveau du tractus gastro-intestinal éclairant sur une potentielle propagation de la résistance aux antimicrobiens par la chaîne alimentaire ou réseau trophique. La transmission de contaminants comme les métaux lourds entre les différents niveaux trophiques (c'est-à-dire les différents maillons de la chaîne alimentaire) a été étudiée dans l'environnement marin, mais aucune donnée n'existe sur la transmission des GRA. Mais contrairement à de nombreux contaminants chimiques dont la concentration diminue généralement en raison de leur dégradation, leur dilution ou leur absorption, les GRA sont capables de persister et de se propager dans l'environnement.

La difficulté d'étudier les GRA dans les réseaux trophiques marins réside principalement dans l'hétérogénéité des organismes composant ces réseaux, de leur différence de colonisation par les microorganismes et de leur environnement. Il n'existe pas de méthode universelle ou standardisée applicable à l'ensemble d'un réseau trophique.

IV. Les méthodes d'analyses moléculaires de la résistance aux antimicrobiens

Les méthodes dites moléculaires constituent une avancée majeure pour la compréhension des déterminants génétiques liés à la résistance aux antimicrobiens mais aussi pour étudier leur transmission. Ces méthodes peuvent être divisées en deux catégories : 1) les méthodes basées sur la culture des bactéries, qui sont les plus utilisées pour identifier les GRA dans les bactéries cultivables issues d'un échantillon environnemental, et 2) les méthodes génomiques, fondées sur la détection et la quantification des déterminants génétiques de la résistance directement à partir des acides nucléiques extraits de l'échantillon.

Les méthodes basées sur l'analyse de l'ADN total directement extrait d'un échantillon environnemental sont plus récentes et donc moins répandues dans la littérature. Elles permettent de détecter et de quantifier les déterminants génétiques impliqués dans la résistance aux antimicrobiens (les GRA) mais également les gènes impliqués dans leur dissémination (les EGM). L'analyse de la résistance aux antimicrobiens par ces méthodes peut se faire par deux approches : une analyse ciblée

pour détecter et quantifier des gènes cibles, ou une analyse non ciblée qui permet de caractériser le résistome d'un échantillon par une approche de métagénomique basée sur le séquençage de l'ADN.

IV.1. Les approches ciblées pour l'analyse des résistances aux antimicrobiens

Les approches ciblées des déterminants génétiques de la résistance aux antimicrobiens reposent principalement sur l'amplification de l'ADN. Les principales techniques utilisées sont la PCR conventionnelle (réaction de polymérisation en chaîne) et la qPCR (PCR quantitative) qui permettent d'amplifier une séquence spécifique de l'ADN. L'un de leurs nombreux avantages par rapport aux méthodes dépendantes de la culture est la possibilité d'amplifier des gènes associés à des bactéries viables et cultivables, mortes, dans un état viable non cultivable et même sous forme d'ADN libre dans l'environnement. De plus, ces méthodes sont présentées comme étant sensibles, rapides et ne nécessitant qu'une faible quantité d'échantillons. Elles sont utilisées à grande échelle pour détecter les GRA dans des souches bactériennes isolées et dans des matrices complexes grâce aux nombreux couples d'amorces disponibles dans la littérature permettant de cibler un grand nombre de gènes. La PCR conventionnelle peut même être optimisée par une réaction multiplexe (PCR multiplex) permettant d'amplifier plusieurs séquences cibles en incluant plus d'une paire d'amorces dans une même réaction. Par exemple, une PCR multiplex a été mise au point afin de détecter 5 gènes codant pour des métallo- β -lactamases, à savoir *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GIM-1} et *bla*_{SIM-1}, à partir de souches bactériennes isolées (Ellington *et al.*, 2006).

Alors que la PCR conventionnelle et la PCR multiplex vont détecter la présence de GRA, la qPCR va fournir en plus des informations quantitatives sur l'abondance des gènes dans l'échantillon. En effet, la qPCR permet de mesurer l'abondance absolue des GRA qui correspond à la quantification directe des copies du gène cible. Pour cela, la réaction d'amplification fait intervenir soit des sondes spécifiques de type TaqMan qui deviennent fluorescentes lorsqu'elles sont liées à l'ADN cible, soit des colorants de type SybrGreen qui se lient à l'ADN. Dans l'étude de Muziasari *et al.* (2017), un ensemble de 307 couples d'amorces ciblant les gènes de résistance aux 9 principales familles d'antibiotiques

(aminoglycosides, β -lactamines, amphénicols, macrolides, sulfamides, tétracyclines, triméthoprim, vancomycine et les pompes d'efflux) et 34 couples d'amorces ciblant des gènes associés aux EGM (gènes de plasmides, de transposons, de séquences d'insertion et d'intégrons) ont été utilisées pour étudier des échantillons de peaux et de branchies de poissons. Cependant, le bon déroulement des réactions d'amplification dépend de plusieurs facteurs comme la disponibilité des séquences des gènes pour la conception des amorces et la qualité de l'ADN extrait. L'étape d'extraction de l'ADN est sans doute l'étape critique dont l'efficacité varie selon les matrices analysées. Si on considère l'ensemble d'un réseau trophique marin et de son environnement (à savoir l'eau de mer), les échantillons sont constitués de vertébrés et d'invertébrés avec des parois cellulaires très différentes qui demanderont des traitements spécifiques pour en extraire l'ADN. De plus, les matrices environnementales peuvent contenir un grand nombre de substances agissant comme inhibiteurs de la PCR et ainsi conduire à des faux négatifs (Schrader *et al.*, 2012). Ce risque d'inhibition est d'autant plus présent qu'il n'existe aucune méthode standardisée quant à l'extraction d'ADN à partir d'un échantillon donné. Les techniques d'extraction d'ADN sont principalement des kits commerciaux avec différentes méthodes de lyse cellulaire et de purification de l'ADN.

IV.2. Les approches non ciblées pour l'analyse des résistances aux antimicrobiens

Le développement des méthodes de métagénomique par séquençage haut débit de l'ADN a permis d'accroître nos connaissances sur les GRA, les EGM et la diversité bactérienne dans les écosystèmes environnementaux. Les progrès réalisés sur les techniques de séquençage de l'ADN et la baisse du coût de leur mise en place ont augmenté la disponibilité des données des séquences génétiques ainsi que leur utilisation comme un outil de surveillance de la résistance aux antimicrobiens. Le principal avantage de ces méthodes de métagénomique est qu'elles contournent l'étape de PCR afin de séquencer directement l'ADN extrait. Elles s'affranchissent donc de la nécessité de sélectionner les gènes à cibler, les résultats de séquençage offrant des informations sur l'ensemble des GRA (appelé résistome) et des EGM (appelé mobilome) des échantillons. Un des inconvénients de

cette approche est la gestion de toutes les données générées et leur traitement par des analyses bio-informatiques qui peuvent prendre un temps non négligeable pour être traitées et analysées. Mais l'un des défis majeurs de la métagénomique est la disponibilité des informations, les bases de données n'étant pas toujours conservées, mises à jour, partagées et se concentrant principalement sur les gènes de résistance cliniques. Il faut que les gènes de résistance aient déjà été identifiés et soient disponibles dans les bases de données. La comparaison des profils de résistance des échantillons environnementaux à ces bases de données peut alors donner lieu à une identification incomplète du résistome environnemental.

Il existe un grand nombre de bases de données publiques qui varient dans l'étendue des mécanismes de résistance disponibles et peuvent être généralisées ou plus spécialisées pour un type de résistance ou de genre bactérien défini (Lal Gupta *et al.*, 2020). Les bases de données généralisées les plus utilisées en recherche sont ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene Annotation) et CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) qui sont régulièrement mises à jour et couvrent un large spectre de GRA et d'informations sur leurs mécanismes et phénotypes associés. Parmi les bases de données spécialisées, CBMAR (Comprehensive β -Lactamase Molecular Annotation Resource) fournit des informations pour la caractérisation moléculaire et biochimique de chaque famille de β -lactamase. Il existe également des bases de données plus orientées vers les EGM comme ISfinder qui est dédiée aux séquences d'insertion (IS) et INTEGRALL qui regroupe les séquences d'ADN des intégrons (gènes d'intégrase et réseaux de cassettes de gènes associés).

Afin d'enrichir ces bases de données et de mieux comprendre les mécanismes de résistance dans l'environnement, la métagénomique fonctionnelle constitue un outil puissant et innovant encore peu développé. Cette approche est indépendante de la culture comme la métagénomique et permet en plus d'identifier des nouveaux GRA à partir d'échantillons environnementaux. Pour cela, cette méthode implique la construction d'une librairie métagénomique générée en clonant l'ADN total extrait d'un échantillon dans un vecteur d'expression, qui est généralement un plasmide, avant d'être

transformé dans une souche bactérienne hôte. Les clones bactériens exprimant le phénotype de résistance d'intérêt sont ensuite sélectionnés sur des milieux sélectifs qui sont létaux pour l'hôte de type sauvage. Ce criblage phénotypique et le séquençage de l'insert des clones métagénomiques fournissent des informations sur la fonction des gènes et sont utilisés pour leur annotation (dos Santos *et al.*, 2017) mais très peu d'études existent sur son application sur des échantillons complexes terrestres et marins. La métagénomique fonctionnelle a notamment donné lieu à l'identification de 11 nouveaux GRA dans des échantillons de sol dont 3 gènes conférant une résistance à l'ampicilline, 2 gènes de résistance à la gentamycine, 2 gènes de résistance au chloramphénicol et 4 gènes de résistance au triméthoprim (Torres-Cortés *et al.*, 2011). Cependant, aucune indication n'est donnée dans les études sur la mise au point de la métagénomique fonctionnelle notamment par la mise en place d'un témoin. Ce témoin est pourtant important pour juger de la fiabilité, de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode. Ce témoin peut par exemple être une souche bactérienne dont le résistome aurait été dans un premier temps caractérisé par un séquençage complet de son génome afin de déterminer si les résultats d'identification des GRA obtenus par métagénomique fonctionnelle représentent la totalité du résistome de l'échantillon analysé. Il est important que les bases de données disponibles soient régulièrement mises à jour afin de renseigner les GRA et les EGM associés nouvellement découverts. Ceci permettra une meilleure compréhension du résistome et du mobilome de l'environnement marin pour une meilleure appréhension du risque que représente la résistance aux antibiotiques en santé publique par la consommation des produits de la mer par exemple. Mais pour cela, des études doivent être menées sur la présence des GRA dans l'environnement marin pour pallier au manque d'informations que nous avons sur ce milieu.

Chapitre I : Développement d'outils moléculaires pour l'étude de la résistance aux antimicrobiens dans le milieu marin

I. Contexte

Etant donné la diversité des GRA dans les différents compartiments environnementaux, le suivi de gènes indicateurs de contamination de l'environnement par la résistance aux antimicrobiens est une approche intéressante pour évaluer la propagation de ceux-ci dans l'environnement marin (Berendonk *et al.*, 2015). Parmi ces indicateurs de résistance aux antimicrobiens, les gènes *bla*_{TEM}, *tetA*, *sul1* et *int11* ont été détectés dans les eaux côtières de la Mer Baltique et de la Mer de Chine par exemple (Tiirik *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2020, Jang *et al.*, 2021). Ces gènes sont cliniquement pertinents, présents dans des compartiments environnementaux soumis aux activités anthropiques et souvent associés à des EGM ou tout autre vecteur de transmission de la résistance (ANSES, 2020a).

La technique de qPCR est un outil de biologie moléculaire souvent utilisé pour détecter mais aussi quantifier les GRA dans l'environnement. Cependant, le bon déroulement de la qPCR dépend de plusieurs variables comme la qualité de l'ADN extrait et/ou la présence d'inhibiteurs de la PCR. Ces inhibiteurs vont diminuer la sensibilité des réactions voire entraîner des résultats faussement négatifs si la méthode d'extraction d'ADN n'est pas optimisée pour l'analyse d'échantillons complexes. Le choix de la méthode d'extraction d'ADN est un des points critiques en biologie moléculaire car il faut un ADN extrait pur (avec le moins d'inhibiteurs de PCR possible) et en quantité suffisante pour être ensuite amplifié. Cette première étape est cruciale pour l'analyse des échantillons marins complexes comme le phytoplancton, le zooplancton, les mollusques bivalves et les poissons plats qui sont représentatifs d'un réseau trophique benthique. En complément à cette étape d'extraction d'ADN, différents contrôles de PCR peuvent être utilisés comme le contrôle positif de processus pour détecter des résultats faux négatifs (norme NF EN ISO 20837:2006). A notre connaissance, il y a peu de travaux comparant les méthodes d'extraction d'ADN appliquées à des matrices marines complexes et aucun avec l'intégration d'un contrôle positif de processus. Le bon déroulement des réactions de qPCR peut également dépendre des réactifs comme le mélange réactionnel et/ou la concentration en amorces et

en sondes utilisés. Ces points doivent aussi être optimisés afin d'avoir une meilleure sensibilité des réactions de qPCR.

L'objectif de l'étude a été de mettre au point et d'optimiser les protocoles d'extraction d'ADN et de quantification par qPCR des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* applicables à des échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats.

Dans une première partie, l'efficacité de six kits d'extraction d'ADN et d'une méthode de lyse par choc thermique sans purification de l'ADN (comme décrit dans la norme NF EN ISO 20837:2006) ont été comparés sur des échantillons marins complexes afin de disposer d'une méthode unique et optimale pour l'extraction d'ADN bactérien. De plus, nous avons ajouté une souche de *L. monocytogenes* aux échantillons comme contrôle positif de processus en se conformant à la norme NF EN ISO 22174:2005. Cette souche a été ajoutée au point de départ de l'analyse des échantillons et quantifiée par qPCR en ciblant spécifiquement le gène *hlyA*. Nous avons estimé la pureté et la concentration de l'ADN total par spectrophotométrie (comme décrit dans la norme NF EN ISO 20837:2006) et nous avons évalué la performance d'amplification de l'ADN bactérien (comme décrit dans la norme NF EN ISO 22118:2011) par qPCR en ciblant les gènes de ménage bactérien *tuf* et *rpoB*. Ces deux gènes bactériens ont été choisis car le gène de l'ARNr 16S est en multi-copies et présente des similitudes avec le gène eucaryote 18S pouvant alors conduire à des résultats faussement positifs. En effet, ce gène eucaryote est présent dans les échantillons complexes mais aussi dans les réactifs utilisés lors de l'extraction et de l'amplification de l'ADN (Nakano, 2018).

Dans une seconde partie, nous avons optimisé la méthode de quantification des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par qPCR. Le colorant SYBR Green a été utilisé pour les qPCR ciblant les gènes *tetA* et *bla_{TEM}*, et la technologie de sonde TaqMan pour cibler les gènes *sul1* et *int11*. Pour ces optimisations, différents pré-mix et différentes concentrations en amorces et en sondes

ont été évalués afin de sélectionner des conditions optimales pour la quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens.

II. Partie 1 : Comparaison de méthodes d'extraction d'ADN appliquées à des échantillons marins

Cette partie était consacrée à la comparaison de performance de l'extraction de l'ADN bactérien, en utilisant différents kits et une méthode de lyse par choc thermique, sur des échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats en intégrant une souche de *L. monocytogenes* comme contrôle positif de processus.

II.1. Matériel et méthodes

II.1.A. Nature des échantillons analysés

En 2019, six échantillons de phytoplancton et de zooplancton, 10 plies communes (*Pleuronectes platessa*) et 40 pétoncles blancs (*Aequipecten opercularis*) ont été prélevés dans la Manche par l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) lors de la campagne océanographique CGFS (Channel GroundFish Survey) à bord du Thalassa (Coppin *et al.*, 2019). Les protocoles de l'Ifremer concernant les prélèvements de ces différents échantillons ont été validés par le Conseil International pour l'Exploitation de la Mer (ICES, 2012). De plus, les équipes scientifiques de la campagne ont reçu une formation sur le bien-être et l'éthique animale. Les échantillons de phytoplancton et de zooplancton ont été récupérés en suspension dans des pots de 50 ml contenant de l'eau ultra-pure et 20 % (v/v) de glycérol. Les pétoncles blancs et les plies communes ont été placés dans des sachets individuels. Ces échantillons ont été conservés dans une chambre froide à -20 °C à bord du navire avant leur transfert au laboratoire à la même température. Pour cette étude, nous avons analysé trois échantillons indépendants par nature de matrice. Les trois échantillons de phytoplancton et de zooplancton étaient constitués de 3 pots individuels de 50 ml. Les trois échantillons de plies étaient constitués de 3 individus indépendants. En raison de la taille des pétoncles blancs, les 3 échantillons de mollusques bivalves étaient composés de 3 pools de 10 individus.

II.1.B. Préparation des échantillons

Avant leur préparation, chaque échantillon a été décongelé une nuit dans une étuve à 4 °C. Les échantillons de phytoplancton et de zooplancton contenus dans les pots de 50 ml ont été transférés dans des tubes Falcon de 50 ml puis centrifugés pendant 15 min à 8 000 rpm et le surnageant a été éliminé. Les culots cellulaires ont été lavés avec 20 ml d'eau physiologique stérilisée et centrifugés de nouveau. Les culots ainsi obtenus ont été repris dans 10 ml d'eau physiologique supplémentée avec 20 % (v/v) de glycérol, homogénéisés avec un agitateur et répartis dans des cryotubes constituant les échantillons « phytoplancton » et « zooplancton ».

Les mollusques bivalves ont été manipulés sous une hotte à flux laminaire. Un coton imbibé d'éthanol à 70 % a été passé sur l'ouverture des mollusques avant de les ouvrir. La chair totale d'une masse d'environ 8 g par individu a été récupérée avec des instruments stérilisés avant d'être diluée au 1/2 (m/v) avec de l'eau physiologique stérilisée à l'aide d'un dilueur gravimétrique (DilufLOW, Intersciences, St-Nom-la-Bretèche, France). L'échantillon a été broyé pendant 1 min à l'aide d'un broyeur stomacher (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) avant d'être supplémenté avec 20 % (v/v) de glycérol et réparti dans des cryotubes constituant ainsi les échantillons « chair de mollusques bivalves ».

Les plies ont également été manipulées sous une hotte à flux laminaire. Une éponge imbibée avec 10 ml d'eau physiologique stérilisée a été passée sur la face aveugle et la face oculaire des poissons pour récupérer le mucus (Figure 6). La solution a été récupérée en pressant l'éponge dans son sachet puis diluée au 1/2 (v/v) avec de l'eau physiologique stérilisée et supplémentée avec 20 % (v/v) de glycérol. Cette solution a été répartie dans des cryotubes constituant ainsi les échantillons « peau de poisson plat ».



Figure 6 : Prélèvement du mucus d'une plie commune (échantillon « peau de poisson plat »).

Ensuite, nous avons coupé les opercules des poissons à chaque extrémité afin de prélever la totalité des branchies, de les découper en morceaux et de les placer dans un flacon (Figure 7). Les branchies ont été diluées au 1/2 (m/v) avec de l'eau physiologique stérilisée avant d'être homogénéisées pendant 1 min à l'aide d'un agitateur. Pour ces échantillons de branchies, l'utilisation de l'agitateur plutôt que du dilueur gravimétrique a été privilégiée afin d'éviter le perforage du sachet du stomacher en raison de la rigidité des arcs branchiaux. L'homogénat a ensuite été supplémenté avec 20 % (v/v) de glycérol et réparti dans des cryotubes constituant ainsi les échantillons « branchies de poisson plat ».



Figure 7: Prélèvement des branchies sur une plie commune (échantillon « branchies de poisson plat »).

Les poissons ont été retournés afin d'inciser la paroi abdominale autour de l'anus (Figure 8). L'intestin des poissons a été coupé aux extrémités en retirant toutes les adhérences et placé dans un sachet stomacher avant de le diluer au 1/2 (m/v) avec de l'eau physiologique stérilisée à l'aide du dilueur gravimétrique. L'échantillon a été broyé pendant 1 min avec le broyeur stomacher puis supplémenté avec 20 % (v/v) de glycérol et réparti dans des cryotubes constituant ainsi les échantillons « viscères de poisson plat ».



Figure 8: Prélèvement de l'intestin sur une plie commune (échantillon « viscères de poisson plat »).

II.1.C. Préparation et ajout du contrôle positif de processus dans les échantillons

Comme indiqué dans les normes NF U47-600-1:2015 et NF EN ISO 22174 :2005, le contrôle positif de processus est défini comme un échantillon enrichi avec un microorganisme cible qui doit être traité de la même manière que les échantillons à analyser. Nous avons donc choisi d'inoculer la moitié de nos échantillons avec la souche de *L. monocytogenes* B3PA-Lm1 (Collection B3PA-ANSES, Boulogne-sur-Mer, France). Cette espèce bactérienne produit la listériolysine O, un facteur majeur de la virulence de la bactérie codé par le gène *hlyA*.

La souche de *L. monocytogenes* B3PA-Lm1 a étéensemencée sur une gélose tryptone soja avec de l'extrait de levure (TSAYe, Oxoid, Dardilly, France) et incubée pendant 24 h à 37 °C. Quelques colonies isolées ont été resuspendues dans de l'eau physiologique stérilisée avant de mesurer l'absorbance à 630 nm avec un spectrophotomètre Libra S11 (Biochrom, Holliston, Etats-Unis). Nous

avons estimé la concentration de *Listeria* en suivant la corrélation DO_{630nm} de $0,15 = 2.10^8$ UFC/ml. Un volume de 500 μ l de cette suspension bactérienne a été ajouté à 500 μ l de la moitié des échantillons préparés de phytoplancton, zooplancton, chair de mollusques bivalves, peau, branchies et viscères de poisson plat afin d'obtenir une concentration finale de 1.10^8 UFC/ml dans les échantillons. Pour l'autre moitié des échantillons qui ne contenaient pas de contrôle positif de processus, nous avons ajouté 500 μ l d'eau physiologique stérilisée afin d'avoir un volume d'échantillon égal. L'ensemble des cryotubes avec et sans contrôle positif de processus ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'extraction d'ADN.

II.1.D. Méthodes d'extraction d'ADN

Nous avons suivi les instructions des fabricants des kits d'extraction d'ADN avec des modifications mineures. Ces modifications mineures concernaient principalement la quantité d'échantillon traité et l'étape d'élution de l'ADN. Les échantillons ont été décongelés à température ambiante puis nous en avons centrifugé 1 ml pendant 5 min à 8 000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 1 ml d'eau physiologique stérilisée puis centrifugé de nouveau. Après avoir éliminé le surnageant, nous avons extrait l'ADN total à partir des culots en utilisant les méthodes d'extraction détaillées ci-après :

❖ **Kit DNeasy[®] Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne)**

Le mode opératoire pour cette méthode reposait sur le protocole de purification de l'ADN total à partir de tissus d'animaux (Version de juillet 2006). Ce kit d'extraction est basé sur une lyse chimique et thermique des cellules, et une purification des acides nucléiques sur une membrane de silice. Pour ce kit, nous avons traité les échantillons différemment en fonction de leur nature.

Pour les échantillons de phytoplancton et de zooplancton uniquement, nous avons inclus une pré-étape de lyse mécanique avec des billes de verre de silice de 0,1 mm (BeadBug, Sigma, Saint-Louis, Etats-Unis). En effet, cette lyse mécanique est recommandée en raison de la rigidité des parois cellulaires du phytoplancton et du zooplancton (Yuan *et al.*, 2015, Frazao and D. Silva, 2018). Pour cela,

les culots des cellules du phytoplancton et du zooplancton ont été repris dans 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K puis transférés dans les tubes BeadBug. Les tubes ont été soumis à deux cycles d'agitation pendant 45 sec puis incubés à 56°C pendant 30 min. Les tubes ont été centrifugés pendant 5 min à 8 000 rpm et le surnageant a été récupéré pour la suite de l'extraction. Pour les échantillons de chair de mollusques bivalves, de peau, de branchies et de viscères de poisson plat, les culots ont été resuspendus dans 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K puis incubés pendant 2 h à 56 °C.

Ensuite, 200 µl de tampon AL et 200 µL d'éthanol absolu ont été ajoutés aux différents tubes avant de déposer les solutions sur les colonnes de centrifugation. Après avoir centrifugé les tubes pendant 1 min à 8 000 rpm, les colonnes ont été lavées avec 500 µl de tampon AW1 et centrifugées de nouveau. Une seconde étape de lavage et de centrifugation a été réalisée avec 500 µl de tampon AW2. Les colonnes ont été séchées en les centrifugeant pendant 1 min à 8 000 rpm puis les ADN ont été élués en ajoutant deux fois 50 µl de tampon AE.

❖ **Kit DNeasy® PowerBiofilm® (Qiagen)**

La procédure pour le kit DNeasy® PowerBiofilm® était basée sur la version de janvier 2020 du manuel d'utilisation. Ce kit a recours à une lyse cellulaire thermique, une lyse mécanique grâce à un battage de billes et une lyse chimique avec un tampon de lyse et une purification de l'ADN sur une membrane de silice. Après centrifugation et lavage des culots des échantillons, nous avons ajouté 400 µl de tampon de lyse MBL et transféré cette solution dans les tubes à billes. Cent microlitres de tampon FB ont ensuite été ajoutés dans les tubes avant de les incuber pendant 5 min à 65 °C et de les agiter pendant 15 min. Les tubes ont été centrifugés pendant 1 min à 10 000 rpm et 100 µl de tampon IRS ont été ajoutés au surnageant puis incubés à 4 °C pendant 5 min. Après avoir centrifugé les tubes pendant 1 min à 10 000 rpm, nous avons ajouté 900 µl de tampon MR et déposé cette solution sur les colonnes de centrifugation. Les tubes ont été centrifugés pendant 1 min à 10 000 rpm et les colonnes ont été lavées avec 650 µl de tampon PW puis avec 650 µl d'éthanol absolu en centrifugeant les tubes

entre chaque étape de lavage. Après avoir séché les colonnes, l'ADN a été élué en ajoutant deux fois 50 µl de tampon EB.

❖ **Kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen)**

Le mode opératoire pour le kit DNeasy® PowerSoil® était basé sur la version de mai 2017 du manuel d'utilisation. Comme le kit DNeasy® PowerBiofilm®, cette méthode utilise une lyse cellulaire thermique, une lyse mécanique par un battage de billes, une lyse chimique grâce à un tampon de lyse et une purification des acides nucléiques sur une membrane de silice. La solution de lyse contenue dans les tubes PowerBead a été transférée dans les tubes contenant les culots des échantillons afin de les remettre en suspension puis transférée de nouveau dans les tubes PowerBead. Après avoir ajouté 60 µl de solution C1, les tubes ont été agités pendant 10 min et centrifugés à 8 000 rpm pendant 30 sec. Nous avons ajouté 250 µl de solution C2 et incubé les tubes à 4 °C pendant 5 min avant de les centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 min. Après avoir ajouté 200 µl de solution C3 au surnageant, les tubes ont de nouveau été incubés pendant 5 min à 4 °C et centrifugés pendant 1 min à 8 000 rpm. Nous avons ajouté 1,2 ml de solution C4 au surnageant et chargé cette solution sur une colonne de centrifugation. Les tubes ont été centrifugés à 8 000 rpm pendant 1 min et les colonnes ont été lavées avec 500 µl de solution C5. Après avoir de nouveau centrifugé les tubes pour sécher les colonnes, l'ADN a été élué en ajoutant deux fois 50 µl de solution C6.

❖ **Kit PureLink™ Microbiome DNA Purification (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis)**

Le mode opératoire utilisé pour ce kit était basé sur le protocole de purification d'ADN microbien à partir d'échantillons environnementaux (révision A0 de septembre 2015). Dans cette procédure, les cellules sont lysées par des lyses thermiques, chimiques et mécaniques avec des billes. Les culots cellulaires ont été repris dans 800 µl de tampon de lyse S1 et 100 µl de tampon S2 puis incubés à 65 °C pendant 10 min. Cette solution a été transférée dans un tube BeadBug, agitée pendant 10 min et centrifugée à 10 000 rpm pendant 1 min. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et nous avons ajouté 250 µl de tampon S3 avant de centrifuger les tubes à 10 000 rpm pendant

2 min. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube puis nous avons ajouté 900 µl de tampon S4. La solution a été chargée sur la colonne de centrifugation puis centrifugée pendant 1 min à 10 000 rpm. La colonne a été lavée avec 500 µl de tampon S5, centrifugée une première fois pendant 1 min à 10 000 rpm et une seconde fois pendant 30 sec pour sécher la membrane. L'ADN a été élué en ajoutant deux fois 50 µl de solution S6.

❖ **Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Etats-Unis)**

Le mode opératoire pour cette méthode reposait sur le protocole d'isolement de l'ADN génomique à partir de tissus animaux (révision de mars 2019). Contrairement aux méthodes précédentes, ce kit d'extraction est basé uniquement sur des lyses chimiques et thermiques des cellules, et on n'emploie pas de membrane de silice pour l'étape de purification mais une précipitation à l'isopropanol. Les culots cellulaires ont été repris dans 600 µl de solution Nuclei Lysis puis incubés pendant 30 min à 65°C. Ensuite, 200 µl de solution Protein Precipitation ont été ajoutés avant d'incuber les tubes pendant 5 min sur de la glace. Les tubes ont été centrifugés pendant 4 min à 10 000 rpm et le surnageant a été transféré dans un tube contenant 600 µl d'isopropanol. Nous avons centrifugé les tubes pendant 1 min à 10 000 rpm avant de retirer le surnageant laissant l'ADN sous forme d'une petite pastille blanche visible dans le fond des tubes. Pour laver l'ADN, 600 µl d'éthanol à 70 % ont été ajoutés aux tubes. Après avoir centrifugé les tubes pendant 1 min à 10 000 rpm, l'éthanol a été retiré et l'ADN sous forme de culot a été séché sous le PSM (poste de sécurité microbiologique). Enfin, l'ADN a été réhydraté en ajoutant 100 µl de solution DNA Rehydration suivi d'une incubation à température ambiante pendant une nuit.

❖ **Kit GenElute™ Stool DNA Isolation (Sigma, Saint-Louis, Etats-Unis)**

Le mode opératoire pour le kit GenElute™ Stool DNA Isolation était basé sur la version de 2015 du manuel d'utilisation. Ce kit utilise des lyses physiques et chimiques des cellules avant une purification des acides nucléiques sur colonne. Les culots des échantillons ont été resuspendus dans 1 ml de tampon Lysis L puis transférés dans les tubes à billes. Après avoir ajouté 100 µl de tampon Lysis

Additive A, les tubes ont été agités pendant 3 min et centrifugés à 13 000 rpm pendant 2 min. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes et nous avons ajouté 100 µl de tampon Binding I avant d'incuber les tubes sur glace pendant 10 min et de les centrifuger pendant 2 min à 8 000 rpm. Ensuite, 700 µl de surnageant ont été transférés dans un tube contenant 700 µl d'éthanol à 70 %. Cette solution a été chargée sur la colonne de centrifugation et les tubes ont été centrifugés pendant 1 min à 6 000 rpm. Pour laver la membrane, nous avons ajouté 500 µl de tampon SK dans la colonne avant de centrifuger pendant 1 min à 6 000 rpm et de laver une nouvelle fois la colonne avec 500 µl du tampon Wash Solution A. La colonne a ensuite été séchée en centrifugeant les tubes pendant 2 min à 6 000 rpm. L'ADN a finalement été élué en ajoutant deux fois 50 µl de tampon d'élué EB.

❖ **Méthode d'extraction d'ADN par choc thermique**

La lyse par choc thermique reposait sur des cycles rapides de gel/dégel des échantillons provoquant la dégradation des parois cellulaires par la formation de cristaux dans les cellules et la libération de l'ADN. Cette méthode contenait donc une seule lyse cellulaire thermique et aucune étape de purification des acides nucléiques. Pour cela, nous avons repris les culots cellulaires dans 400 µl d'eau physiologique stérilisée. Les tubes ont été incubés à 100 °C pendant 5 min puis transférés à -80 °C pendant 5 min. Cette étape de congélation/décongélation a été réalisée 3 fois en agitant les tubes entre chaque incubation. Ensuite, les tubes ont été centrifugés pendant 3 min à 10 000 rpm et environ 200 µl de surnageant ont été transférés dans un nouveau tube constituant ainsi notre échantillon d'ADN.

L'ensemble des échantillons d'ADN extraits ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse.

II.1.E. Evaluation de l'efficacité des protocoles d'extraction d'ADN

Afin de déterminer l'efficacité des méthodes d'extraction d'ADN à partir des différents échantillons, nous avons évalué plusieurs critères en nous basant sur les normes NF EN ISO 20837:2006, NF EN ISO 22174:2005 et NF EN ISO 22118:2011.

II.1.E.a. Estimation de la concentration et de la pureté des extraits d'ADN totaux

La concentration ainsi que la pureté des échantillons d'ADN ont été obtenues à l'aide d'un spectrophotomètre DS-11 (Denovix, Wilmington, Etats-Unis). La concentration d'ADN a été calculée par le spectrophotomètre en utilisant l'équation de Beer-Lambert grâce à la mesure de l'absorbance à 260 nm. La pureté des échantillons d'ADN a été estimée en utilisant les deux ratios d'absorbance A260nm/A280nm et A260nm/A230nm.

II.1.E.b. Quantification de l'ADN bactérien par PCR quantitative (qPCR)

Afin de quantifier l'ADN bactérien dans l'ADN total extrait, nous avons ciblé les gènes de ménage bactérien *tuf* et *rpoB* codant respectivement pour le facteur d'élongation EF-Tu et la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne (Tableau 2). Pour cela, les gènes *tuf* et *rpoB* ont été quantifiés par qPCR en utilisant le colorant SYBR Green. Le mélange réactionnel pour chaque qPCR était de 23 μ l et contenait les réactifs suivants : 12,5 μ l de TB Green® Premix Ex Taq™ II (Takara Bio, Kusatsu, Japon), 0,1 μ M de chaque amorce (Eurobio, Les Ulis, France) et de l'eau nuclease-free (Qiagen) pour compléter le volume final. Le mélange réactionnel a été réparti sur une microplaque 96 puits en pipetant 23 μ l par puit dans lesquels ont été ajoutés 2 μ l d'échantillon d'ADN. Les conditions utilisées pour les réactions de qPCR sont indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 2: Amorces et sonde utilisées dans les réactions de qPCR.

Gènes ciblés	Amorces / Sonde	Séquences nucléotidiques (5' – 3')	Taille de l'amplicon (pb)	Références
<i>tuf</i>	tuf-F	ACHGGHRTHGARATGTTCCG	299	(Tanaka <i>et al.</i> , 2010)
	tuf-R	GTTDTCRCCHGGCATNACCAT		
<i>rpoB</i>	rpoB-F	CGAACATCGGTCTGATCAACTC	360	(Takahashi <i>et al.</i> , 2006)
	rpoB-R	GTTGCATGTTTCGCACCCAT		
<i>hlyA</i>	Nov-F	TGCAAGTCCTAAGACGCCA	113	(Nogva <i>et al.</i> , 2000)
	Nov-R	CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA		
	Nov-S	FAM-CGAAAAGAAACACGCGGATGAAATCG-TAMRA		

Tableau 3: Conditions utilisées pour les réactions de qPCR.

Gènes ciblés	Technologies	Conditions de qPCR
<i>tuf</i>	Colorant SYBR Green	Dénaturation 95 °C – 30 sec Amplification (35 cycles) 95 °C – 10 sec ; 60 °C – 1 min Fusion 95 °C – 5 sec ; 60 °C – 1 min
<i>rpoB</i>	Colorant SYBR Green	Dénaturation 95 °C – 30 sec Amplification (35 cycles) 95 °C – 5 sec ; 55 °C – 20 sec Fusion 95 °C – 5 sec ; 60 °C – 1 min
<i>hlyA</i>	Sonde TaqMan	Dénaturation 95 °C – 10 min Amplification (40 cycles) 95 °C – 20 sec ; 60 °C – 1 min

Pour quantifier le gène *hlyA* du contrôle positif de processus dans les échantillons artificiellement contaminés, nous avons utilisé la technologie TaqMan pour la qPCR (Tableau 2). Le mélange réactionnel de 45 µl contenait 25 µl de Platinum™ Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,1 µM de chaque amorce (Eurobio), 0,05 µM de la sonde TaqMan (Eurobio) et de l'eau nuclease-free pour compléter le volume final. Dans chaque puit de la microplaque, nous avons ajouté 45 µl de mélange réactionnel et 5 µl d'échantillon d'ADN. Les conditions pour cette qPCR sont indiquées dans le Tableau 3.

En se conformant à la norme NF EN ISO 22174:2005, de l'eau nuclease-free et le mélange réactionnel seul ont été utilisés comme témoins négatifs pour l'ensemble des qPCR. Concernant le témoin positif, nous avons utilisé l'ADN de la souche *L. monocytogenes* B3PA-Lm1 à différentes concentrations (100 ; 50 ; 25 et 12,5 ng/µl). Pour la qPCR ciblant le gène *hlyA*, une courbe standard a été réalisée avec l'ADN de la même souche bactérienne. Pour cela, l'ADN a été extrait à partir de quelques colonies de *Listeria* isolées sur une gélose TSAYe avec le kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. L'ADN a été dilué dans de l'eau nuclease-free pour obtenir une concentration initiale de 100 ng/µl. Des dilutions successives au dixième ont été réalisées pour la courbe standard de la qPCR ciblant le gène *hlyA* allant de 100 ng/µl à 0,0001 ng/µl. Le nombre d'unités génomes (UG) par millilitre d'ADN a été calculé grâce à l'équation représentée en Figure 9 en utilisant la taille du génome de *L. monocytogenes* qui est de $2,94.10^6$ pb.

Calcul du poids d'une unité génome de *L. monocytogenes*

$$= \frac{\text{Taille du génome de } L. monocytogenes \times \text{Poids moléculaire d'une pb}}{\text{Nombre d'Avogadro}}$$

$$= \frac{2,94.10^6 \text{ pb} \times 660 \text{ g/mol}}{6,022.10^{23}}$$

$$= 3,22.10^{-15} \text{ g} = 3,22.10^{-9} \mu\text{g}$$

Calcul du nombre d'unités génomes dans 100 µg/mL d'ADN de *L. monocytogenes*

$$= \frac{\text{Concentration d'ADN}}{\text{Poids d'une unité génome de } L. monocytogenes}$$

$$= \frac{100 \mu\text{g/ml}}{3,22.10^{-9} \mu\text{g}} = 3,11.10^{10} \text{ UG/ml}$$

Figure 9 : Calcul du nombre d'unités génomes de *L. monocytogenes* pour une concentration d'ADN définie.

Les réactions de qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur LightCycler® 480 (Roche, Rotkreuz, Suisse). Les valeurs de cycle de quantification (Cq) ont été calculées automatiquement par le logiciel LightCycler® 480 en utilisant la méthode de la dérivée seconde.

II.1.F. Analyse des données

Les résultats de qPCR ont été validés lorsque les témoins négatifs n'étaient pas amplifiés et que les témoins positifs étaient quantifiés. De plus, les résultats de qPCR ciblant le gène *hlyA* ont été validés si l'efficacité (E) était comprise entre 75 et 125 %, et si le coefficient de détermination R² était supérieur à 0,99 comme décrit dans les normes NF U47-600-1:2015 et U47-600-2:2015. L'efficacité de la qPCR a été calculée selon la formule suivante :

$$E \text{ (en \%)} = \left[10^{\frac{-1}{\text{pente}}} \right] - 1$$

Nous avons également utilisé l'équation de la courbe standard afin de calculer le nombre de copies du gène *hlyA* dans les échantillons avec le contrôle positif de processus (en unités génome/ml) selon la formule suivante :

$$x = 10^{\frac{y-b}{a}}$$

avec y la valeur de C_q obtenue, a la pente de la droite et b l'ordonnée à l'origine.

Comme mentionné dans la norme NF EN ISO 22118:2011, nous avons calculé le taux de faux négatifs pour chaque méthode d'extraction d'ADN et pour chaque nature d'échantillon en utilisant la formule suivante :

$$p_{f-} = \frac{n_{f-}}{n_{r+} + n_{f-}} \times 100 \%$$

n_{f-} étant le nombre d'échantillons connus comme positifs mais mal classifiés

n_{r+} étant le nombre de résultats positifs réels

L'ensemble des graphiques présentés dans ce chapitre ont été réalisés en utilisant le package « ggplot2 » du logiciel RStudio version 1.4.1717 (RStudio, Inc, Boston, Etats-Unis). Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour évaluer l'efficacité des kits d'extraction d'ADN ainsi que la pureté et la concentration de l'ADN à l'aide du logiciel Statgraphics centurion V18 (Sigmaplus, Neuilly-sur-Seine, France).

II.2. Résultats

Afin de sélectionner une méthode d'extraction d'ADN optimale pour les différentes natures d'échantillons marins, nous avons déterminé des seuils pour valider les critères décrits dans le Tableau 4. Les valeurs des ratios A260nm/280nm et A260nm/230nm choisies pour déterminer la pureté des ADN étaient conformes à la norme NF EN ISO 20837:2006. Pour les autres critères analysés, il n'existe aucune norme ni standard pour déterminer un rendement en ADN optimal ou une bonne efficacité d'amplification. Nous avons donc fixé arbitrairement des concentrations minimum d'ADN extraits par

nature d'échantillon qui étaient jugées suffisantes pour quantifier les gènes *tuf*, *rpoB* et *hlyA* par qPCR. Pour la quantification des gènes *tuf* et *rpoB* dans les échantillons avec le contrôle positif de processus, nous avons également fixé arbitrairement une valeur de Cq inférieure à 25 pour valider une bonne efficacité d'amplification. Cette valeur de Cq correspondait à 10^7 UG/ml pour le gène *tuf* et 10^{12} UG/ml pour le gène *rpoB*. Sans le contrôle positif de processus, l'efficacité d'amplification était validée lorsque la valeur de Cq était inférieure à 30 ce qui correspondait à 10^5 UG/ml pour le gène *tuf* et à 10^{10} UG/ml pour le gène *rpoB*. Nous avons déterminé que la récupération du contrôle positif de processus était élevée lorsque la concentration du gène *hlyA* était supérieure à 8,0 log unités génome/ml dans les échantillons artificiellement contaminés, correspondant environ à la quantité de *Listeria* ajoutée aux échantillons. Enfin, nous avons déterminé qu'un taux de faux négatifs inférieur à 10 % révélait une élimination efficace des inhibiteurs de PCR avec la méthode d'extraction d'ADN utilisée.

Tableau 4 : Critères de validation des méthodes d'extraction d'ADN pour chaque nature d'échantillon marin. PH : phytoplancton ; ZO : zooplancton ; CH : chair de mollusques bivalves ; PE : peau de poisson plat ; BR : branchies de poisson plat ; VI : viscères de poisson plat. CPP : contrôle positif de processus.

Critères	PH	ZO	CH	PE	BR	VI	Observations
Concentration d'ADN (ng/ μ l)	> 5,0	> 5,0	> 20,0	> 10,0	> 20,0	> 10,0	Quantité d'ADN suffisante pour les qPCR
Ratio A260nm/280nm	1,8 < ratio < 2,0						ADN considéré comme pur
Ratio A260nm/230nm	2,0 < ratio < 2,2						
Quantification du gène <i>tuf</i> (Cq)	Cq < 25 (avec CPP) Cq < 30 (sans CPP)						Concentrations du gène <i>tuf</i> de 10^7 UG/ml (avec CPP) 10^5 UG/ml (sans CPP)
Quantification du gène <i>rpoB</i> (Cq)	Cq < 25 (avec CPP) Cq < 30 (sans CPP)						Concentrations du gène <i>rpoB</i> de 10^{12} UG/ml (avec CPP) 10^{10} UG/ml (sans CPP)
Quantification du gène <i>hlyA</i> [log(unités génome/ml)]	log(unités génome/ml) > 8,0						Récupération élevée du CPP après extraction
Taux de faux négatifs (%)	taux < 10,0 %						Concentration/effet faibles des inhibiteurs de PCR

II.2.A. Concentration et pureté des ADN extraits

Dans un premier temps, les rendements en ADN extraits à partir des échantillons marins avec les différentes méthodes d'extraction d'ADN ont été évalués par spectrophotométrie (Figure 10). Pour toutes les méthodes d'extraction d'ADN, l'ajout du contrôle positif de processus dans les échantillons

n'a pas influé sur la concentration d'ADN extrait. Seul un rendement en ADN plus élevé a été observé pour les échantillons de peau, de branchies et de viscères de poisson plat avec le contrôle positif de processus lorsque l'ADN était extrait avec le kit Blood & Tissue (entre 30,0 et 43,9 ng/ μ l) que sans le contrôle (entre 1,4 et 17,9 ng/ μ l). Pour l'ensemble des échantillons, les concentrations d'ADN étaient globalement plus élevées en employant la méthode d'extraction par choc thermique par rapport à celles obtenues avec les différents kits d'extraction. Pour une meilleure visibilité des résultats, les concentrations d'ADN extraits avec les kits d'extraction d'ADN en excluant la méthode de choc thermique sont représentées en Annexe I.

Pour les échantillons de phytoplancton, nous avons obtenu des ADN avec des concentrations en moyenne inférieures à 5,0 ng/ μ l en utilisant les kits Blood & Tissue, PowerSoil[®] et PureLink[™] Microbiome (Figure 10A). Cependant, des rendements en ADN extraits supérieurs à 5,0 ng/ μ l ont été observés en utilisant les kits PowerBiofilm[®], Wizard Genomic et GenElute[™] Stool. Concernant les échantillons de zooplancton, les concentrations en ADN étaient supérieures à 5,0 ng/ μ l en employant les kits PowerBiofilm[®], GenElute[™] Stool et la méthode de choc thermique (Figure 10B). En revanche, les concentrations en ADN n'ont pas été validées pour les kits Blood & Tissue, PowerSoil[®], PureLink[™] Microbiome et Wizard Genomic car elles étaient en moyenne inférieures à 5,0 ng/ μ l. Les rendements en ADN étaient les plus élevés en employant la méthode de choc thermique (en moyenne 465,8 ng/ μ l), les kits Wizard Genomic (en moyenne 115,5 ng/ μ l) et Blood & Tissue (en moyenne 24,5 ng/ μ l) pour les échantillons de chair de mollusques bivalves (Figure 10C). Cependant, nous avons noté des concentrations d'ADN inférieures à 20,0 ng/ μ l en utilisant les kits PowerBiofilm[®], PowerSoil[®], PureLink[™] Microbiome et GenElute[™] Stool. Pour les échantillons de peau de poissons plats, la concentration en ADN a été validée pour toutes les méthodes d'extraction d'ADN à l'exception du kit PowerSoil[®] avec lequel nous avons observé des concentrations d'ADN en moyenne inférieures à 10,0 ng/ μ l (Figure 10D). Les rendements en ADN étaient plus élevés en employant le kit Wizard Genomic et la méthode d'extraction par choc thermique pour extraire l'ADN des branchies de poissons plats, les concentrations en ADN étant en moyenne de 183,2 et 100,3 ng/ μ l, respectivement (Figure

10E). Les concentrations en ADN extraits avec les autres kits étaient également supérieures à 20,0 ng/μl (en moyenne entre 23,7 et 75,8 ng/μl). Concernant les échantillons de viscères de poissons plats, nous avons noté des concentrations d'ADN en moyenne inférieures à 10,0 ng/μl avec le kit PureLink™ Microbiome (Figure 10F). Les concentrations d'ADN ont cependant été validées pour les autres méthodes d'extraction d'ADN avec lesquelles nous avons obtenu en moyenne entre 11,2 ng/μl (kit PowerSoil®) et 336,4 ng/μl (méthode de choc thermique) d'ADN.

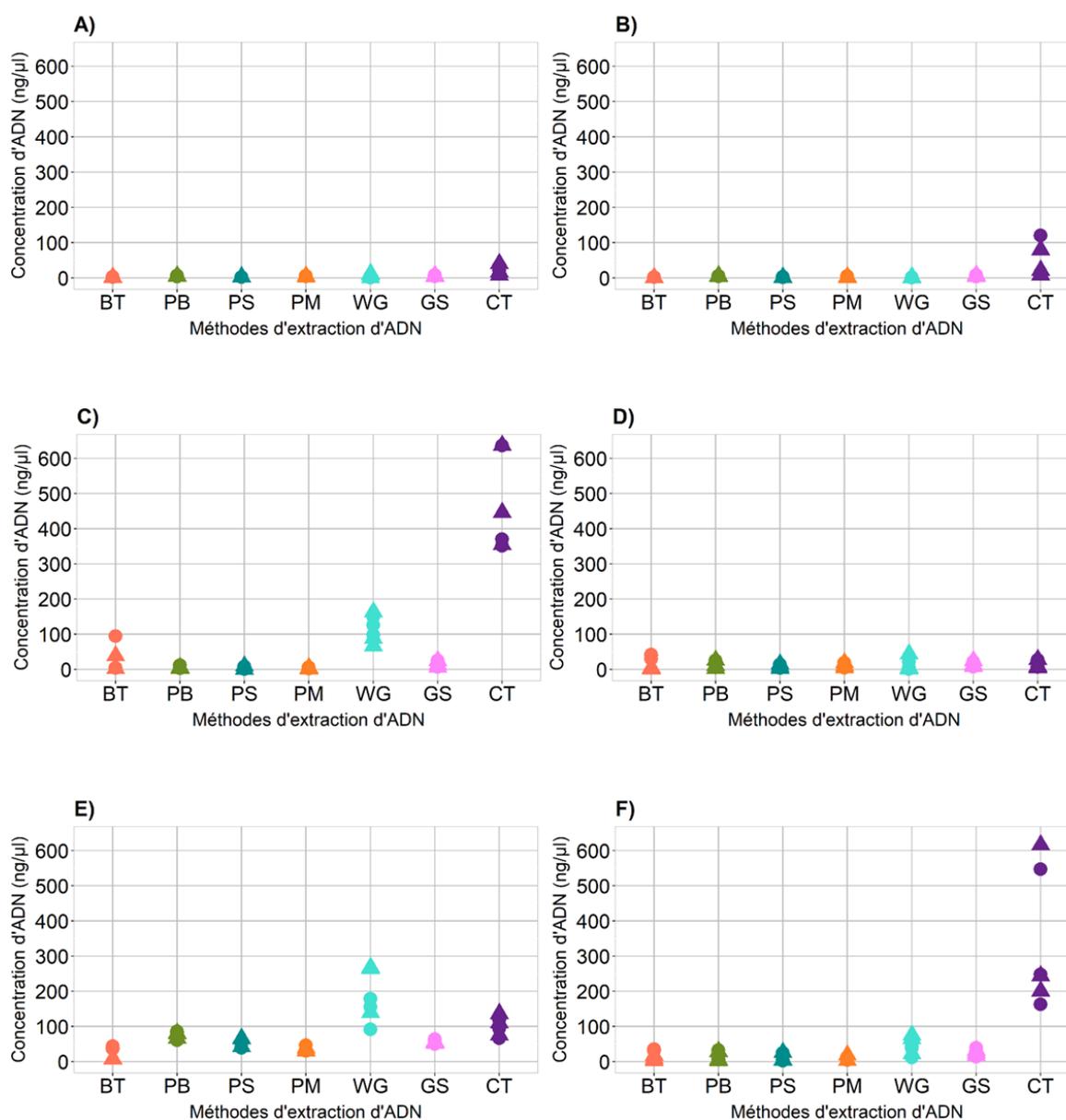


Figure 10 : Concentrations d'ADN extrait (ng/μl) à partir des échantillons marins en utilisant les différentes méthodes d'extraction d'ADN. (●) : avec contrôle positif de processus. (▲) : sans contrôle positif de processus. A) Phytoplancton. B) Zooplankton. C) Chair de mollusques bivalves. D) Peau de poisson plat. E) Branchies de poisson plat. F) Viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool ; CT : extraction d'ADN par choc thermique. N = 6 échantillons par matrice.

La pureté des échantillons d'ADN extraits avec les différentes méthodes d'extraction a également été estimée par spectrophotométrie (Figure 11). Nous avons pour cela considéré dans un premier temps le ratio d'absorbance A260nm/A280nm qui indique une contamination des échantillons d'ADN par de l'ARN, des protéines ou des traces de phénol. Les extraits d'ADN étaient considérés comme purs si le ratio était compris entre 1,8 et 2,0. Pour tous les échantillons analysés, des ratios inférieurs à 1,8 ont été observés pour les ADN extraits avec la méthode de choc thermique.

Un échantillon d'ADN pur a été obtenu parmi les 6 échantillons de phytoplancton analysés en employant les kits Blood & Tissue, PowerSoil[®], Wizard Genomic et la méthode de choc thermique (Figure 11A). En utilisant les kits PowerBiofilm[®] et PureLink[™] Microbiome, nous avons observé de l'ADN pur pour 2/6 échantillons analysés. Seuls les kits PowerSoil[®] et PureLink[™] Microbiome ont permis d'extraire de l'ADN pur à partir d'un échantillon de zooplancton parmi les 6 analysés (Figure 11B). A partir des échantillons de chair de mollusques bivalves, de l'ADN pur a été obtenu pour 1/6 échantillons avec le kit GenElute[™] Stool et pour 2/6 échantillons avec les deux kits PowerBiofilm[®] et Wizard Genomic (Figure 11C). De l'ADN pur a été extrait à partir de 1/6 échantillons de peau de poissons plats en employant les kits PowerBiofilm[®], PowerSoil[®] et Wizard Genomic, et à partir de 2/6 échantillons avec le kit PureLink[™] Microbiome (Figure 11D). Mais en utilisant le kit GenElute[™] Stool, nous avons pu extraire de l'ADN pur à partir de 4/6 échantillons de peau. De l'ADN pur n'a été observé que pour un seul échantillon de branchies de poissons plats en utilisant le kit Blood & Tissue (Figure 11E). En employant les kits PowerSoil[®] et PureLink[™] Microbiome pour extraire l'ADN des échantillons de branchies, nous avons obtenu de l'ADN pur pour 5/6 échantillons. Par ailleurs, tous les ADN extraits avec les kits PowerBiofilm[®], Wizard Genomic et GenElute[™] Stool à partir des échantillons de branchies étaient purs. En ce qui concerne les échantillons de viscères de poissons plats, nous avons observé de l'ADN pur à partir de 1/6 échantillons en employant les kits PowerBiofilm[®], PureLink[™] Microbiome et Wizard Genomic et de 2/6 échantillons avec le kit GenElute[™] Stool (Figure 11F).

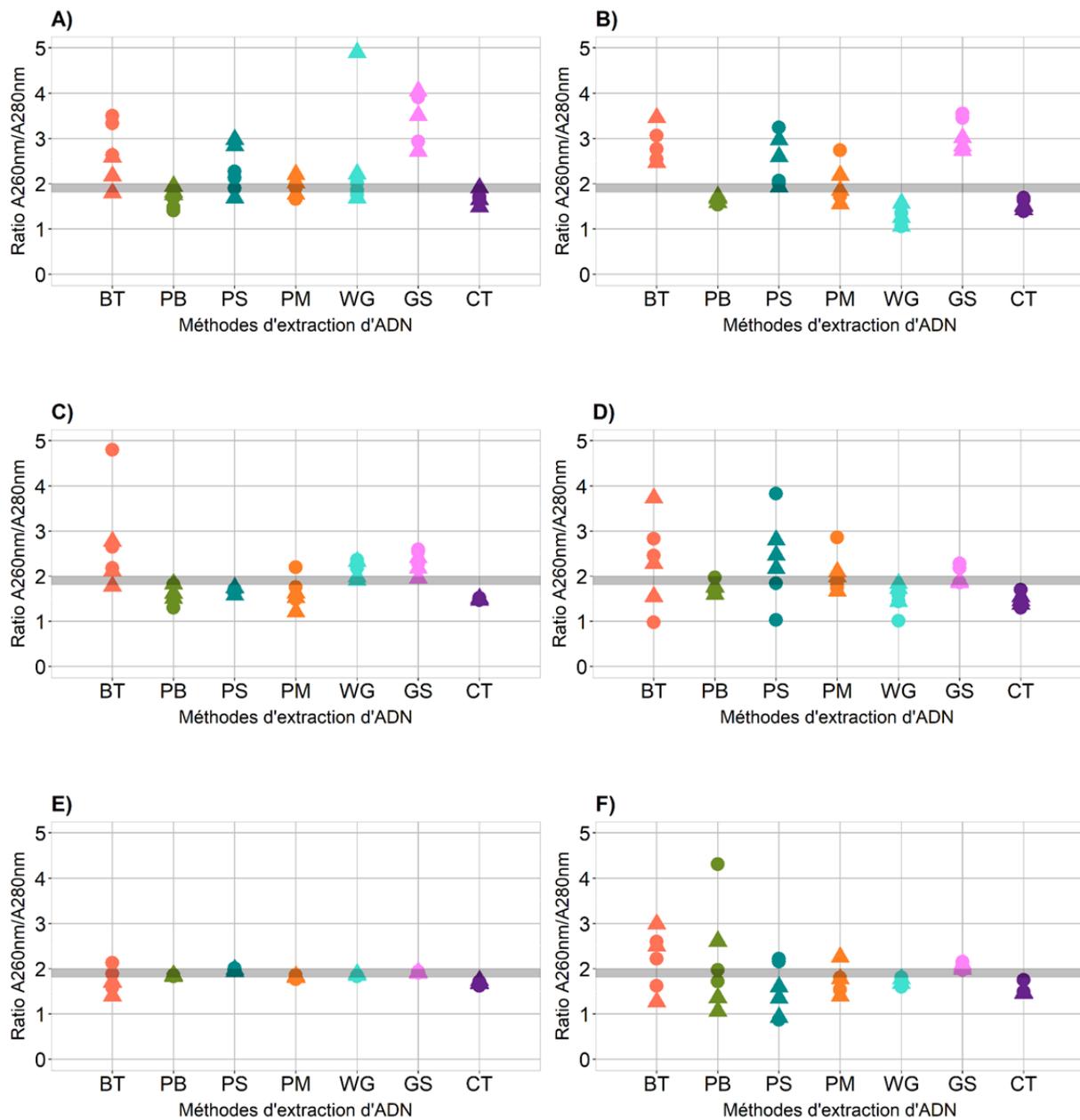


Figure 11 : Ratios A260nm/A280nm de l'ADN extrait des échantillons marins en utilisant les différentes méthodes d'extraction d'ADN. (●) : avec contrôle positif de processus. (▲) : sans contrôle positif de processus. A) Phytoplancton. B) Zooplancton. C) Chair de mollusques bivalves. D) Peau de poisson plat. E) Branchies de poisson plat. F) Viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool ; CT : extraction d'ADN par choc thermique. N = 6 échantillons par matrice. Bande grise : échantillons d'ADN purs (ratios entre 1,8 et 2,0).

Pour évaluer la pureté des extraits d'ADN, nous avons dans un second temps considéré le ratio A260nm/A230nm (Figure 12). Ce ratio révèle la présence de contaminants liés à l'échantillon ou provenant de l'extraction de l'ADN en elle-même, comme des traces de phénol, d'EDTA et de polysaccharides. En nous basant sur ce ratio, aucun ADN pur n'a été obtenu à partir des échantillons de phytoplancton, de zooplancton et de chair de mollusques bivalves quelle que soit la méthode d'extraction employée. En ce qui concerne les échantillons de peau de poissons plats, nous n'avons observé qu'un extrait d'ADN pur avec le kit Wizard Genomic (Figure 12D). De même, aucun échantillon d'ADN pur n'a été obtenu à partir des échantillons de branchies de poissons plats en employant les kits Blood & Tissue, PowerBiofilm®, PureLink™ Microbiome, GenElute™ Stool et la méthode d'extraction par choc thermique (Figure 12E). De l'ADN pur a été observé pour 3/6 échantillons de branchies avec le kit PowerSoil®. Mais en utilisant le kit Wizard Genomic, nous avons pu constater de l'ADN pur pour 4/6 échantillons de branchies. Concernant les échantillons de viscères de poissons plats, nous avons pu extraire de l'ADN pur à partir d'un seul échantillon en employant les kits PureLink™ Microbiome et Wizard Genomic (Figure 12F).

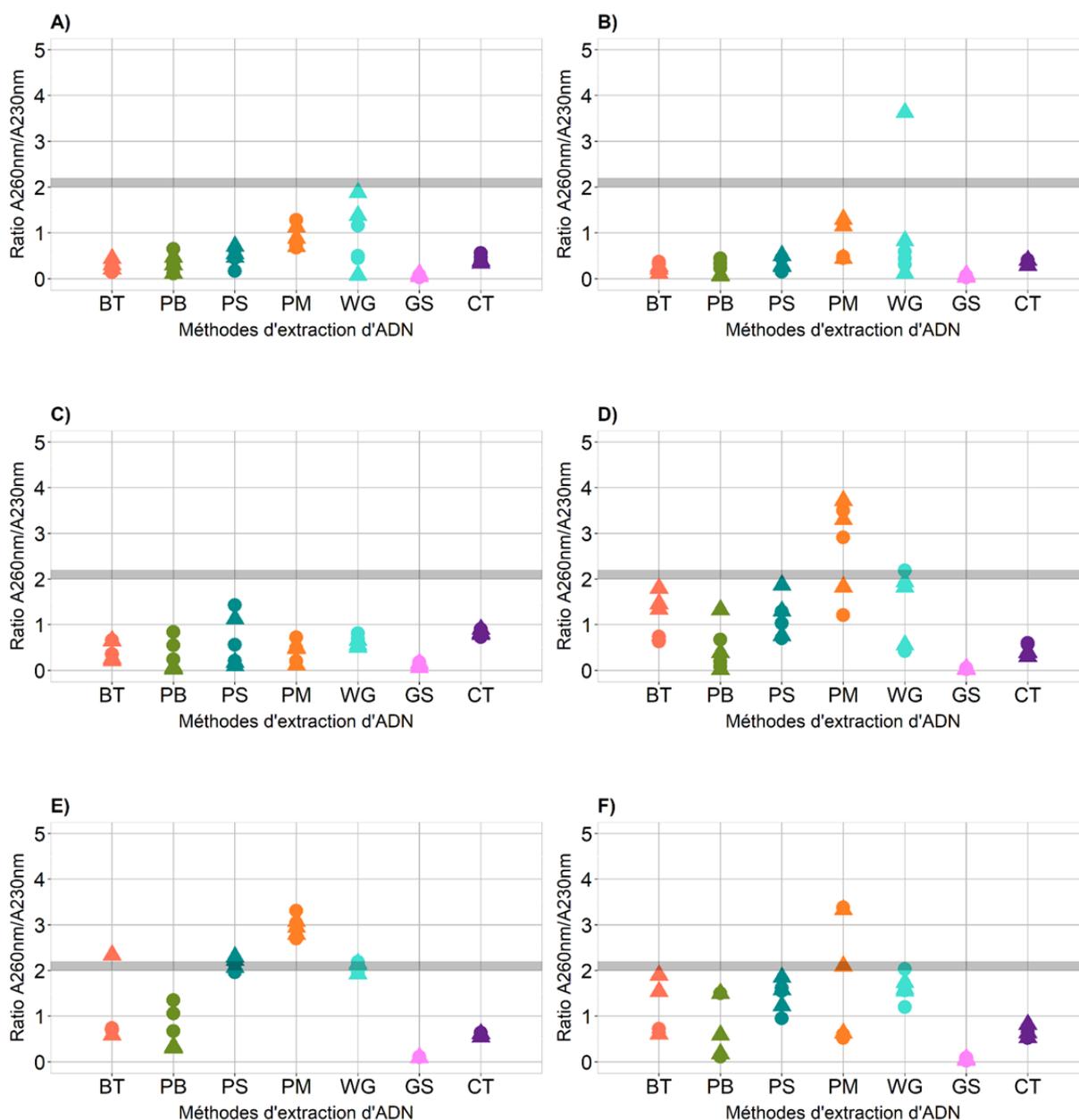


Figure 12 : Ratios A260nm/A230nm de l'ADN extrait des échantillons marins en utilisant les différentes méthodes d'extraction d'ADN. (●) : avec contrôle positif de processus. (▲) : sans contrôle positif de processus. A) Phytoplancton. B) Zooplancton. C) Chair de mollusques bivalves. D) Peau de poisson plat. E) Branchies de poisson plat. F) Viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool ; CT : extraction d'ADN par choc thermique. N = 6 échantillons par matrice. Bande grise : échantillons d'ADN purs (ratios entre 2,0 et 2,2).

II.2.B. Quantification de l'ADN bactérien

Le troisième point pour évaluer l'efficacité des méthodes d'extraction d'ADN concernait l'amplification et la quantification de l'ADN bactérien. En effet, l'ADN total extrait des échantillons marins avec les différentes techniques d'extraction utilisées dans cette étude était constitué non

seulement d'ADN procaryote mais également d'ADN eucaryote. Afin de s'intéresser uniquement à la fraction d'ADN bactérien au sein de ces ADN totaux et d'examiner si cet ADN était amplifiable, nous avons ciblé deux gènes de ménage bactérien par qPCR. Dans un premier temps, le gène *tuf* codant pour le facteur d'élongation procaryote EF-Tu a été quantifié dans les échantillons marins avec et sans le contrôle positif de processus (Figure 13).

Pour tous les échantillons avec le contrôle positif de processus, nous avons observé une meilleure efficacité d'amplification du gène *tuf* ($Cq < 25$) avec les kits PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome par rapport aux autres méthodes d'extraction. Une bonne efficacité d'amplification du gène *tuf* a également été constatée dans les ADN extraits des échantillons de phytoplancton et de zooplancton avec le kit Blood & Tissue ($Cq < 25$) contrairement aux autres natures d'échantillons pour lesquelles les valeurs de Cq étaient comprises entre 26 et 35. Pour les échantillons de phytoplancton sans le contrôle positif de processus, les ADN bactériens extraits avec les sept méthodes d'extraction ont bien été amplifiés avec des valeurs de Cq inférieures à 30 pour le gène *tuf*. Une meilleure efficacité d'amplification pour tous les ADN extraits à partir des échantillons de zooplancton sans le contrôle positif de processus a été observée en utilisant le kit GenElute™ Stool. Nous avons également constaté une bonne amplification du gène *tuf* dans les ADN extraits de 2/3 échantillons de zooplancton avec les kits Blood & Tissue, PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome. Concernant les échantillons de chair de mollusques bivalves, une bonne efficacité d'amplification du gène *tuf* a été obtenue pour les ADN extraits avec les kits PureLink™ Microbiome, PowerBiofilm®, PowerSoil® et GenElute™ Stool. Nous avons constaté des valeurs de Cq inférieures à 30 uniquement pour 1/3 échantillons d'ADN extrait de la peau des poissons plats avec les kits PowerBiofilm® et Wizard Genomic. Une meilleure efficacité d'amplification du gène *tuf* a été observée dans les ADN extraits des branchies de poissons plats avec le kit PowerBiofilm® par rapport aux autres méthodes d'extraction. Concernant les échantillons de viscères de poissons plats, une bonne efficacité d'amplification a été constatée pour 1/3 échantillons d'ADN extrait avec le kit PowerBiofilm®.

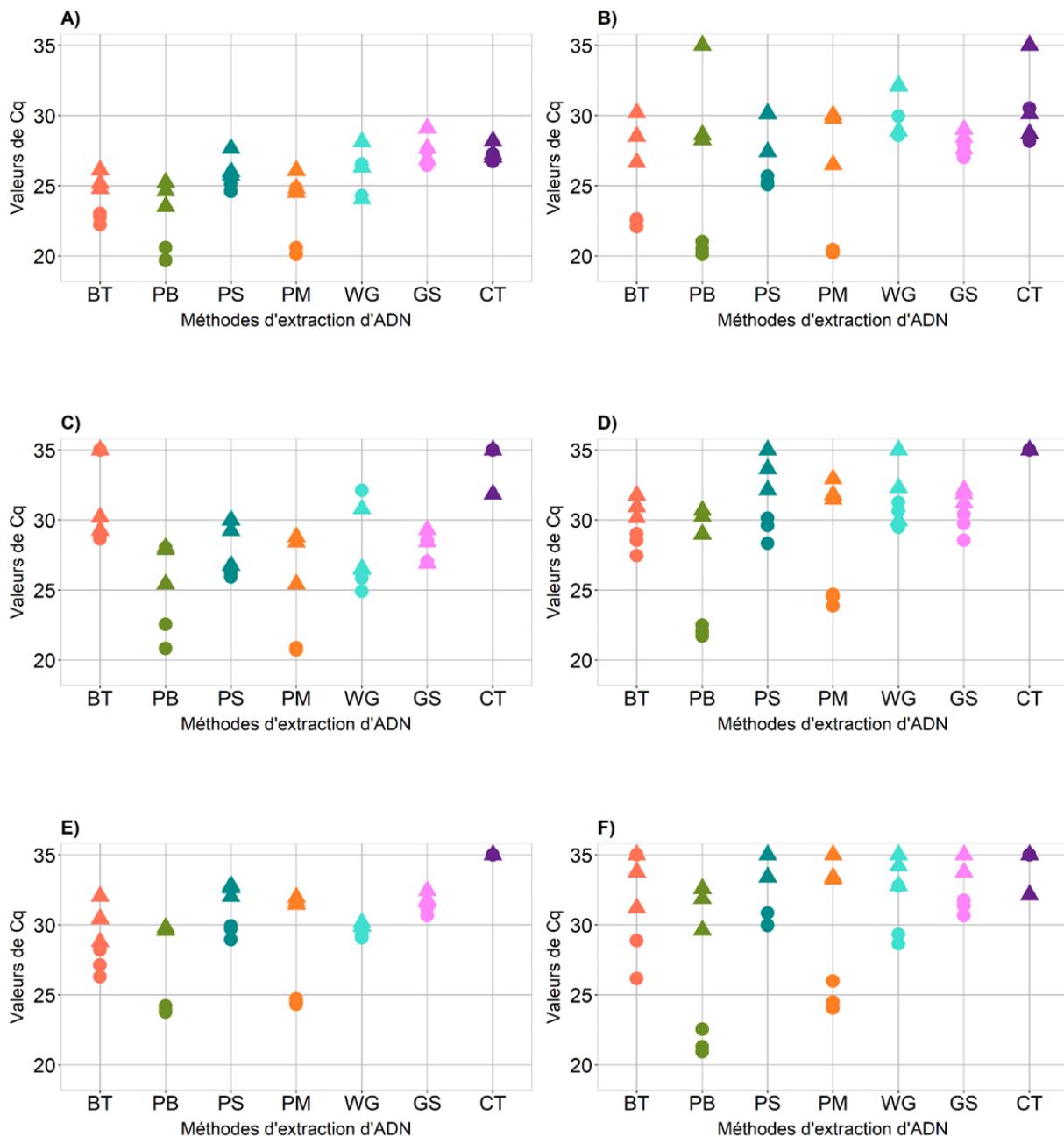


Figure 13 : Valeurs de Cq obtenues pour la quantification du gène bactérien *tuf* à partir des ADN extraits des échantillons marins avec les différentes méthodes d'extraction. (●) : avec contrôle positif de processus. (▲) : sans contrôle positif de processus. A) Phytoplancton. B) Zooplancton. C) Chair de mollusques bivalves. D) Peau de poisson plat. E) Branchies de poisson plat. F) Viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool ; CT : extraction d'ADN par choc thermique. N = 6 échantillons par matrice.

Nous avons par la suite quantifié un second gène de ménage bactérien, à savoir le gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne (Figure 14).

Pour les échantillons avec le contrôle positif de processus, nous avons observé une bonne efficacité d'amplification du gène *rpoB* ($Cq < 25$) uniquement pour 1/3 échantillons d'ADN de chair de mollusques bivalves extrait avec les kits PowerBiofilm[®], PureLink[™] Microbiome et GenElute[™] Stool. Pour les autres matrices avec le contrôle positif de processus, les valeurs de Cq étaient toutes supérieures à 25 quelle que soit la méthode d'extraction d'ADN utilisée.

Concernant les échantillons sans le contrôle positif de processus, une bonne efficacité d'amplification du gène *rpoB* ($Cq < 30$) a été observée pour 2/3 échantillons d'ADN de zooplancton et de branchies de poissons plats extraits avec le kit GenElute[™] Stool. Pour tous les échantillons d'ADN de phytoplancton sans le contrôle positif de processus, nous avons constaté une bonne efficacité d'amplification avec les kits PowerBiofilm[®], PureLink[™] Microbiome et GenElute[™] Stool. Des valeurs de Cq inférieures à 30 ont également été observées pour tous les ADN de chair de mollusques bivalves extraits avec les kits PowerBiofilm[®], PowerSoil[®], PureLink[™] Microbiome, Wizard Genomic et GenElute[™] Stool. En revanche, aucune valeur de Cq inférieure à 30 n'a été observée pour les échantillons d'ADN de peau et de viscères de poissons plats quelle que soit la méthode d'extraction d'ADN utilisée.

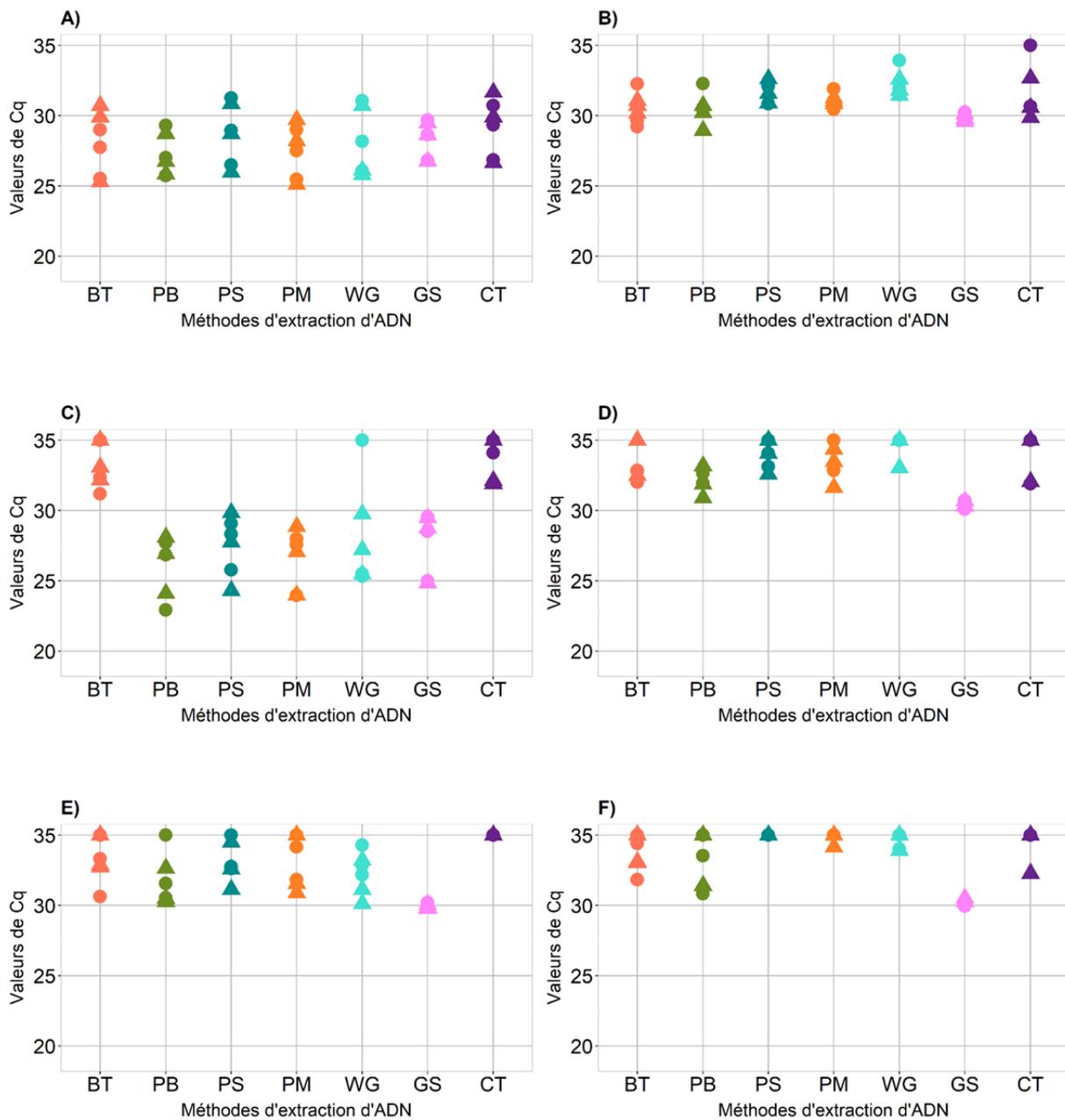


Figure 14 : Valeurs de Cq obtenues pour la quantification du gène bactérien *rpoB* à partir des ADN extraits des échantillons marins avec les différentes méthodes d'extraction. (●) : avec contrôle positif de processus. (▲) : sans contrôle positif de processus. A) Phytoplancton. B) Zooplancton. C) Chair de mollusques bivalves. D) Peau de poisson plat. E) Branchies de poisson plat. F) Viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool ; CT : extraction d'ADN par choc thermique. N = 6 échantillons par matrice.

II.2.C. Quantification du contrôle positif de processus

Nous avons quantifié le contrôle positif de processus dans les échantillons artificiellement contaminés avec la souche de *L. monocytogenes* B3PA-Lm1 en quantifiant le gène *hlyA* par qPCR. Aucune quantification du gène *hlyA* dans les ADN extraits des échantillons marins sans contrôle positif de processus n'a été observée. Ces échantillons n'étaient donc pas naturellement contaminés par *L. monocytogenes* ou le nombre de copies du gène *hlyA* était en-dessous du seuil de quantification (données non présentées). Le nombre d'unités génome du gène *hlyA* dans les échantillons artificiellement contaminés sont présentés dans la Figure 15.

En utilisant le kit Blood & Tissue, un nombre d'unités génome supérieur à 8 log a été observé pour 2/3 échantillons d'ADN de phytoplancton et 3/3 échantillons d'ADN de zooplancton. Mais en employant les kits PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome, une bonne efficacité de récupération du contrôle positif de processus a été observée pour l'ensemble des échantillons marins. Une absence de quantification du gène *hlyA* a cependant été constatée dans un échantillon d'ADN de viscères de poissons plats extrait avec le kit PowerBiofilm®.

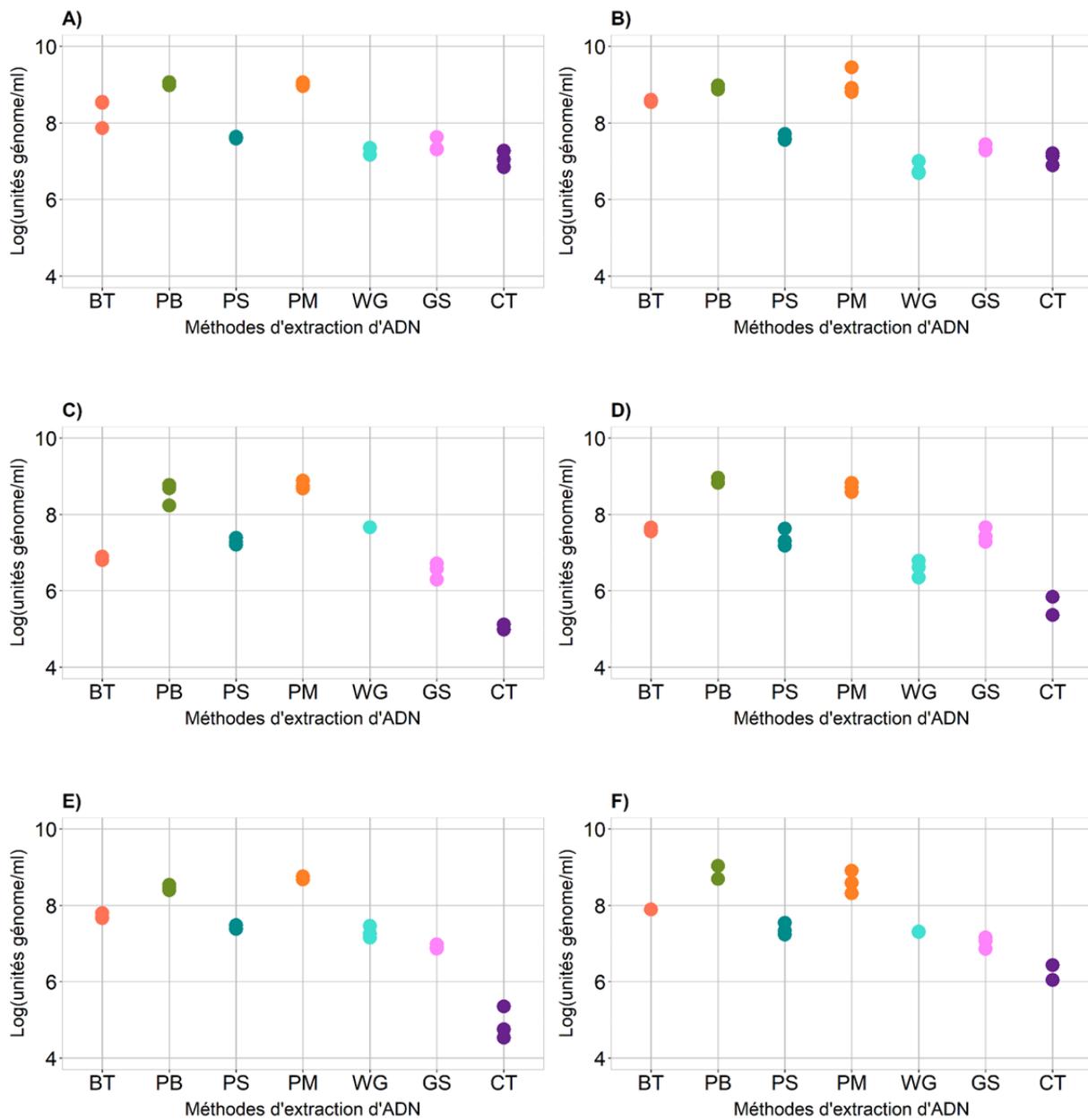


Figure 15 : Nombre d'unités génome du gène *hlyA* dans les ADN extraits des échantillons marins avec le contrôle positif de processus en utilisant les différentes méthodes d'extraction. A) Phytoplancton. B) Zooplancton. C) Chair de mollusques bivalves. D) Peau de poisson plat. E) Branchies de poisson plat. F) Viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool ; CT : extraction d'ADN par choc thermique. N = 3 échantillons par matrice.

La quantification du gène *hlyA* spécifique du contrôle positif de processus nous a permis de calculer le taux de faux négatifs par méthode d'extraction d'ADN et par nature d'échantillon marin (Figure 16). Ce taux correspondait aux échantillons dans lesquels le gène devait être quantifié. Si aucune quantification n'était observée, cela pouvait indiquer la présence d'inhibiteurs de la PCR. Aucun faux négatif n'a été observé en utilisant les kits PowerSoil®, PureLink™ Microbiome et GenElute™ Stool pour extraire l'ADN des échantillons marins et un taux de faux négatifs de 6 % a été calculé pour le kit PowerBiofilm® (Figure 16A). En revanche, les taux de faux négatifs étaient compris entre 17 et 22 % pour les kits Blood & Tissue, Wizard Genomic et la méthode d'extraction par choc thermique. Les inhibiteurs de PCR n'ont donc pas été efficacement éliminés avec ces trois méthodes d'extraction d'ADN.

Concernant le taux de faux négatifs par nature d'échantillon, nous n'avons observé aucun faux négatif pour les échantillons de zooplancton et de branchies de poissons plats et seulement 6 % de faux négatifs ont été constatés pour les échantillons de phytoplancton et de peau de poissons plats (Figure 16B). En revanche, les taux étaient supérieurs à 20 % pour les échantillons de chair de mollusques bivalves et de viscères de poissons plats.

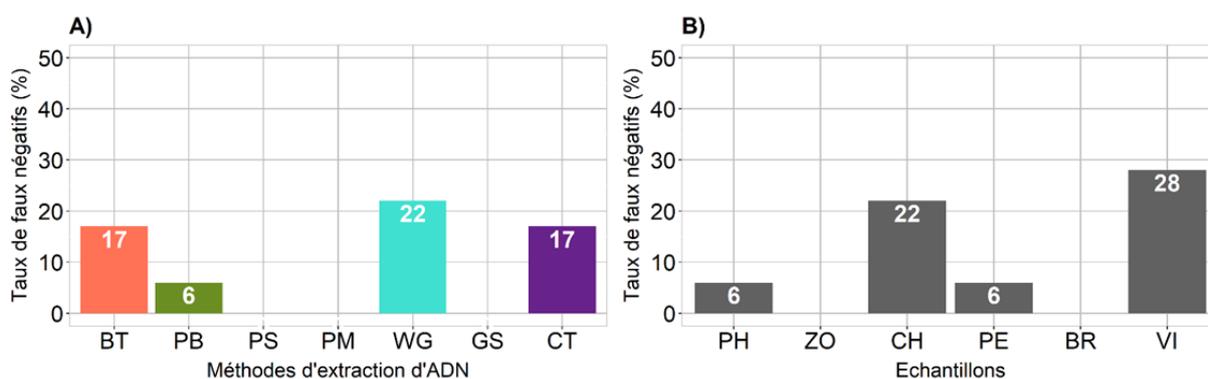


Figure 16 : Taux de faux négatifs calculés par (A) méthode d'extraction et (B) nature d'échantillon. PH : phytoplancton ; ZO : zooplancton ; CH : chair de mollusques bivalves ; PE : peau de poisson plat ; BR : branchies de poisson plat ; VI : viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool ; CT : extraction d'ADN par choc thermique.

III. Partie 2 : Optimisation des méthodes de quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens

Cette seconde partie était consacrée à l'optimisation des réactions de qPCR ciblant les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11*.

III.1. Matériel et méthodes

III.1.A. Souches bactériennes et plasmides

Des souches d'*E. coli* contenant des plasmides d'intérêt ont été utilisées pour l'optimisation des réactions de qPCR (Tableau 5). Les souches *E. coli* CIP RP4, *E. coli* CIP pIP69, *E. coli* CRBIP19.58 proviennent du Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (Paris, France) et la souche *E. coli* DH5 α /pTR99A a été fournie par M. Olivier Barraud de l'Université de Limoges (France). Ces souches bactériennes contiennent les plasmides pRP4, pIP69, pR1 et pTRC99A qui sont porteurs d'une copie des gènes cibles *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11*, respectivement. Ces plasmides ont été utilisés pour optimiser et évaluer la sensibilité des qPCR, et générer les courbes standard. Les souches bactériennes ont été isolées sur une gélose tryptone soja avec de l'extrait de levure (TSAYe, Oxoid, Dardilly, France) avec 100 μ g/ml d'ampicilline (Amp100) (MP Biomedicals, Santa Ana, Californie, Etats-Unis) pour la sélection du plasmide. Les géloses ont été incubées pendant 18 h à 37 °C car un temps d'incubation plus long peut entraîner une lyse des cellules et un rendement d'ADN plasmidique réduit. Quelques colonies d'*E. coli* ont été prélevées sur les géloses TSAYe + Amp100 à l'aide d'une oese et cultivées pendant 18 h à 37 °C dans 10 ml de bouillon tryptone soja avec de l'extrait de levure (TSBYe) supplémenté avec 100 μ g/ml d'ampicilline.

Des souches de *V. parahaemolyticus* ont été utilisées comme témoins positifs et négatifs dans les réactions de qPCR (Tableau 6). La souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 a été isolée de crevette, séquencée et analysée dans l'étude de Briet *et al.* (2018). Les 3 autres souches de *Vibrio* ont été isolées de produits de la pêche et leur génome total a également été séquencé. Des géloses nutritives salées à 1 % g/g NaCl (GNS, BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis) ont étéensemencées

avec ces souches de *Vibrio* conservées dans du BCC (bouillon cœur-cerveille) avec 20 % (v/v) de glycérol. Les géloses ont été incubées pendant 24 h à 37 °C puis conservées à 4 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN génomique.

Tableau 5 : Souches d'*E.coli* contenant les différents plasmides utilisés dans les réactions de qPCR. Les gènes d'intérêt pour chaque qPCR sont indiqués en vert.

Souches	Plasmides/Taille	Génotypes	Antibiotique pour la sélection	Références
<i>E. coli</i> CIP RP4	pRP4 (≈ 60 kpb)	tetA <i>bla</i> _{TEM-2} <i>aph(3')-Ib</i>	Amp (100 µg/ml)	Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (Paris)
<i>E. coli</i> CIP pIP69	pIP69 (≈ 70,5 kpb)	bla _{TEM-1} <i>aph(3')-Ia</i> <i>tetB</i>		
<i>E. coli</i> CRBIP19.58	pR1 (≈ 97,5 kpb)	sul1 <i>bla</i> _{TEM-1} <i>aphA7</i> <i>qacEΔ1</i> <i>aadA1</i>		
<i>E. coli</i> DH5α/pTRC99A	pTRC99A (≈ 7 kpb)	int1 <i>int12</i> <i>int13</i>		(Barraud <i>et al.</i> , 2010)

Tableau 6 : Souches de *V. parahaemolyticus* utilisées comme témoins dans les réactions de qPCR.

Souches	Génotypes	Témoins (-)	Témoins (+)	Référence
<i>V. parahaemolyticus</i> 12-B3PA-1629	<i>qnrA5</i> <i>bla</i> _{CARB-41} , <i>bla</i> _{OXA-SHE}	qPCR <i>bla</i> _{TEM}		Cette étude (Collection B3PA-ANSES)
<i>V. parahaemolyticus</i> 13-B3PA-2931	<i>floR</i> <i>aph(3')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> <i>bla</i> _{CARB-41} <i>sul2</i> <i>tetA</i> , <i>tet59</i>	qPCR <i>int11</i>		
<i>V. parahaemolyticus</i> 15-B3PA-0205	<i>hugA</i> <i>bla</i> _{CARB-31}	qPCR <i>tetA</i> qPCR <i>sul1</i>		
<i>V. parahaemolyticus</i> 16-B3PA-0006	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> <i>dfrA16</i> <i>strA</i> , <i>strB</i> <i>aadA2</i> <i>floR</i> <i>tetA</i> <i>bla</i> _{NDM-1} <i>int11</i>		qPCR <i>tetA</i> qPCR <i>sul1</i> qPCR <i>int11</i>	(Briet <i>et al.</i> , 2018)

III.1.B. Extraction de l'ADN plasmidique et génomique

L'ADN plasmidique a été extrait à partir des 10 ml de culture d'*E. coli* dans le bouillon TSBYe + Amp100 avec le kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les cultures ont été centrifugées pendant 10 min à 8 000 rpm puis le culot a été resuspendu dans 500 µl de tampon P1 qui contenait 100 µg/ml de RNase A. Nous avons ensuite ajouté 500 µl de tampon P2, mélangé les tubes par inversion puis ajouté 700 µl de tampon N3 avant de mélanger de nouveau les tubes par inversion afin d'éviter la fragmentation de l'ADN génomique et ainsi la contamination de l'ADN plasmidique. Après avoir centrifugé les tubes pendant 10 min à 13 000 rpm, le surnageant a été transféré dans les colonnes de centrifugation contenant une membrane de silice. Les colonnes ont été centrifugées pendant 1 min à 13 000 rpm et les membranes ont été lavées avec 750 µl de tampon PE. Enfin, l'ADN a été élué en ajoutant deux fois 50 µl de tampon EB préalablement chauffé à 70 °C puis conservé à 4 °C. Les échantillons d'ADN ont été dosés au spectrophotomètre DS-11 (Denovix) puis le nombre d'unités génome pour cette concentration d'ADN a été évalué en utilisant la taille de chaque plasmide (Figure 17).

Les échantillons d'ADN ont ensuite été dilués successivement au 1/10 pour réaliser les courbes standard allant d'environ $1,00 \cdot 10^{11}$ à $1,00 \cdot 10^3$ UG/ml.

L'ADN génomique a été extrait à partir de colonies isolées de *V. parahaemolyticus* avec le kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) selon les recommandations du fabricant en apportant quelques modifications. A partir de géloses GNSensemencées, quelques colonies ont été prélevées avec une oese et resuspendues dans 1 ml d'eau physiologique stérilisée. Après avoir centrifugé les tubes pendant 2 min à 8 000 rpm, le culot a été repris dans 180 µl de tampon de lyse (Tris-HCl pH 8.0 20 mM ; EDTA 2 mM ; Triton X-100 1,2 % ; lysozyme 20 mg/ml) et incubé pendant 30 min à 37 °C. Ensuite, 25 µl de protéinase K et 4 µl de RNase A à 4 mg/ml ont été ajoutés. Après avoir ajouté 200 µl de tampon AL, les tubes ont été incubés pendant 30 min à 56 °C et 200 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés. Cette solution a été transférée dans les colonnes de centrifugation contenant une membrane de silice. Les

colonnes ont été centrifugées pendant 1 min à 13 000 rpm puis les membranes ont été lavées une première fois avec 500 µl de tampon AW1 et une seconde fois avec le même volume de tampon AW2. Finalement, l'ADN a été élué en ajoutant deux fois 50 µl de tampon AE puis conservé à 4 °C. Les échantillons d'ADN ont été dosés au spectrophotomètre DS-11 puis dilués à une concentration finale d'environ 100 ng/µl dans de l'eau nuclease-free.

Calcul du poids d'une unité génome d'un plasmide (exemple du plasmide pRP4)

$$= \frac{\text{Taille du plasmide (pb)} \times \text{Poids moléculaire d'une pb}}{\text{Nombre d'Avogadro}}$$

$$= \frac{60\,000 \text{ pb} \times 660 \text{ g/mol}}{6,022 \cdot 10^{23}}$$

$$= 6,58 \cdot 10^{-17} \text{ g} = \mathbf{6,58 \cdot 10^{-11} \mu\text{g}}$$

Calcul du nombre d'unités génome dans 100 µg/ml d'ADN plasmidique

$$= \frac{\text{Concentration d'ADN}}{\text{Poids d'une unité génome du plasmide}}$$

$$= \frac{100 \mu\text{g/ml}}{6,58 \cdot 10^{-11}} = \mathbf{1,52 \cdot 10^{12} \text{ UG/ml}}$$

Figure 17 : Calcul de la concentration d'ADN pour obtenir un nombre d'unités génome défini.

III.1.C. Optimisation des qPCR

III.1.C.a. Réactions utilisant le colorant SYBR Green

Les travaux d'optimisation des qPCR ont porté dans un premier temps sur la sélection du pré-mix pour les réactions utilisant le colorant SYBR Green. Pour cela, nous avons comparé l'efficacité des pré-mix TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNase H Plus) (Takara Bio, Kusatsu, Japon) et LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Rotkreuz, Suisse) pour la qPCR ciblant le gène *tetA*. Les séquences nucléotidiques des amorces sont indiquées dans le Tableau 7. Le mélange réactionnel était composé de 10 µl de pré-mix (Roche ou Takara), de 0,4 µM d'amorces tetA-F et tetA-R (Eurobio, Les Ulis, France), de 2 µl d'ADN et d'eau nuclease-free (Qiagen) pour compléter le volume final à 20 µl. Pour le pré-mix

de Takara, les conditions utilisées pour les réactions de qPCR étaient les suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95 °C pendant 2 min puis 40 cycles d'amplification à 95 °C pendant 5 sec, 60 °C pendant 30 sec et 72 °C pendant 1 min pour finir par une étape de fusion à 95 °C pendant 5 sec et 60 °C pendant 1 min. Concernant le pré-mix de Roche, les conditions étaient les suivantes : une première étape de dénaturation à 95 °C pendant 5 min puis 45 cycles d'amplification à 95 °C pendant 10 sec, 60 °C pendant 30 sec et 72 °C pendant 5 sec et finalement une étape de fusion à 95 °C pendant 5 sec et 65 °C pendant 1 min.

Tableau 7 : Amorces et sondes utilisées dans les réactions de qPCR pour cibler les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11*.

Gènes ciblés	Amorces/Sondes	Séquences nucléotidiques (5' – 3')	Tailles des amplicons	Références
<i>tetA</i>	tetA-F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210 pb	(Ng <i>et al.</i> , 2001)
	tetA-R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
<i>bla_{TEM}</i>	blaTEM-F	TTCCTGTTTTGCTCACCCAG	113 pb	(Bibbal <i>et al.</i> , 2007)
	blaTEM-R	CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG		
<i>sul1</i>	sul1-F	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	67 pb	(Heuer and Smalla, 2007)
	sul1-R	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
	sul1-sonde	(FAM)CAGCGAGCCTTGCGGCGG(TAMRA)		
<i>int11</i>	int11-F	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	196 pb	(Barraud <i>et al.</i> , 2010)
	int11-R	GATCGGTCGAATGCGTGT		
	int11-sonde	(6-FAM)ATTCTGGCCGTGGTTCTGGGTTTT(BHQ1)		

Après avoir sélectionné le pré-mix, nous avons testé différentes concentrations d'amorces ciblant les gènes *tetA* et *bla_{TEM}*. Selon les informations du fabricant du pré-mix, des concentrations en amorces entre 0,2 et 1,0 µM étaient recommandées. Les mélanges réactionnels étaient composés de 10 µl de pré-mix, des amorces à une concentration finale de 0,4 ; 0,8 ou 1,0 µM (Eurobio), de 2 µl d'ADN et d'eau nuclease-free pour compléter le volume final à 20 µl. Les qPCR ont été réalisées selon les mêmes conditions décrites dans le paragraphe précédent.

III.1.C.b. Réactions utilisant la technologie de sonde TaqMan

Les travaux d'optimisation des qPCR utilisant la technologie de sonde TaqMan pour quantifier les gènes *sul1* et *int11* ont d'abord été effectués sur la sélection d'une concentration en amorces optimale. Pour ces réactions de qPCR, nous avons utilisé le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master

(Roche) en suivant les recommandations du fabricant qui préconisait d'utiliser des concentrations en amorces entre 0,3 et 1,0 μM . Les mélanges réactionnels comprenaient 10 μl de pré-mix, la sonde à 0,2 μM (Eurobio), les amorces à des concentrations finales de 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ou 1,0 μM (Eurobio), 5 μl d'ADN et de l'eau nuclease-free pour compléter le volume final à 20 μl . Pour les deux réactions de qPCR, les conditions étaient les suivantes : une étape de dénaturation à 95 °C pendant 5 min puis 45 cycles d'amplification à 95 °C pendant 10 sec, 60 °C pendant 1 min et 72 °C pendant 1 sec.

Après avoir sélectionné la concentration en amorces, nous avons comparé des concentrations de sondes TaqMan entre 0,05 et 2,0 μM comme recommandé par le fabricant du pré-mix. Ainsi, des concentrations de sondes de 0,05 ; 0,1 et 0,2 μM ont été testées avec les mêmes conditions de qPCR décrites dans le paragraphe précédent.

III.1.C.c. Amplification de l'ADN

Les réactions de qPCR ciblant les gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* ont été réalisées dans un thermocycleur LightCycler® 480 (Roche) et les valeurs de cycle de quantification (Cq) ont été calculées automatiquement par le logiciel LightCycler® 480 en utilisant la méthode de la dérivée seconde. De plus, pour les qPCR utilisant le colorant SYBR Green, les courbes de fusion ont également été analysées pour vérifier la spécificité des amorces.

III.1.D. Evaluation de la performance des réactions de qPCR

L'évaluation de la performance des réactions de qPCR était basée sur les normes NF U47-600-1:2015 et U47-600-2:2015 relatives aux exigences et aux recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale. Nous nous sommes également basés sur la norme NF T90-471:2015 concernant la détection et la quantification des *Legionella* par concentration et amplification génique par qPCR pour évaluer la qualité de l'eau.

La spécificité des sondes et des amorces a été évaluée *in silico* par un BlastN dans la base de données GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Les amorces et les sondes ont été définies comme spécifiques lorsque le témoin négatif n'était pas amplifié ou que la valeur de

Cq obtenue était en dehors de la gamme étalon alors que le témoin positif était quantifié. Les valeurs de Cq obtenues pour les différentes valeurs de nombre d'unités génome exprimées en log ont été représentées suivant un modèle de régression linéaire par une droite d'équation de type : $y = \text{valeur de Cq} = ax + b$, x étant le log d'unités génome pour la valeur y correspondante, a la pente de la droite et b l'ordonnée à l'origine. Grâce à cette équation, l'efficacité E a été estimée selon l'équation suivante afin d'évaluer le bon déroulement de l'amplification:

$$E = \left(10^{-\frac{1}{a}} - 1\right) \times 100$$

Afin de valider la réaction d'amplification, la pente a de l'équation devait être comprise entre -4,115 et -2,839 pour que l'efficacité E soit comprise entre 75 % et 125 %. Grâce à la droite de régression linéaire, le coefficient de détermination R^2 a également été évalué. Ce facteur permet de valider une distribution acceptable des valeurs de Cq autour de la droite de régression afin de prédire le nombre d'unités génome/ml grâce à la valeur de Cq obtenue. Pour une distribution acceptable des points, la valeur de R^2 devait être supérieure ou égale à 0,9.

Afin de vérifier les performances de la linéarité, le biais a été calculé par la différence entre la valeur mesurée (expérimentale) du log du nombre d'unités génome et sa valeur calculée (théorique) grâce à l'équation de la droite de régression linéaire. La valeur de ce biais a été estimée selon le calcul présenté dans le Tableau 8 et devait être inférieure à la valeur critique fixée à $0,25 \log_{10}$.

Enfin, la limite de quantification (LQ_{PCR}) a été définie comme le plus faible nombre d'unités génome quantifié avec un biais inférieur à $0,25 \log_{10}$. Si le témoin négatif a été quantifié avec un Cq inclus dans la gamme étalon, la LQ_{PCR} a été fixée au point de gamme précédent. Nous avons validé les conditions de la qPCR si la LQ_{PCR} était inférieure ou égale à 10^4 UG/ml pour les qPCR ciblant les gènes *tetA*, *bla_{TEM}* et *int11*, et inférieure ou égale à 10^5 UG/ml pour la qPCR ciblant le gène *sul1*.

Tableau 8 : Calcul du biais de la linéarité selon la norme NF U47-600-2:2015.

Niveau x_i estimé	x_1	x_2	x_3	x_k
$x'_i = \log_{10}(x_i)$	x'_1	x'_2	x'_3	x'_k
y_i	y_1	y_2	y_3	y_k
$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	\hat{x}_1	\hat{x}_2	\hat{x}_3	\hat{x}_k
Biais $_i = \hat{x}_i - x'_i$	$\hat{x}_1 - x'_1$	$\hat{x}_2 - x'_2$	$\hat{x}_3 - x'_3$	$\hat{x}_4 - x'_4$
Valeur critique de biais	0,25 log₁₀	0,25 log₁₀	0,25 log₁₀	0,25 log₁₀
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)			
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)			
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée			
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)			

III.2. Résultats

La spécificité des amorces et des sondes utilisées pour les qPCR ciblant les gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* a d'abord été vérifiée *in silico* par des recherches d'homologie à l'aide de la base de données GenBank du NCBI. Les résultats ont indiqué une homologie de 100 % avec les gènes recherchés validant ainsi la spécificité des amorces et des sondes pour les gènes ciblés (données non présentées).

III.2.A. Sélection du pré-mix pour la qPCR SYBR Green ciblant le gène *tetA*

Dans un premier temps, nous avons comparé deux pré-mix (Roche et Takara) pour les réactions de qPCR utilisant le colorant SYBR Green. La sélection du pré-mix a été réalisée en ciblant le gène *tetA* en utilisant une concentration en amorces de 0,4 μ M. La spécificité des amorces a été analysée avec les courbes de fusion (Annexe II). Avec le pré-mix Roche, un seul pic de fusion a été observé à 89 °C pour le témoin positif et chaque point de la gamme étalon alors qu'aucune valeur de T_m n'a été obtenue pour les deux témoins négatifs. En revanche, en utilisant le pré-mix Takara, un T_m de 91 °C a été observé pour le témoin négatif *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205, le témoin positif *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 et les points de la gamme étalon entre 10^4 et 10^{11} UG/ml. Un T_m identique entre le témoin négatif, le témoin positif et la gamme étalon traduisait une amplification non spécifique avec le pré-mix Takara.

Pour le pré-mix Takara, des valeurs de Cq de 35 et de 31,7 ont été obtenues pour le témoin eau et la souche de *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205, respectivement, les deux témoins négatifs. En revanche, aucune valeur de Cq n'a été observée pour ces témoins négatifs avec le pré-mix Roche. Pour le témoin positif (*V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006), les valeurs de Cq étaient de 11,0 et 12,6 pour le pré-mix Takara et le pré-mix Roche, respectivement, ce qui correspondait à des concentrations de $5,45 \cdot 10^{11}$ et $2,25 \cdot 10^{11}$ UG/ml.

Pour les deux pré-mix Roche et Takara, l'efficacité des réactions et le coefficient R² ont été validés (Tableau 9). La valeur critique de biais de $0,25 \log_{10}$ a été atteinte pour le point de gamme à $7,09 \cdot 10^3$ UG/ml pour les deux pré-mix. Cependant, la valeur de Cq du témoin négatif (*V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205) était comprise entre les points de gamme $7,09 \cdot 10^4$ et $7,09 \cdot 10^5$ UG/ml en utilisant le pré-mix Takara. La LQ_{PCR} a donc été fixée à $7,09 \cdot 10^5$ UG/ml pour ce pré-mix invalidant ainsi le pré-mix Takara. En revanche, la LQ_{PCR} pour la qPCR avec le pré-mix Roche était de $7,09 \cdot 10^4$ UG/ml. Le pré-mix Roche a donc été validé pour cette qPCR ciblant le gène *tetA*.

Après analyse des résultats obtenus pour le gène *tetA*, nous avons sélectionné le pré-mix Roche pour effectuer les optimisations concernant la concentration en amorces pour les réactions de qPCR ciblant les gènes *tetA* mais aussi *bla*_{TEM}.

Tableau 9 : Comparaison des paramètres des qPCR ciblant le gène *tetA* en utilisant A) le pré-mix Takara et B) le pré-mix Roche avec une concentration en amorces de 0,4 µM. Nombre en rouge : valeur supérieure à la valeur critique de biais.

A)

pente a	-3,2235	efficacité E	104,28 %		
interception b	48,833	linéarité R^2	0,9946		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
7,09.10 ¹¹	11,85	10,28	11,96	0,11	0,25
7,09.10 ¹⁰	10,85	13,6	10,93	0,08	0,25
7,09.10 ⁹	9,85	16,95	9,89	0,04	0,25
7,09.10 ⁸	8,85	20,72	8,72	-0,13	0,25
7,09.10 ⁷	7,85	23,63	7,82	-0,03	0,25
7,09.10 ⁶	6,85	27,09	6,75	-0,11	0,25
7,09.10 ⁵	5,85	30,55	5,67	-0,18	0,25
7,09.10 ⁴	4,85	33,92	4,63	-0,22	0,25
7,09.10 ³	3,85	35	4,29	0,441	0,25

B)

pente a	-3,4255	efficacité E	95,85 %		
interception b	51,52	linéarité R^2	0,9926		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
7,09.10 ¹¹	11,85	10,57	11,95	0,10	0,25
7,09.10 ¹⁰	10,85	13,9	10,98	0,13	0,25
7,09.10 ⁹	9,85	17,58	9,91	0,06	0,25
7,09.10 ⁸	8,85	21,85	8,66	-0,19	0,25
7,09.10 ⁷	7,85	24,61	7,86	0,01	0,25
7,09.10 ⁶	6,85	28,62	6,69	-0,17	0,25
7,09.10 ⁵	5,85	32,27	5,62	-0,23	0,25
7,09.10 ⁴	4,85	35,64	4,64	-0,21	0,25
7,09.10 ³	3,85	36,61	4,35	0,50	0,25
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)				
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)				
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée				
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)				

III.2.B. Sélection de la concentration en amorces pour les qPCR SYBR Green ciblant les gènes *tetA* et *bla_{TEM}*

Selon le fabricant du pré-mix Roche, il était recommandé d'utiliser les amorces à une concentration finale entre 0,4 et 1,0 μM . Nous avons donc choisi d'évaluer dans un premier temps l'efficacité des réactions de qPCR ciblant le gène *tetA* avec les concentrations finales d'amorces 0,4 ; 0,8 et 1,0 μM . Les résultats ayant déjà été décrits précédemment pour les amorces à 0,4 μM (Tableau 9), seuls les résultats concernant les amorces à 0,8 et 1,0 μM sont décrits dans cette partie.

Pour les deux concentrations en amorces 0,8 et 1,0 μM , le témoin positif *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 a bien été quantifié, les valeurs de C_q correspondant à $1,84 \cdot 10^{11}$ et $1,70 \cdot 10^{11}$ UG/ml. Alors qu'aucune valeur de C_q n'a été obtenue pour les deux témoins négatifs en utilisant les amorces à 0,8 μM , la valeur de C_q était de 37,8 pour le témoin eau avec les amorces à 1,0 μM .

Les courbes de fusion pour ces deux concentrations en amorces sont présentées en Annexe III. Pour les amorces à 0,8 μM , les résultats étaient similaires à ceux observés en utilisant les amorces à 0,4 μM . Un pic de fusion spécifique à 89 °C a été observé pour les points de la gamme étalon et le témoin positif, et aucun pic de fusion n'est ressorti pour les deux témoins négatifs. Cette qPCR était donc bien spécifique. En revanche, un pic non spécifique et moins élevé que ceux de la gamme étalon a été observé à 79 °C pour le témoin eau avec les amorces à 1,0 μM .

En utilisant les amorces à une concentration finale de 0,8 et 1,0 μM , nous avons validé l'efficacité des réactions E et le coefficient R^2 (Tableau 10). Alors que la valeur critique de biais a été atteinte à $7,09 \cdot 10^3$ UG/ml en utilisant les amorces à 0,8 μM , nous avons observé cette valeur critique de biais à $7,09 \cdot 10^4$ UG/ml avec les amorces à 1,0 μM . La concentration en amorces à 1,0 μM a donc été invalidée et celle à 0,8 μM a été validée.

Nous avons donc validé les deux réactions de qPCR utilisant les amorces à une concentration finale de 0,4 et 0,8 μM pour cibler le gène *tetA*.

Tableau 10 : Comparaison des paramètres des qPCR ciblant le gène *tetA* en utilisant les amorces à une concentration finale de A) 0,8 µM et B) 1,0 µM. *ND* : non déterminé. Nombre en rouge : valeur supérieure à la valeur critique de biais.

A)

pente a	-3,6651	efficacité E	87,43 %		
interception b	54,337	linéarité R^2	0,9986		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
7,09.10 ¹¹	11,85	11,19	11,77	-0,08	0,25
7,09.10 ¹⁰	10,85	14,63	10,83	-0,02	0,25
7,09.10 ⁹	9,85	17,87	9,95	0,10	0,25
7,09.10 ⁸	8,85	22,19	8,77	-0,08	0,25
7,09.10 ⁷	7,85	25,08	7,98	0,13	0,25
7,09.10 ⁶	6,85	28,93	6,93	0,08	0,25
7,09.10 ⁵	5,85	33,22	5,76	-0,09	0,25
7,09.10 ⁴	4,85	36,74	4,80	-0,05	0,25
7,09.10 ³	3,85	<i>ND</i>	14,83	10,97	0,25

B)

pente a	-3,6285	efficacité E	88,71 %		
interception b	53,251	linéarité R^2	0,9972		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
7,09.10 ¹¹	11,85	10,18	11,88	0,03	0,25
7,09.10 ¹⁰	10,85	13,95	10,84	-0,01	0,25
7,09.10 ⁹	9,85	17,23	9,93	0,08	0,25
7,09.10 ⁸	8,85	22,02	8,61	-0,24	0,25
7,09.10 ⁷	7,85	24,65	7,89	0,04	0,25
7,09.10 ⁶	6,85	28,25	6,90	0,04	0,25
7,09.10 ⁵	5,85	32,02	5,86	0,01	0,25
7,09.10 ⁴	4,85	34,77	5,10	0,25	0,25
7,09.10 ³	3,85	40	3,65	-0,20	0,25
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)				
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)				
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée				
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)				

Pour l'optimisation de la qPCR SYBR Green ciblant le gène *bla*_{TEM}, les concentrations en amorces 0,4 ; 0,8 et 1,0 µM ont également été comparées en utilisant le plasmide pIP69 pour réaliser la courbe standard et la souche de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 comme témoin négatif. Etant donné qu'aucune souche bactérienne possédant le gène *bla*_{TEM} n'était disponible au laboratoire, seul le plasmide a été utilisé pour évaluer la spécificité de la réaction.

L'efficacité des réactions E ainsi que les coefficients R² ont été validés pour les trois concentrations en amorces (Tableau 11). La valeur critique de biais a été atteinte à 1,87.10³ UG/ml en utilisant les amorces à une concentration finale de 0,4 µM alors qu'elle n'a pas été atteinte pour les concentrations 0,8 et 1,0 µM. Cependant, les valeurs de C_q pour le témoin eau et le témoin négatif *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 étaient comprises entre les points de la gamme 1,87.10³ et 1,87.10⁴ UG/ml avec les amorces à 1,0 µM. Pour les concentrations en amorces de 0,4 et 0,8 µM, les valeurs de C_q de ces deux témoins négatifs étaient en dehors de la gamme. La LQ_{PCR} a donc été fixée à 1,87.10⁴ UG/ml pour les trois concentrations en amorces (0,4, 0,8 et 1,0 µM).

En regardant les courbes de fusion, nous avons pu observer un pic spécifique à 82 °C pour les différents points de la gamme et des pics non spécifiques de plus faible intensité à 76 °C pour la souche de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 et à 77 °C pour le témoin eau (Annexe IV). Nous avons donc validé les concentrations en amorces 0,4 ; 0,8 et 1,0 µM pour la qPCR ciblant le gène *bla*_{TEM}.

Tableau 11 : Comparaison des paramètres des qPCR ciblant le gène *bla_{TEM}* en utilisant les amorces à une concentration finale de A) 0,4 µM, B) 0,8 µM et C) 1,0 µM. *ND* : non déterminé. Nombre en rouge : valeur supérieure à la valeur critique de biais.

A)

pente a	-3,7614	efficacité E	84,44 %		
interception b	52,758	linéarité R^2	0,9981		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais_i = $\hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	14,28	10,23	-0,04	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	17,95	9,25	-0,02	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	21,83	8,22	-0,05	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	25,16	7,34	0,07	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	28,57	6,43	0,16	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	32,83	5,30	0,03	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	37,22	4,13	-0,14	0,25
1,87.10 ³	3,27	<i>ND</i>	14,03	10,754	0,25

B)

pente a	-3,2835	efficacité E	101,63 %		
interception b	48,416	linéarité R^2	0,9968		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais_i = $\hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	14,17	10,43	0,16	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	17,78	9,33	0,06	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	21,58	8,17	-0,10	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	24,99	7,13	-0,14	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	27,90	6,25	-0,02	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	31,71	5,09	-0,18	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	34,32	4,29	0,02	0,25
1,87.10 ³	3,27	37	3,48	0,21	0,25

C)

pente a	-3,3210	efficacité E	100,40 %		
interception b	48,704	linéarité R^2	0,9975		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais_i = $\hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	14,17	10,40	0,13	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	17,77	9,31	0,04	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	21,48	8,20	-0,07	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	24,99	7,14	-0,13	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	28,05	6,22	-0,05	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	31,68	5,13	-0,15	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	33,86	4,47	0,20	0,25
1,87.10 ³	3,27	37,72	3,31	0,04	0,25
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)				
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)				
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée				
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)				

III.2.C. Sélection de la concentration en amorces pour les qPCR TaqMan ciblant les gènes *sul1* et *int11*

L'optimisation des qPCR utilisant la technologie de sonde TaqMan et ciblant les gènes *sul1* et *int11* a dans un premier temps porté sur la sélection de la concentration en amorces. Le fabricant du pré-mix Roche recommandant une utilisation des amorces à une concentration comprise entre 0,3 et 1,0 μM , nous avons choisi de comparer les amorces à 0,4 ; 0,8 et 1,0 μM avec une concentration fixe de la sonde à 0,2 μM . Cette comparaison a d'abord été effectuée pour la qPCR ciblant le gène *sul1* en utilisant le plasmide pR1 pour la gamme étalon, la souche de *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205 comme témoin négatif et la souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 comme témoin positif.

Pour les trois concentrations en amorces testées, nous avons validé l'efficacité de réaction E et les coefficients de détermination R^2 (Tableau 12). La valeur critique de biais a été observée pour le point de gamme $1,00 \cdot 10^5$ UG/ml avec les amorces à 1,0 μM fixant ainsi la LQ_{PCR} à $1,00 \cdot 10^6$ UG/ml. Pour les amorces à 0,4 et 0,8 μM , la valeur critique de biais n'a pas été atteinte. Les valeurs de C_q du témoin négatif *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205 ont été observées entre les deux derniers points de la gamme étalon avec ces deux concentrations en amorces. La LQ_{PCR} a donc été fixée à $1,00 \cdot 10^5$ UG/ml. Nous avons donc validé les concentrations 0,4 et 0,8 μM pour les amorces ciblant le gène *sul1*.

Les mêmes concentrations en amorces ont été comparées pour la qPCR ciblant le gène *int11* avec une concentration fixe de la sonde à 0,2 μM . Pour cela, le plasmide pTRC99A a été utilisé pour la gamme étalon, la souche de *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 comme témoin négatif et la souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 comme témoin positif. L'efficacité des réactions E et les coefficients R^2 ont été validés pour les trois concentrations en amorces (0,4 ; 0,8 et 1,0 μM) (Tableau 13). La valeur critique de biais a été observée pour le point de gamme $1,87 \cdot 10^5$ UG/ml en utilisant les amorces à une concentration finale de 1,0 μM . La LQ_{PCR} a donc été déterminée à $1,87 \cdot 10^6$ UG/ml. Mais en utilisant les amorces à 0,4 et 0,8 μM , la valeur critique de biais a été atteinte au point de gamme $1,87 \cdot 10^3$ UG/ml fixant ainsi la LQ_{PCR} à $1,87 \cdot 10^4$ UG/ml. Les amorces à une concentration finale de 0,4 et de 0,8 μM ont donc été validées pour la qPCR ciblant le gène *int11*.

Tableau 12 : Comparaison des paramètres des qPCR ciblant le gène *su11* en utilisant la sonde à une concentration finale de 0,2 µM et les amorces à une concentration finale de A) 0,4 µM, B) 0,8 µM et C) 1,0 µM. Nombre en rouge : valeur supérieure à la valeur critique de biais.

A)

pente a	-3,4468	efficacité E	95,04 %		
interception b	53,326	linéarité R^2	0,9976		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,00.10 ¹⁰	10,00	18,93	9,98	-0,02	0,25
1,00.10 ⁹	9,00	22,28	9,01	0,01	0,25
1,00.10 ⁸	8,00	25,75	8,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁷	7,00	29,19	7,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁶	6,00	32,87	5,93	-0,07	0,25
1,00.10 ⁵	5,00	35,37	5,21	0,21	0,25
1,00.10 ⁴	4,00	40	3,87	-0,13	0,25

B)

pente a	-3,4164	efficacité E	96,20 %		
interception b	53,496	linéarité R^2	0,9996		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,00.10 ¹⁰	10,00	19,34	10,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁹	9,00	22,71	9,01	0,01	0,25
1,00.10 ⁸	8,00	26,18	8,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁷	7,00	29,75	6,95	-0,05	0,25
1,00.10 ⁶	6,00	32,90	6,03	0,03	0,25
1,00.10 ⁵	5,00	36,19	5,07	0,07	0,25
1,00.10 ⁴	4,00	40	3,95	-0,05	0,25

C)

pente a	-3,3993	efficacité E	96,87 %		
interception b	53,484	linéarité R^2	0,9955		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,00.10 ¹⁰	10,00	19,42	10,02	0,02	0,25
1,00.10 ⁹	9,00	22,82	9,02	0,02	0,25
1,00.10 ⁸	8,00	26,20	8,03	0,03	0,25
1,00.10 ⁷	7,00	29,75	6,98	-0,02	0,25
1,00.10 ⁶	6,00	33,10	6,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁵	5,00	37,41	4,73	-0,27	0,25
1,00.10 ⁴	4,00	39,12	4,23	0,23	0,25
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)				
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)				
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée				
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)				

Tableau 13 : Comparaison des paramètres des qPCR ciblant le gène *int11* en utilisant la sonde à une concentration finale de 0,2 µM et les amorces à une concentration finale de A) 0,4 µM, B) 0,8 µM et C) 1,0 µM. Nombre en rouge : valeur supérieure à la valeur critique de biais.

A)

pente a	-3,3258	efficacité E	99,84 %		
interception b	48,631	linéarité R^2	0,995		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	13,83	10,46	0,19	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	17,61	9,33	0,06	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	21,23	8,24	-0,03	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	25,01	7,10	-0,17	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	28,51	6,05	-0,22	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	31,27	5,22	-0,05	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	34,63	4,21	-0,06	0,25
1,87.10 ³	3,27	36,78	3,56	0,29	0,25

B)

pente a	-3,4657	efficacité E	94,33 %		
interception b	49,594	linéarité R^2	0,9991		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	13,81	10,33	0,05	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	17,41	9,29	0,01	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	20,92	8,27	0,00	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	24,80	7,15	-0,12	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	28,05	6,22	-0,06	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	31,09	5,34	0,07	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	34,66	4,31	0,04	0,25
1,87.10 ³	3,27	ND	14,31	11,04	0,25

C)

pente a	-3,2154	efficacité E	104,65 %		
interception b	47,49	linéarité R^2	0,9905		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	13,81	10,47	0,20	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	17,50	9,33	0,06	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	20,88	8,28	0,00	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	24,48	7,16	-0,12	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	28,05	6,05	-0,23	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	31,35	5,02	-0,25	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	34,17	4,14	-0,13	0,25
1,87.10 ³	3,27	35,49	3,73	0,46	0,25
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)				
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)				
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée				
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)				

En considérant l'ensemble de ces résultats, nous avons sélectionné les amorces ciblant les gènes *sul1* et *int11* à une concentration finale de 0,4 μM pour réaliser la seconde étape d'optimisation de ces qPCR.

III.2.D. Sélection de la concentration de la sonde pour les qPCR TaqMan ciblant les gènes *sul1* et *int11*

Cette dernière étape d'optimisation consistait à faire varier la concentration des sondes TaqMan, le fabricant du pré-mix préconisant l'utilisation des sondes à une concentration finale comprise entre 0,05 et 0,2 μM . Nous avons donc testé les concentrations 0,05 ; 0,1 et 0,2 μM pour les sondes avec une concentration en amorces fixe de 0,4 μM .

Pour toutes les concentrations de la sonde testées ciblant le gène *sul1*, les efficacités des réactions E et les coefficients R^2 ont été validés (Tableau 14). Les valeurs de biais calculées pour chaque concentration étaient inférieures à la valeur critique de biais de 0,25 \log_{10} . De plus, le gène *sul1* a bien été quantifié dans le témoin positif *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 dans les trois conditions testées. Les valeurs de C_q pour les témoins négatifs, à savoir le témoin eau et la souche de *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205, étaient comprises entre les deux derniers points de la gamme. La LQ_{PCR} a donc été fixée à $1,00 \cdot 10^5$ UG/ml pour les trois concentrations de la sonde. Les concentrations de la sonde à 0,05 ; 0,1 et 0,2 μM ont donc été validées pour la qPCR ciblant le gène *sul1*. Les efficacités des réactions E et les coefficients R^2 pour toutes les concentrations de la sonde ciblant le gène *int11* ont également été validées (Tableau 15). Le gène *int11* a bien été quantifié dans le témoin positif *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 avec les trois concentrations de la sonde. Concernant les deux témoins négatifs (le témoin eau et la souche de *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931), les valeurs de C_q observées étaient comprises entre les deux derniers points de la gamme étalon. La valeur critique de biais a été atteinte à $1,87 \cdot 10^3$ UG/ml en utilisant la sonde à une concentration finale de 0,05 μM . La valeur critique de biais n'a cependant pas été observée en utilisant la sonde à une concentration finale de 1,0 et 2,0 μM . La LQ_{PCR} a donc été fixée à $1,87 \cdot 10^4$ UG/ml pour les trois concentrations de la sonde testées. Nous avons donc validé les trois concentrations de la sonde ciblant le gène *int11*.

Tableau 14 : Comparaison des paramètres des qPCR ciblant le gène *sul1* en utilisant les amorces à une concentration fixe de 0,4 µM et la sonde à une concentration finale de A) 0,05 µM, B) 0,1 µM et C) 0,2 µM. Nombre en rouge : valeur supérieure à la valeur critique de biais.

A)

pente a	-3,5268	efficacité E	92,11 %		
interception b	53,98	linéarité R^2	0,9996		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,00.10 ¹⁰	10,00	18,84	9,96	-0,04	0,25
1,00.10 ⁹	9,00	22,27	8,99	-0,01	0,25
1,00.10 ⁸	8,00	25,72	8,01	0,01	0,25
1,00.10 ⁷	7,00	29,17	7,03	0,03	0,25
1,00.10 ⁶	6,00	32,57	6,07	0,07	0,25
1,00.10 ⁵	5,00	36,48	4,96	-0,04	0,25
1,00.10 ⁴	4,00	40	3,96	-0,04	0,25

B)

pente a	-3,4946	efficacité E	93,27 %		
interception b	53,697	linéarité R^2	0,9993		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,00.10 ¹⁰	10,00	18,92	9,95	-0,05	0,25
1,00.10 ⁹	9,00	22,26	9,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁸	8,00	25,73	8,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁷	7,00	29,09	7,04	0,04	0,25
1,00.10 ⁶	6,00	32,42	6,09	0,09	0,25
1,00.10 ⁵	5,00	36,22	5,00	0,00	0,25
1,00.10 ⁴	4,00	40	3,92	-0,08	0,25

C)

pente a	-3,4832	efficacité E	93,68 %		
interception b	53,683	linéarité R^2	0,9995		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,00.10 ¹⁰	10,00	18,98	9,96	-0,04	0,25
1,00.10 ⁹	9,00	22,30	8,98	-0,02	0,25
1,00.10 ⁸	8,00	25,80	7,98	-0,02	0,25
1,00.10 ⁷	7,00	29,15	7,02	0,02	0,25
1,00.10 ⁶	6,00	32,87	5,96	-0,04	0,25
1,00.10 ⁵	5,00	36,00	5,06	0,06	0,25
1,00.10 ⁴	4,00	40	3,92	-0,08	0,25
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)				
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)				
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée				
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)				

Tableau 15 : Comparaison des paramètres des qPCR ciblant le gène *int11* en utilisant les amorces à une concentration fixe de 0,4 µM et la sonde à une concentration finale de A) 0,05 µM, B) 0,1 µM et C) 0,2 µM. Nombre en rouge : valeur supérieure à la valeur critique de biais.

A)

pente a	-3,4343	efficacité E	95,52 %		
interception b	48,779	linéarité R^2	0,9977		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	12,99	10,42	0,15	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	17,18	9,20	-0,07	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	20,53	8,23	-0,05	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	23,96	7,23	-0,05	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	27,54	6,18	-0,09	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	30,84	5,22	-0,05	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	33,6	4,42	0,15	0,25
1,87.10 ³	3,27	ND	14,20	10,93	0,25

B)

pente a	-3,4033	efficacité E	96,71 %		
interception b	49,967	linéarité R^2	0,9984		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	14,70	10,36	0,09	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	18,52	9,24	-0,03	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	21,79	8,28	0,01	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	25,28	7,25	-0,02	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	28,76	6,23	-0,04	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	32,32	5,19	-0,09	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	35,81	4,16	-0,11	0,25
1,87.10 ³	3,27	38,18	3,46	0,19	0,25

C)

pente a	-3,4105	efficacité E	96,43 %		
interception b	50,548	linéarité R^2	0,9984		
Niveau x_i estimé	$x'_i = \log_{10}(x_i)$	y_i	$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{a}$	Biais$_i = \hat{x}_i - x'_i$	Valeur critique de biais
1,87.10 ¹⁰	10,27	15,24	10,35	0,08	0,25
1,87.10 ⁹	9,27	19,08	9,23	-0,05	0,25
1,87.10 ⁸	8,27	22,37	8,26	-0,01	0,25
1,87.10 ⁷	7,27	25,87	7,24	-0,04	0,25
1,87.10 ⁶	6,27	29,29	6,23	-0,04	0,25
1,87.10 ⁵	5,27	32,90	5,17	-0,10	0,25
1,87.10 ⁴	4,27	35,27	4,48	-0,21	0,25
1,87.10 ³	3,27	39,60	3,21	-0,06	0,25
x_i	estimation du nombre d'unités génome du plasmide (UG/ml)				
x'_i	log du nombre d'unités génome du plasmide (log UG/ml)				
y_i	valeur de Cq obtenue pour la quantité de plasmide donnée				
\hat{x}_i	valeur calculée du nombre d'unités génome du plasmide en utilisant la droite de régression linéaire (avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine) (log UG/ml)				

Finalement, les conditions choisies pour quantifier les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* par qPCR sont indiquées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Conditions validées pour la quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* par qPCR.

Gènes ciblés	Technologie	Pré-mix	Concentration des amorces (μM)	Concentration des sondes (μM)
<i>tetA</i>	Colorant SYBR Green	LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master (Roche)	0,4 μM	
<i>bla_{TEM}</i>				
<i>sul1</i>	Sonde TaqMan	LightCycler [®] 480 Probes Master (Roche)		0,2 μM
<i>int11</i>				

IV. Discussion

IV.1. Partie 1 : Sélection d'une méthode d'extraction d'ADN optimale à partir d'échantillons marins

Dans la première partie de ces travaux, sept méthodes d'extraction d'ADN total ont été comparées en considérant leur efficacité à extraire de l'ADN bactérien pur à une concentration suffisante pour être amplifié par qPCR à partir de diverses matrices de l'environnement marin. L'objectif a été de valider un protocole unique applicable à des échantillons appartenant à un réseau trophique, c'est-à-dire aussi bien des cellules végétales qu'animales et des tissus de vertébrés et d'invertébrés. L'ajout d'une souche de *L. monocytogenes* en tant que contrôle positif de processus (comme décrit dans la norme NF EN ISO 22174:2005) a permis de contrôler l'efficacité d'extraction de l'ADN et l'absence d'inhibiteurs de PCR. L'introduction de cette souche dans les échantillons n'a pas eu d'impact significatif sur la concentration finale en ADN des échantillons. La méthode de lyse par choc thermique et le kit Wizard Genomic ont permis d'obtenir des concentrations d'ADN plus élevées que les autres méthodes d'extraction pour la majorité des échantillons analysés en particulier pour les échantillons de chair de mollusques bivalves et de branchies de poissons plats. Par rapport aux autres techniques d'extraction testées, ces deux méthodes ne comportent pas d'étape de lyse cellulaire physique par battage de billes mais principalement une lyse thermique pour la méthode de lyse par choc thermique

et une lyse chimique pour le kit Wizard Genomic. Ces deux méthodes de lyse cellulaire ont visiblement eu plus d'impact sur la destruction des membranes cellulaires et ont permis de libérer plus de contenu cellulaire. En se basant sur le ratio de pureté A260nm/A280nm également obtenu par spectrophotométrie, les échantillons d'ADN extraits avec ces deux méthodes n'étaient pas considérés comme purs avec des ratios souvent inférieurs à 1,8. Ces valeurs de ratio pourraient démontrer une présence plus importante d'inhibiteurs et de contaminants comme de l'ARN, des protéines ou d'autres contaminants environnementaux co-purifiés avec les acides nucléiques. En effet, nous avons noté une absence de quantification de l'ADN bactérien en ciblant les gènes de ménage *tuf* et *rpoB* dans les échantillons d'ADN de chair de mollusques bivalves, de peau, de branchies et de viscères de poissons plats extraits avec la méthode de lyse par choc thermique. De plus, la présence de contaminants a été mise en évidence par l'absence d'amplification du gène *hlyA* spécifique du contrôle positif de processus dans certains échantillons d'ADN de phytoplancton, de chair de mollusques bivalves, de peau et de viscères de poissons plats contenant le contrôle positif de processus en utilisant la méthode d'extraction par lyse par choc thermique et le kit Wizard Genomic. Ces deux méthodes n'ont pas permis une élimination efficace de ces contaminants qui peuvent agir comme des inhibiteurs de la PCR et conduire à des taux de faux négatifs plus élevés qui ont été montrés dans cette étude (17 % et 22 %) (Schrader *et al.*, 2012). Ces deux méthodes contrairement aux autres kits d'extraction ne comportaient pas d'étape de purification de l'ADN sur colonne.

Le ratio A260nm/A230nm a également été considéré pour évaluer la pureté des échantillons d'ADN. Pour la majorité des acides nucléiques extraits à partir des différentes méthodes, ce ratio était inférieur à 2,0 voire très proche de 0 indiquant que les échantillons d'ADN pouvaient être fortement contaminés par des résidus de phénol, de guanidine ou de glycogène provenant de l'extraction même de l'ADN ou de l'environnement. La présence de contaminants venant de l'environnement marin voire des échantillons eux-mêmes a déjà été mise en évidence, où des composés tels que des polysaccharides, des polyphénols, des acides humiques, des acides fulviques ou du glycogène ont été isolés de fruits de mer (Schrader *et al.*, 2012). Ces molécules sont connues pour être des substances

inhibitrices de la PCR et conduisent à des résultats erronés voire une perte conséquente d'informations. De plus, une faible valeur des ratios de pureté A260nm/A280nm et A260nm/A230nm peut également s'expliquer par la limite de détection de l'ADN par le spectrophotomètre. En effet, selon les informations du fabricant de l'appareil (Denovix), de faibles ratios peuvent être observés pour des échantillons d'acides nucléiques dont la concentration en ADN est inférieure à 10 ng/μl ce qui était le cas pour les échantillons de phytoplancton et de zooplancton. Selon les données bibliographiques, les quantités d'ADN extraits à partir de ces échantillons sont en général très faibles notamment à cause de leur composition. Par exemple, les diatomées et les dinoflagellés qui sont les principaux représentants du phytoplancton végétal possèdent une thèque rigide souvent faite de cellulose ou de silice qui protège les cellules et rend difficile leur destruction pour extraire l'ADN (Frazao and D. Silva, 2018). De plus, il a été démontré qu'une très faible densité de bactéries est associée au zooplancton comme les copépodes (Fazhan *et al.*, 2016). Enfin, des ADN impurs définis par les valeurs de ratios pourraient aussi révéler une dégradation de l'ADN induite par une lyse cellulaire inadéquate des échantillons qui pourrait alors être mise en évidence par une électrophorèse des ADN extraits sur un gel d'agarose, comme spécifié dans la norme NF EN ISO 20837:2006.

Avec les kits PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome, nous avons obtenu des concentrations d'ADN plus faibles que celles observées avec la méthode de lyse par choc thermique et le kit Wizard Genomic mais ces ADN étaient de meilleure pureté. Les kits PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome sont caractérisés par une première lyse physique des cellules par un battage de billes ainsi qu'une étape de purification de l'ADN sur colonne renfermant une membrane de silice. L'étape de battage de billes est recommandée pour une lyse cellulaire optimale selon la norme NF EN ISO 20837:2006. L'utilisation d'une colonne de purification permet de retenir l'ADN sur la membrane et d'éliminer les contaminants par des étapes de lavage contrairement aux méthodes traditionnelles d'extraction d'ADN telles que l'extraction phénol-chloroforme ou encore le kit Wizard Genomic et la lyse par choc thermique utilisés dans cette étude. Cette étape de purification de l'ADN sur colonne a permis d'obtenir un ADN d'une meilleure pureté et une réduction des effets inhibiteurs de PCR qui était visible

par une meilleure amplification du contrôle positif de processus. En effet, le gène *hlyA* a été plus amplifié à partir de l'ADN extrait avec les deux kits PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome que celui extrait avec les autres méthodes d'extraction. Cependant, nous avons noté une absence de quantification dans un seul échantillon d'ADN extrait à partir des viscères de poissons plats avec le kit PowerBiofilm®, donnant alors un taux de faux négatifs de 6 % pour ce kit contre 0 % pour le kit PureLink™ Microbiome.

Afin de quantifier l'ADN bactérien dans les échantillons d'ADN totaux extraits, les deux gènes de ménage bactérien *tuf* et *rpoB* ont été ciblés par qPCR. Les amorces utilisées pour la quantification du gène *tuf* contiennent des bases dégénérées permettant d'identifier une large gamme de bactéries Gram positives et Gram négatives en raison du polymorphisme du gène entre les différentes familles bactériennes (Tanaka *et al.*, 2010). Ce gène existe en une ou deux copies et est bien conservé entre les génomes bactériens ce qui le rend plus discriminant que le gène de l'ARNr 16S qui est le plus couramment utilisé dans l'identification bactérienne (Li *et al.*, 2012). En effet, l'utilisation du gène de l'ARNr 16S présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, le gène de l'ARNr 16S est multicopies ce qui pose un problème pour la quantification de la population bactérienne pouvant conduire à sa surestimation. L'utilisation du gène *tuf* peut également conduire à une surestimation de la population bactérienne dans la mesure où certaines espèces bactériennes comme *P. aeruginosa*, *V. cholerae* et *Haemophilus influenzae* contiennent deux copies du gène (Lathe and Bork, 2001). De plus, le gène de l'ARNr 16S présente des similitudes avec le gène de l'ARNr 18S eucaryote pouvant donner des résultats faussement positifs car ce gène est présent dans les échantillons complexes mais aussi dans les réactifs utilisés lors de l'extraction et de l'amplification de l'ADN (Nakano, 2018). Une meilleure quantification du gène *tuf* a été observée dans les ADN extraits avec les deux kits PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome pour la majorité des échantillons marins. Ces résultats indiquent que ces deux méthodes d'extraction permettent non seulement d'extraire une quantité plus importante d'ADN bactérien par rapport aux autres méthodes d'extraction mais également de réduire significativement la quantité d'inhibiteurs de la PCR. En revanche, les résultats de quantification du gène *rpoB* étaient peu

concluants avec des valeurs de Cq similaires entre toutes les méthodes d'extraction d'ADN rendant impossible la sélection d'une méthode optimale. De même, nous avons noté une absence d'amplification du gène *rpoB* plus fréquente comparée à celle du gène *tuf* pour un même échantillon donné. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces observations. Dans un premier temps, cette réaction de qPCR a été mise en place pour la quantification de bactéries dans des fruits et légumes prêts à la consommation qui sont des matrices différentes des échantillons marins et qui abritent des espèces et genres bactériens différents (Takahashi *et al.*, 2006). Contrairement aux amorces du gène *tuf*, les amorces du gène *rpoB* ne sont pas dégénérées et cibleraient donc potentiellement un panel plus restreint d'espèces ou de genres bactériens. La meilleure amplification du gène *rpoB* a été observée pour les échantillons de phytoplancton peu importe la méthode d'extraction d'ADN utilisée. Cette amplification plus élevée que dans les autres matrices peut notamment s'expliquer par le fait que le gène *rpoB* code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne en plus de l'ARN polymérase dans les chloroplastes des plantes et des algues qui sont les principaux représentants du phytoplancton (Börner *et al.*, 2015). L'ADN bactérien extrait des différentes matrices avec le kit GenElute™ Stool était mieux amplifié en ciblant le gène *rpoB* mais pas en ciblant les gènes *tuf* et *hlyA*. Pour la quantification de la population bactérienne dans les échantillons complexes marins, le gène *tuf* est donc à privilégier par rapport au gène *rpoB* mais aussi par rapport au gène de l'ARNr 16S.

Les trois autres méthodes d'extraction, à savoir les kits Blood & Tissue, PowerSoil® et GenElute™ Stool, ont permis d'extraire des concentrations d'ADN similaires entre eux principalement à partir des échantillons de peau et de viscères de poissons plats. L'efficacité d'amplification du gène *tuf* dans l'ADN extrait de la majorité des échantillons avec ces trois kits était cependant moins bonne qu'en utilisant les kits PowerBiofilm® et PureLink™ Microbiome. Pourtant ces trois kits utilisent également une lyse cellulaire physique couplée à une lyse chimique et thermique ainsi qu'une purification des acides nucléiques sur colonne. Cette différence d'amplification du gène *tuf* pourrait provenir des différents tampons utilisés dans les kits comme les tampons de lyse ou de lavage dont la composition

n'est pas connue et peut différer selon le fabricant. En regardant l'efficacité des méthodes d'extraction par nature d'échantillon, nous avons observé un taux de faux négatifs plus élevé pour les échantillons de viscères de poissons plats (28 %) par rapport aux autres matrices malgré de bonnes concentrations et une bonne pureté des acides nucléiques. Des études ont démontré que l'analyse de l'ADN d'échantillons d'intestins de poissons était assez difficile principalement en raison de la présence de sels biliaires et de polysaccharides complexes qui agissent comme des inhibiteurs de la PCR (Larsen *et al.*, 2014). Etudier cet organe pour les poissons reste néanmoins intéressant pour étudier son rôle dans l'accumulation des GRA dans le cas d'un réseau trophique. Un taux de faux négatifs élevé (22 %) associé à une faible quantification des gènes *tuf* et *rpoB* ont été observés pour les échantillons de chair de mollusques bivalves. L'étude menée par Popa *et al.* (2007) et portant sur l'extraction d'ADN à partir de tissus musculaires de moules d'eau douce a révélé que ces tissus étaient constitués d'une quantité importante de mucopolysaccharides qui ont tendance à co-précipiter avec l'ADN et à agir comme inhibiteur de la PCR. En revanche, nous avons noté des faibles taux de faux négatifs pour les échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de peau et de branchies de poissons plats (entre 0 et 6 %) montrant une plus faible présence d'inhibiteurs dans ces matrices ou une meilleure efficacité de purification des kits d'extraction par rapport aux autres matrices. Afin de limiter la présence d'inhibiteurs dans les extraits d'ADN, plusieurs options sont envisageables. Dans un premier temps, des facilitateurs tels que l'albumine de sérum bovin ou le polyéthylène glycol peuvent être ajoutés pendant la réaction PCR comme décrit dans la norme NF EN ISO 20838:2006 et dans l'étude de Wong *et al.* (2020). De plus, la dilution des extraits d'ADN peut être réalisée afin de diluer les inhibiteurs de PCR et ainsi minimiser leur impact mais elle s'accompagnera d'une diminution de la sensibilité des réactions de quantification. L'ajout de la souche de *L. monocytogenes* comme contrôle positif de processus dans les échantillons marins a permis de mettre en évidence la présence de faux négatifs mais ne peut pas être appliqué à l'analyse des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les chapitres suivants. En effet, cet ajout dans les différentes matrices fausserait les résultats de quantification du gène *tuf* qui est utilisé pour estimer la concentration bactérienne dans les

échantillons et pour normaliser l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. L'ajout d'un contrôle positif de processus pourrait également poser problème pour la quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens si la souche bactérienne utilisée possède le gène ciblé. Le kit PowerBiofilm® de Qiagen a finalement été sélectionné ayant permis d'extraire de l'ADN en quantité suffisante, de bonne pureté et amplifiable par qPCR avec une faible quantité d'inhibiteurs de PCR.

IV.2. Partie 2 : Optimisation des réactions de qPCR ciblant quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens

Dans la seconde partie de ces travaux, nous avons optimisé des réactions de qPCR ciblant les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA* et *bla_{TEM}* en employant le colorant SYBR Green et les gènes *sul1* et *int11* en utilisant la technologie de sonde TaqMan. Pour cela, nous nous sommes basés sur plusieurs études pour sélectionner des amorces et des sondes qui ont été utilisées par exemple dans la quantification du gène *tetA* dans des produits à base de viande (Lavilla Lerma *et al.*, 2014), du gène *bla_{TEM}* dans des fèces de porcs (Bibbal *et al.*, 2007), du gène *sul1* dans des sols d'agriculture (Heuer and Smalla, 2007) et du gène *int11* dans des effluents d'industries pharmaceutiques (González-Plaza *et al.*, 2019). Etant donné que ces études ont été réalisées avec différents matériels de laboratoire et différentes matrices, une mise au point a été nécessaire. En effet, l'efficacité d'une réaction de qPCR est influencée par différents facteurs tels que les échantillons d'ADN analysés, les réactifs utilisés, les conditions d'amplification et le thermocycleur employé (Bustin *et al.*, 2009a).

Pour la première qPCR ciblant le gène *tetA*, deux pré-mix SYBR Green de différents fabricants ont été comparés en suivant leurs recommandations. En termes d'efficacité d'amplification et de performance de la linéarité, les pré-mix Takara et Roche étaient comparables avec des efficacités entre 75 et 125 % et des coefficients de détermination R^2 supérieurs à 0,9 comme recommandé dans la norme NF U47-600-1:2015. En revanche, nous avons démontré une meilleure sensibilité avec le pré-mix Roche permettant une quantification du gène *tetA* jusqu'à 10^4 UG/ml contre 10^5 UG/ml avec le

pré-mix Takara. Avec ce dernier, une quantification de la souche *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205 dépourvue du gène *tetA* a été observée avec une température de fusion similaire au témoin positif indiquant un produit d'amplification non spécifique. L'analyse génétique de cette souche de *V. parahaemolyticus* a confirmé l'absence du gène *tetA* et de tout gène impliqué dans la résistance aux tétracyclines (données non présentées). De plus, la recherche d'homologies entre les séquences des amorces et la base de données GenBank du NCBI a confirmé la spécificité des amorces avec une homologie de 100 % avec le gène *tetA* dans diverses bactéries comme *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Aeromonas* et *Vibrio* que ce soit au niveau du chromosome ou porté par un plasmide. La mesure de la fluorescence liée à ce produit non spécifique pourrait provenir d'une concentration en amorces ou de conditions non optimales pour ce pré-mix entraînant la formation de dimères d'amorces par exemple. L'ajout d'un solvant organique comme le DMSO (diméthylsulfoxyde) lors de la réaction de qPCR limiterait l'apparition de produits non spécifiques notamment en empêchant la formation de structures secondaires et de dimères d'amorces (Karunanathie *et al.*, 2022). En conclusion, nous avons choisi le pré-mix Roche pour réaliser la suite de l'optimisation des qPCR SYBR Green.

Pour la suite, les amorces ciblant les gènes *tetA* et *bla_{TEM}* ont été testées à plusieurs concentrations dans la gamme indiquée dans les instructions du fabricant du pré-mix. Toutes les concentrations en amorces testées ont permis d'obtenir une bonne efficacité d'amplification de ces gènes. Cependant, plus la concentration en amorces augmentait plus la sensibilité de la qPCR était réduite avec une LQ_{PCR} plus élevée d'un log d'unités génome/ml avec les amorces à 1,0 μM ciblant le gène *tetA*. A la concentration de 1,0 μM , une diminution de la spécificité a également été observée avec l'apparition d'un produit non spécifique dans le témoin eau. Sa présence peut notamment être expliquée par la formation de dimères d'amorces dans les réactions. En effet, lorsqu'une forte concentration en amorces est utilisée, les amorces ont tendance à s'hybrider les unes aux autres et à être amplifiées par l'ADN polymérase. La formation de ces dimères d'amorces peut alors entraîner une diminution de la spécificité et de l'efficacité des réactions de qPCR voire l'apparition de faux positifs (Bustin *et al.*, 2009b). C'est pourquoi une faible concentration en amorces est recommandée lorsque

le colorant SYBR Green est utilisé en qPCR. Ce colorant a l'avantage de ne pas avoir besoin de sondes fluorescentes réduisant ainsi le coût des réactions. En n'utilisant pas de sonde fluorescente, la qPCR employant le colorant SYBR Green permet de détecter un GRA présentant un léger polymorphisme. Par exemple, les amorces choisies pour cibler le gène *bla*_{TEM} dans cette étude présentent une homologie de 100 % avec 242 gènes *bla*_{TEM} pour lesquels la séquence nucléotidique est disponible exceptés *bla*_{TEM-60} et *bla*_{TEM-196} (Bibbal *et al.*, 2007). De plus, le colorant SYBR Green se lie à n'importe quelle molécule d'ADN double brin et produit des signaux de fluorescence pouvant provenir de produits non spécifiques (Denman and McSweeney, 2005). Dans la publication de Lavilla Lerma *et al.* (2014), une concentration de 0,5 µM de ces amorces ciblant le gène *tetA* a été utilisée pour détecter le gène dans des produits à base de viande. Leur qPCR avait une efficacité entre 95 et 103 %, des coefficients R² supérieurs à 0,9 ainsi qu'une sensibilité allant jusqu'à 4 log UG/ml avec un pré-mix et un thermocycleur différents de ceux utilisés dans notre étude. La mise au point de la qPCR ciblant le gène *bla*_{TEM} réalisée par Bibbal *et al.* (2007) a montré qu'une concentration en amorces de 0,2 µM était suffisante pour quantifier le gène *bla*_{TEM} entre 10⁴ et 10¹⁰ UG/ml avec un coefficient R² supérieur à 0,9. Nous avons donc choisi d'utiliser les amorces ciblant les gènes *tetA* et *bla*_{TEM} à une concentration finale de 0,4 µM.

L'optimisation des qPCR utilisant la technologie de sonde TaqMan portait sur le choix d'une concentration en amorces et en sonde optimale pour la quantification des gènes *sul1* et *int11*. L'utilisation de la technologie de sonde TaqMan permet une meilleure spécificité des réactions par rapport au colorant SYBR Green car le signal d'amplification est détecté par dégradation de la sonde par la Taq Polymérase permettant la libération du fluorophore. L'ensemble des concentrations en amorces testées dans cette étude ont permis d'avoir une bonne efficacité d'amplification (entre 75 et 125 %) ainsi qu'une bonne performance de linéarité (R² > 0,9) tant pour la qPCR ciblant le gène *sul1* que pour la qPCR ciblant le gène *int11*. En revanche, la sensibilité était réduite quand les amorces étaient utilisées à une concentration finale de 1,0 µM pour ces deux qPCR de manière similaire aux qPCR utilisant le colorant SYBR Green. La concentration en amorces de 0,4 µM a donc été choisie pour

cibler les gènes *sul1* et *int11* en utilisant la technologie de sonde TaqMan. D'autre part, en faisant varier la concentration de la sonde, nous avons noté des efficacités d'amplification, des performances de linéarité et des sensibilités similaires pour les deux gènes ciblés. Etant donné que les sondes TaqMan sont sensibles et ont tendance à se dégrader pendant les réactions de qPCR, il est important de garder cette sonde en excès dans le mélange réactionnel afin d'assurer une sensibilité maximale (Green and Sambrook, 2018). Pour cette raison, nous avons finalement sélectionné une concentration finale en sonde de 0,2 μM ce qui correspond aux recommandations du fabricant du pré-mix et aux conditions de qPCR retrouvées dans la littérature. En effet, les amorces et la sonde ciblant le gène *sul1* ont été utilisées à une concentration finale de 0,25 μM chacune dans la publication de Heuer and Smalla (2007) qui est à l'origine de la mise au point de cette qPCR. Aucune information n'a été donnée quant à la sensibilité ou l'efficacité de leurs réactions de qPCR mais le gène *sul1* a pu être quantifié dans des ADN extraits à partir d'échantillons de sol. De même, les amorces et la sonde ciblant le gène *int11* mises au point dans la publication de Barraud *et al.* (2010) ont été utilisées à une concentration finale de 0,4 μM et de 0,2 μM , respectivement. Ces concentrations ont permis d'avoir une bonne efficacité d'amplification (97 %), un coefficient R^2 supérieur à 0,9 et une sensibilité comprise entre $2,00 \cdot 10^3$ et $2,00 \cdot 10^{10}$ UG/ml soit des résultats similaires aux nôtres.

V. Conclusion

- Le kit **PowerBiofilm**[®] (Qiagen) a été sélectionné car il a permis d'extraire de l'ADN en **quantité suffisante**, de bonne **pureté** et **amplifiable** par qPCR avec une bonne **élimination des contaminants environnementaux**.
- L'ajout d'un **contrôle positif** de **processus** a été un bon moyen de mettre en évidence la présence d'**inhibiteurs** après l'application de certaines méthodes d'extraction d'ADN.
- La présence d'inhibiteurs a été plus observée dans les extraits d'ADN des **viscères de poissons plats** et de la **chair des mollusques bivalves** quelle que soit la méthode d'extraction d'ADN en comparaison des autres natures d'échantillons.
- Le gène de ménage bactérien *tuf* était un meilleur **marqueur** général de **quantification** de la **population bactérienne** dans l'environnement marin par rapport au gène *rpoB*.
- Le pré-mix LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche) a été sélectionné pour réaliser les **qPCR** utilisant le colorant **SYBR Green** et ciblant les gènes *tetA* et *bla*_{TEM}.
- La concentration des **amorces** jugée optimale pour cibler ces deux gènes était de **0,4 μM**, permettant d'obtenir une **bonne sensibilité** des réactions et d'éviter des réactions non spécifiques liées à la formation de dimères d'amorces.
- Pour les **qPCR** utilisant la technologie de sonde **TaqMan** et ciblant les gènes *sul1* et *int11*, nous avons décidé d'utiliser les **amorces** à une concentration finale de **0,4 μM** et les **sondes** à une concentration de **0,2 μM**.

Chapitre II : Occurrence de gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les eaux de surface

I. Contexte

L'abondance et la diversité des GRA sont bien documentées dans les eaux douces mais peu d'études ont été réalisées dans les eaux marines comme dans la Manche et la Mer du Nord (ANSES, 2020a). Ces deux mers se distinguent des vastes milieux marins et océaniques par la présence de plusieurs pays côtiers comme le Royaume-Uni, la France, la Belgique, les Pays-Bas, l'Allemagne, le Danemark et la Norvège. La Manche et la Mer du Nord sont par conséquent soumises aux nombreux effluents de grands fleuves traversant ces pays tels que la Seine (France), la Tamise (Angleterre) et le Rhin (Pays-Bas) qui peuvent contenir différents GRA pouvant être portés par des BRA. Il est également important de souligner les impacts anthropiques liés aux activités portuaires avec les ports européens du Havre, de Rotterdam et d'Anvers ainsi que le trafic maritime lié aux activités de pêche ou de fret. Le suivi des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* par qPCR (mises au point dans le Chapitre I) dans les eaux de surface marines et d'eau douce permettrait d'obtenir des premières informations sur la contamination de ces milieux par la résistance aux antimicrobiens et d'évaluer l'impact potentiel des rejets d'origine anthropique.

Etudier l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les eaux de surface peut néanmoins être complexe à cause d'étapes pouvant être jugées critiques comme la préparation des échantillons. Dans la littérature, il est indiqué que les échantillons d'eau sont principalement filtrés avec une membrane filtrante de 0,45 μm (Mahon *et al.*, 2019, Na *et al.*, 2014) ou de 0,22 μm (Lu *et al.*, 2019, Xu *et al.*, 2019a) mais aucune information n'est donnée sur une préfiltration des échantillons. Une préfiltration des échantillons d'eau sur un filtre de 1,2 μm peut cependant être nécessaire pour éliminer la matière organique en suspension pouvant agir comme inhibiteur de PCR et éviter le colmatage des filtres de porosité inférieure en filtrant de grands volumes d'eau. La sensibilité des réactions de qPCR pour détecter et quantifier les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens peut également poser problème si la quantité de matériel génétique retenue sur les filtres est insuffisante. Afin de pallier ce seuil de détection, un enrichissement non sélectif des échantillons d'eau peut être réalisé en utilisant par exemple de l'eau peptonée tamponnée

(EPT) et de l'eau peptonée saline alcaline (EPSA) pour revivifier la flore bactérienne présente dans les échantillons avant l'extraction de l'ADN. L'EPT est utilisée dans le développement non sélectif des Enterobactéries stressées à partir de matrices alimentaires selon la norme NF EN ISO 21528-2:2017 et l'EPSA permet de revivifier les bactéries se développant en présence de fortes concentrations en sel comme *Vibrio*.

L'objectif de ces travaux a été d'étudier l'occurrence et la répartition géographique des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les eaux fluviales de la Liane (Boulogne-sur-Mer, France), côtières (Boulogne-sur-Mer/Wimereux) et en pleine mer (Manche/Mer du Nord).

La première partie de cette étude a consisté à mettre au point des protocoles de filtration et d'extraction d'ADN à partir d'échantillons d'eaux fluviales et d'eaux côtières. Pour appliquer le protocole d'extraction d'ADN mis au point dans le Chapitre I aux échantillons d'eau, nous avons préfiltré les échantillons sur une membrane filtrante de 1,2 µm puis nous avons utilisé successivement des membranes filtrantes de porosités 0,45 µm puis de 0,22 µm. Le filtre de porosité 1,2 µm a été utilisé pour éliminer les contaminants de taille supérieure puis les filtres de 0,45 et 0,22 µm ont été analysés séparément afin d'évaluer une perte potentielle de biomasse microbienne et de matériel génétique. Nous avons également réalisé des enrichissements des échantillons d'eau en EPT et en EPSA pour obtenir une croissance et/ou une revivification de la flore bactérienne présente dans les échantillons. Le protocole d'extraction d'ADN réalisé avec le kit PowerBiofilm (Qiagen) sélectionné dans le Chapitre I a été adapté à l'analyse des filtres d'eau afin d'optimiser le rendement et la pureté de l'ADN. L'ADN bactérien a été quantifié par qPCR en ciblant le gène *tuf* afin d'estimer la concentration de la population bactérienne retenue sur les filtres.

La seconde partie de cette étude a porté sur l'application des protocoles de filtration et d'extraction d'ADN validés en première partie à des échantillons d'eau prélevés en pleine mer lors de la campagne océanographique IBTS (International Bottom Trawl Survey). Cette campagne a eu lieu en

janvier 2020 dans la Manche et la Mer du Nord à bord du navire océanographique le Thalassa afin d'évaluer l'abondance et la distribution des stocks de poissons commerciaux (Lazard *et al.*, 2021). Elle est intégrée dans un programme international en coordination avec les pays riverains de la Mer du Nord. Les qPCR ciblant les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* optimisées dans le Chapitre I ont été appliquées aux ADN extraits des filtres et des enrichissements afin d'évaluer l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les eaux fluviales, côtières et de pleine mer. Les travaux de recherche sur l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les eaux marines de la Manche et de la Mer du Nord ont fait l'objet d'une valorisation par une publication dans le journal *Frontiers in Microbiology – Aquatic Microbiology* (Bourdonnais *et al.*, 2022) (Annexe V).

II. Matériel et méthodes

II.1. Prélèvements des échantillons d'eaux fluviales et d'eaux côtières

En avril 2021, des échantillons d'eau de surface ont été prélevés aux alentours de la ville de Boulogne-sur-Mer (France) (Figure 18).

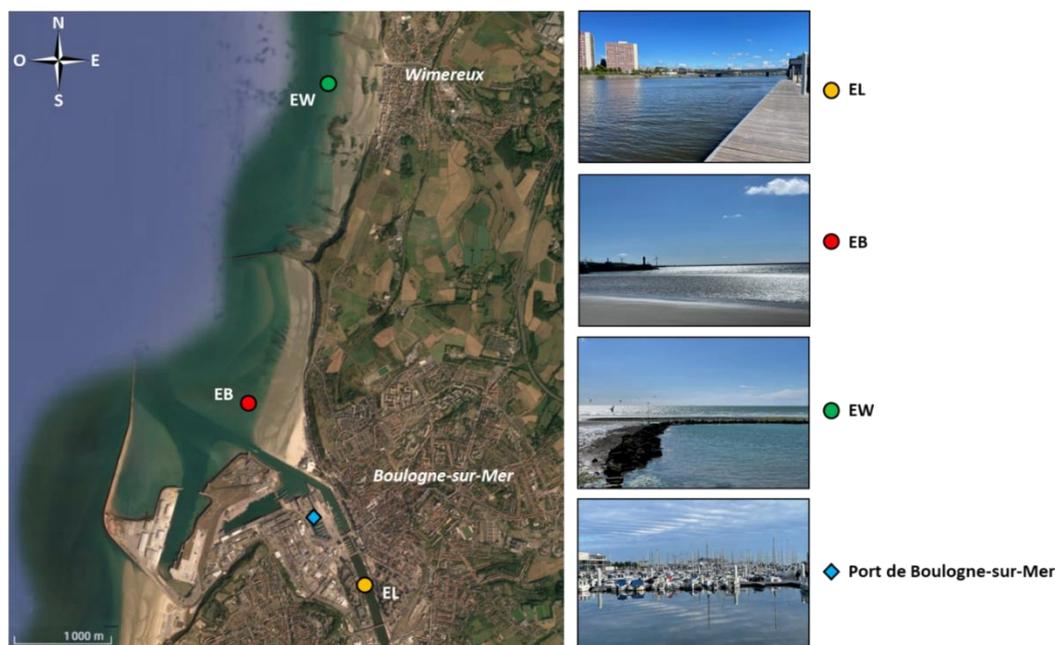


Figure 18 : Localisation des sites de prélèvements des échantillons d'eaux fluviales et d'eaux côtières à proximité de Boulogne-sur-Mer (France). EL : eau de la Liane ; EB : eau de la plage de Boulogne-sur-Mer ; EW : eau de la plage de Wimereux.

Le prélèvement d'eau fluviale a été réalisé dans la Liane (EL), un fleuve d'environ 40 km de long qui prend sa source à Quesques (une petite commune située à 25 km de Boulogne-sur-Mer) et traverse 19 communes dont la ville de Boulogne-sur-Mer avant de se jeter dans la Manche. Cet échantillon d'eau a été prélevé à proximité d'un stade nautique où sont pratiquées des activités récréatives, à environ 2,5 km en amont de l'embouchure. Les prélèvements d'eaux côtières ont été réalisés au niveau de la plage de Boulogne-sur-Mer (EB) et de la plage de Wimereux (EW). Le point de prélèvement EB était situé à l'Est de l'embouchure de la Liane et du port de Boulogne-sur-Mer et est caractérisé par des activités récréatives de baignade et de sports nautiques. Le point de prélèvement EW était situé à la plage de Wimereux à environ 3,5 km au nord de la plage de Boulogne-sur-Mer et à 500 m au sud de l'embouchure du Wimereux, un fleuve côtier qui se jette dans la Manche. Ces eaux côtières sont également soumises aux diverses activités récréatives ainsi qu'à une forte fréquentation durant la saison estivale. Environ 2 L d'eau ont été prélevés à la surface pour les trois sites d'échantillonnage à une profondeur d'environ 10 cm à l'aide de bidons stérilisés. Ces échantillons ont été placés dans une glacière puis transportés au laboratoire à une température de 4 °C et traités le lendemain.

II.2. Prélèvements des échantillons d'eau de mer (campagne IBTS 2020)

Dans le cadre de ces travaux, nous avons prélevé 36 échantillons d'eau de mer dans la Manche Est et la Mer du Nord selon le plan d'échantillonnage représenté en Figure 19. Ces prélèvements ont été réalisés à bord du Thalassa (Figure 20A) à l'aide d'une bouteille Niskin (Figure 20B) à une profondeur d'environ 30 mètres. Environ 600 ml d'eau de mer ont été prélevés à chaque station d'échantillonnage notées « Yxxxx » et géographiquement distribuées à raison d'une station par carré statistique. La Manche et la Mer du Nord ont été divisées en carrés statistiques d'environ 1 degré de longitude × 0,5 degré de latitude afin de centraliser les résultats obtenus par les pays participants lors des campagnes océanographiques dans ces eaux. Nous avons regroupé ces carrés statistiques en zones définies comme la Manche Est (ME ; n = 5 prélèvements), l'Embouchure de la Tamise (ET ; n = 6 prélèvements), la Côte Est de l'Angleterre (CEA ; n = 7 prélèvements), le Centre de la Mer du Nord (CMN ; n = 8 prélèvements), la Côte Ouest des Pays-Bas (COP ; n = 7 prélèvements) et la Côte du Nord

des Pays-Bas (CNP ; n = 3 prélèvements). Les informations sur la localisation des stations de prélèvement sont résumées en Annexe VI. Les échantillons ont été conservés dans une chambre froide à - 20 °C à bord du navire avant d’être transportés dans une glacière puis acheminés au laboratoire où ils ont été stockés à - 20 °C jusqu’à leur analyse.

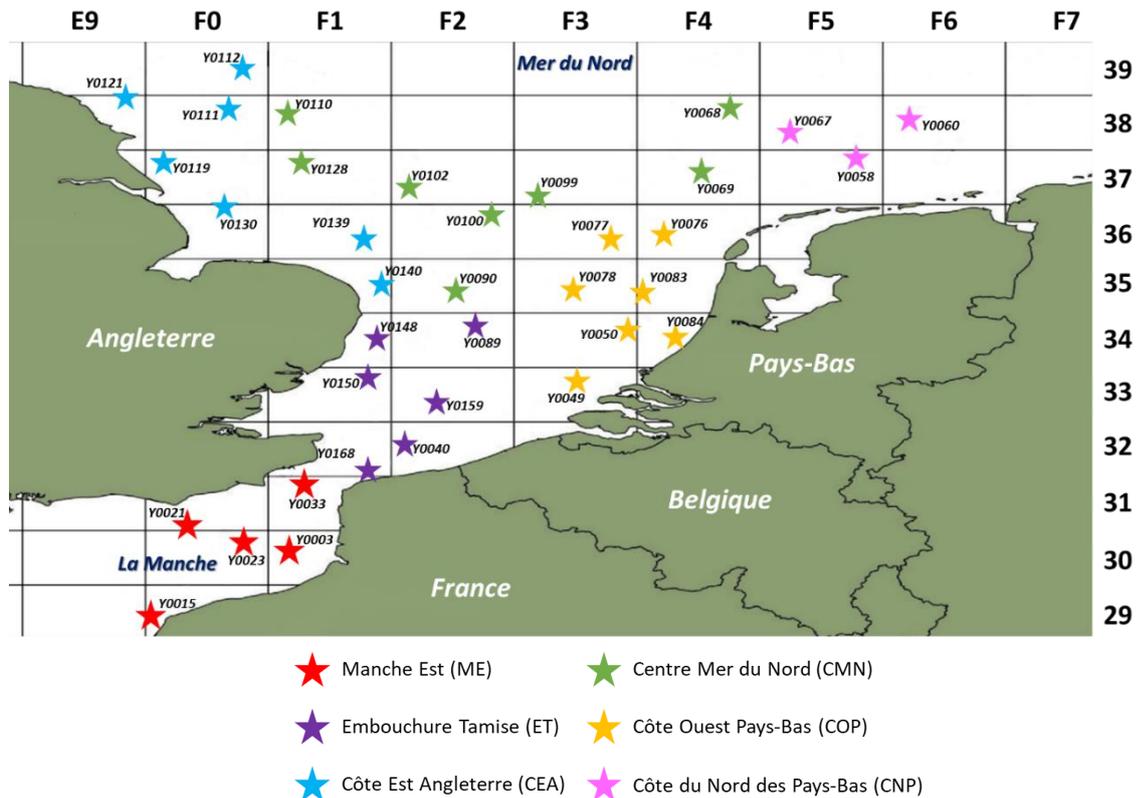


Figure 19 : Carte d'échantillonnage des prélèvements d'eau de mer réalisés lors de la campagne océanographique IBTS 2020 dans la Manche et la Mer du Nord. Yxxxx : numéro de station de prélèvement.

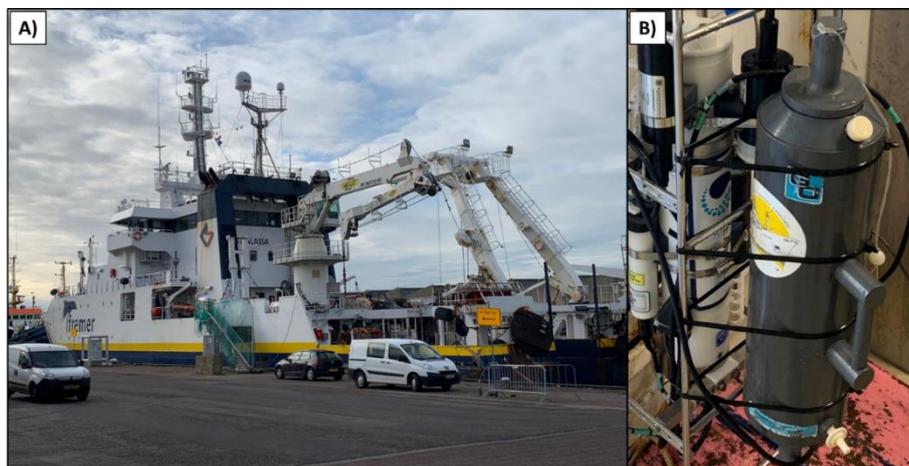


Figure 20 : Campagne océanographique International Bottom Trawl Survey (IBTS 2020) A) Le Thalassa, navire océanographique de l'Ifremer, B) Bouteille Niskin utilisée pour le prélèvement des échantillons d'eau de mer.

II.3. Enrichissements des échantillons

Les échantillons d'eau de la Manche/Mer du Nord ont été décongelés à température ambiante. A partir des échantillons d'eaux côtières, fluviales et de la Manche/Mer du Nord, un aliquot d'un millilitre a été préparé pour chaque prélèvement d'eau afin de réaliser des enrichissements. Des dilutions au 1/2 des échantillons ont été réalisées avec 500 µl d'eau peptonée tamponnée (EPT, Oxoid, Dardilly, France) ou 500 µl d'eau peptonée saline alcaline (EPSA, Oxoid) puis incubées pendant 48 h à 30 °C avant de faire les extractions d'ADN.

II.4. Filtration des échantillons d'eau

Chaque échantillon d'eau fluviale et d'eau côtière a été homogénéisé puis divisé en trois triplicats de 600 ml. Etant donné le volume d'eau prélevé pendant la campagne IBTS, une seule filtration a été réalisée par échantillon. Les échantillons ont été filtrés sous vide successivement à travers des membranes filtrantes en nitrocellulose de diamètre 47 mm et de porosités 1,2 µm puis 0,45 µm et enfin 0,22 µm (Millipore, Burlington, Massachusetts, Etats-Unis). Pour cela, nous avons utilisé un système de porte-filtres réutilisable Nalgene (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) fixé sur une bouteille de 1 L stérilisée et relié à une pompe à vide. Une fois la totalité de l'échantillon passé à travers les trois membranes filtrantes, chaque filtre de 0,45 et de 0,22 µm a été récupéré à l'aide de pinces stérilisées et placé dans une boîte de Petri. Les filtres ont ensuite été coupés en fines lamelles d'environ 1 mm avec un scalpel stérilisé comme indiqué dans la publication de Thomsen *et al.* (2012) puis transférées dans un cryotube et conservées à -20 °C jusqu'à l'extraction d'ADN.

II.5. Extraction de l'ADN total à partir des filtres et des enrichissements d'eau

L'ADN total a été extrait indépendamment à partir des lamelles des filtres de porosités 0,45 µm et 0,22 µm décongelées à température ambiante pour tous les échantillons d'eau. Le filtre de porosité 1,2 µm n'a pas été analysé dans cette étude. Pour réaliser les extractions d'ADN, nous avons utilisé le kit DNeasy® PowerBiofilm® (Qiagen, Hilden, Allemagne) qui a été sélectionné lors de l'étude de

comparaison des méthodes d'extraction d'ADN dans le Chapitre I. Pour les échantillons d'eau de mer prélevés lors de la campagne IBTS, les extraits d'ADN qui ont été obtenus à partir des filtres de porosités 0,22 µm et 0,45 µm ont été poolés.

Les extractions d'ADN total à partir des enrichissements en EPT et en EPSA des échantillons d'eau ont également été réalisées avec le kit PowerBiofilm®. Les bouillons d'enrichissement ont été centrifugés pendant 3 min à 13 000 rpm, le culot a été resuspendu dans 400 µl de solution MBL et 100 µl de solution FB puis cette solution a été transférée dans un tube à billes. Le protocole du Chapitre I partie II.1.D a ensuite été suivi.

Le protocole d'extraction utilisé dans le Chapitre I partie II.1.D a été modifié en s'inspirant de la publication de Djurhuus *et al.* (2017) pour être adapté aux membranes filtrantes. De ce fait, les lamelles des filtres ont été transférées de manière stérile dans les tubes à billes fournis dans le kit PowerBiofilm®. Ensuite, 700 µl de solution MBL préchauffée à 55 °C et 200 µl de solution FB ont été ajoutés aux tubes avant de les agiter horizontalement pendant 45 sec à l'aide d'un adaptateur pour agitateur et de les incuber pendant 30 min à 56 °C. Un second cycle d'agitation et d'incubation a été réalisé. Suite à ces incubations, 100 µl de protéinase K (2 mg/ml) ont été ajoutés suivi d'une nouvelle incubation des tubes à 56 °C pendant 30 min. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 1 min à 6 000 rpm. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube en prenant soin d'écraser les lamelles de filtre avec le cône de la pipette pour prélever l'intégralité du volume. Ces tubes ont été centrifugés pendant 1 min à 13 000 rpm. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube dans lequel 200 µl de solution IRS ont été ajoutés avant d'être incubé à 4 °C pendant 5 min. Après une centrifugation à 14 000 rpm pendant 1 min, 900 µl de solution MR ont été ajoutés au surnageant. Cette solution a été chargée sur la colonne et centrifugée pendant 1 min à 14 000 rpm. La colonne a ensuite été lavée avec 650 µl de solution PW et 650 µl d'éthanol absolu en réalisant une centrifugation pendant 1 min à 14 000 rpm entre chaque lavage. Finalement, la membrane de la colonne a été séchée par une

centrifugation à 14 000 rpm pendant 2 min et l'ADN a été élué en ajoutant deux fois 30 µl de solution EB.

Les échantillons d'ADN ont été dosés et leur pureté a été estimée avec le ratio d'absorbance A260nm/A280nm à l'aide d'un spectrophotomètre DS-11 (Denovix, Wilmington, Etats-Unis). L'ADN était considéré comme pur lorsque le ratio était compris entre 1,8 et 2,0. Les échantillons d'ADN ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse par qPCR.

II.6. Quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1*, *int11* et de la population bactérienne par le gène *tuf*

Les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* ainsi que le gène de ménage bactérien *tuf* ont été quantifiés par les techniques de qPCR développées et optimisées dans le Chapitre I partie III.1.C. Les séquences des amorces et des sondes sont indiquées dans le Tableau 17. La qPCR ciblant le gène *tuf* a été adaptée afin d'utiliser le pré-mix de Roche comme pour les qPCR ciblant les gènes *tetA* et *bla_{TEM}* plutôt que le pré-mix Takara. De plus, nous avons choisi d'utiliser 5 µl d'extrait d'ADN au lieu de 2 µl pour les qPCR ciblant les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens afin d'augmenter le seuil de sensibilité de la méthode.

Tableau 17 : Amorces et sondes utilisées pour la quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et la population bactérienne par qPCR.

Technologies	Gènes ciblés	Amorces/Sondes	Séquences nucléotidiques (5' – 3')	Références
Colorant SYBR Green	<i>tuf</i>	tuf-F	ACHGGHRTHGARATGTTCCG	(Tanaka <i>et al.</i> , 2010)
		tuf-R	GTTDTCRCCHGGCATNACCAT	
	<i>tetA</i>	tetA-F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	(Ng <i>et al.</i> , 2001)
		tetA-R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
	<i>bla_{TEM}</i>	blaTEM-F	TTCCTGTTTTGCTCACCCAG	(Bibbal <i>et al.</i> , 2007)
		blaTEM-R	CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	
Sonde TaqMan	<i>sul1</i>	sul1-F	CCGTTGGCCTTCTGTAAAG	(Heuer and Smalla, 2007)
		sul1-R	TTGCCGATCGCGTGAAGT	
		sul1-sonde	(FAM)CAGCGAGCCTTGCGGCGG(TAMRA)	
	<i>int11</i>	int11-F	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	(Barraud <i>et al.</i> , 2010)
		int11-R	GATCGGTCGAATGCGTGT	
		int11-sonde	(6-FAM)ATTCCTGGCCGTGGTTCTGGGTTTT(BHQ1)	

Pour rappel, le mélange réactionnel pour les qPCR utilisant le colorant SYBR Green a été réalisé dans un volume final de 20 μ l. Il était composé de 10 μ l de LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Rotkreuz, Suisse), des amorces à 0,4 μ M (Eurobio, Les Ulis, France), de l'échantillon d'ADN (2 μ l pour la quantification du gène *tuf* ou 5 μ l pour la quantification des gènes *tetA* et *bla_{TEM}*) et d'eau nuclease-free (Qiagen) pour compléter le volume final à 20 μ l. Concernant les qPCR utilisant la technologie TaqMan (ciblant les gènes *sul1* et *int11*), le mélange réactionnel a été réalisé dans un volume de 20 μ l et contenait 10 μ l de LightCycler® 480 Probes Master (Roche), les amorces à 0,4 μ M, la sonde à 0,2 μ M (Eurobio), 5 μ l d'ADN et de l'eau nuclease-free pour compléter le volume réactionnel.

Comme indiqué dans le Chapitre I partie III.1.A, les plasmides pRP4, pIP69, pR1 et pTRC99A ont servi à la réalisation des gammes étalon pour quantifier les gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11*, respectivement (Tableau 18). Leur ADN a été extrait à partir de 10 ml de culture de nuit d'*E. coli* contenant le plasmide d'intérêt avec le kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Cet ADN a été dosé au spectrophotomètre, dilué dans de l'eau nuclease-free pour obtenir une concentration initiale en plasmide de $1,00 \cdot 10^{11}$ UG/ml puis dilué successivement au 1/10 pour avoir une gamme étalon allant de $1,00 \cdot 10^{11}$ UG/ml à $1,00 \cdot 10^3$ UG/ml. Les souches de *V. parahaemolyticus* ayant servi de témoins positifs et négatifs sont décrites dans le Tableau 18. Leur ADN a été extrait à partir de quelques colonies isolées sur une gélose nutritive salée à 1 % avec du NaCl (GNS, BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis) à l'aide du kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) selon le protocole détaillé dans le Chapitre I partie III.1.B. Concernant la réaction de qPCR ciblant le gène bactérien *tuf*, nous avons utilisé l'ADN génomique de la souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 pour réaliser la gamme étalon. L'ADN de cette souche a été dilué une première fois pour obtenir une concentration initiale de $1,00 \cdot 10^9$ UG/ml puis dilué successivement au 1/10 pour avoir une gamme étalon allant de $1,00 \cdot 10^9$ à $1,00 \cdot 10^3$ UG/ml. Ces réactions de qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur LightCycler® 480 (Roche) selon les conditions décrites dans le Tableau 19. Les valeurs de Cq ont été calculées automatiquement par le logiciel LightCycler® 480 en utilisant la méthode de la dérivée seconde.

Tableau 18 : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans les réactions de qPCR.

	<i>tuf</i>	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>int11</i>
Gamme étalon	V. <i>parahaemolyticus</i> 16-B3PA-0006	pRP4	pIP69	pR1	pTRC99A
Témoin (+)	V. <i>parahaemolyticus</i> 16-B3PA-0006	V. <i>parahaemolyticus</i> 16-B3PA-0006	pIP69	V. <i>parahaemolyticus</i> 16-B3PA-0006	V. <i>parahaemolyticus</i> 16-B3PA-0006
Témoin (-)	H ₂ O	V. <i>parahaemolyticus</i> 15-B3PA-0205	V. <i>parahaemolyticus</i> 12-B3PA-1629	V. <i>parahaemolyticus</i> 15-B3PA-0205	V. <i>parahaemolyticus</i> 13-B3PA-2931

Tableau 19 : Conditions appliquées pour les réactions de qPCR en SYBR Green et en TaqMan.

Gène ciblé	Conditions de qPCR	
<i>tuf</i>	Dénaturation	95 °C – 5 min
	Amplification (45 cycles)	95 °C – 10 sec ; 60 °C – 30 sec ; 72 °C – 15 sec
	Fusion	95 °C – 5 sec ; 65 °C – 1 min
<i>tetA</i> <i>bla</i> _{TEM}	Dénaturation	95 °C – 5 min
	Amplification (45 cycles)	95 °C – 10 sec ; 60 °C – 30 sec ; 72 °C – 5 sec
	Fusion	95 °C – 5 sec ; 65 °C – 1 min
<i>sul1</i> <i>int11</i>	Dénaturation	95 °C – 5 min
	Amplification (45 cycles)	95 °C – 10 sec ; 60 °C – 1 min ; 72 °C – 1 sec

II.7. Analyses des données et traitements statistiques

Les critères suivants ont été suivis afin de valider les résultats des qPCR selon les normes NF U47-600-1:2015 et U47-600-2:2015 : l'efficacité d'amplification devait être comprise entre 75 et 125 %, le coefficient de détermination R² devait être supérieur à 0,99 et la valeur de Cq du témoin négatif devait être en dehors de la limite de quantification de la qPCR. Les courbes standards sont présentées en Annexe VII et Annexe VIII.

La concentration d'un gène, notée x et exprimée en copies/ml d'ADN, a été calculée grâce à l'équation suivante :

$$x = 10^{\frac{y-b}{a}}$$

avec y la valeur de Cq, a la pente de la droite et b l'ordonnée à l'origine.

L'abondance absolue des gènes a été calculée et correspondait au nombre de copies du gène par litre d'eau. Pour cela, le nombre de copies du gène calculé grâce à la courbe standard a été divisé par le volume d'eau filtré. L'abondance relative a également été calculée et permettait d'évaluer la proportion relative des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens parmi la population bactérienne présente dans l'échantillon. Pour cela, nous avons normalisé les résultats d'abondances absolues des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens avec ceux du gène bactérien *tuf*. Cette abondance relative était donc sans unité (Zhang *et al.*, 2018).

Nous avons validé la méthode de filtration et d'extraction d'ADN si la concentration en ADN extrait était supérieure à 10 ng/μl. Nous avons réalisé un test T de Student pour échantillons appariés afin de comparer l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène *tuf* entre les filtres 0,22 et 0,45 μm pour les échantillons d'eaux fluviales et côtières. Pour cela, l'égalité des variances a dans un premier temps été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Si la différence était significative ($p < 0,05$), nous avons considéré que l'information génétique extrait du filtre de 0,22 μm était négligeable par rapport à celle du filtre de 0,45 μm. Les « Heat Map » ont été réalisées avec le logiciel RStudio version 1.4.1717 (RStudio, Inc, Boston, Etats-Unis) grâce au package ggplot2.

III. Résultats

III.1. Validation des protocoles de filtration d'eau et d'extraction d'ADN

Dans un premier temps, un protocole de filtration et d'extraction d'ADN a été mis au point et appliqué à des échantillons d'eau de surface, à savoir de l'eau fluviale et des eaux côtières. L'ADN a été extrait puis dosé à partir des filtres de porosités 0,45 et 0,22 μm (Figure 21). Les protocoles de filtration et d'extraction d'ADN ont été validés pour les filtres de 0,45 μm avec lesquels nous avons extrait en moyenne plus de 10 ng/μl d'ADN pour les trois échantillons d'eau. En revanche, nous avons observé des concentrations d'ADN inférieures à 10 ng/μl pour les filtres de 0,22 μm. Cela montre que le filtre de 0,45 μm a retenu seulement une partie de la biomasse microbienne puis qu'une autre partie a été retenue sur le filtre de 0,22 μm. Le ratio d'absorbance A260nm/A280nm mesuré pour ces

échantillons était en moyenne de $2,07 \pm 0,2$ pour les ADN extraits des filtres de $0,45 \mu\text{m}$ et de $2,45 \pm 0,6$ pour les ADN extraits des filtres de $0,22 \mu\text{m}$ (données non montrées). Les échantillons d'ADN extraits des filtres de $0,45 \mu\text{m}$ étaient donc de meilleure pureté que ceux extraits des filtres de $0,22 \mu\text{m}$. Les contaminants présents dans les échantillons avaient donc potentiellement une taille inférieure à $0,45 \mu\text{m}$ et se sont concentrés sur le filtre de $0,22 \mu\text{m}$.

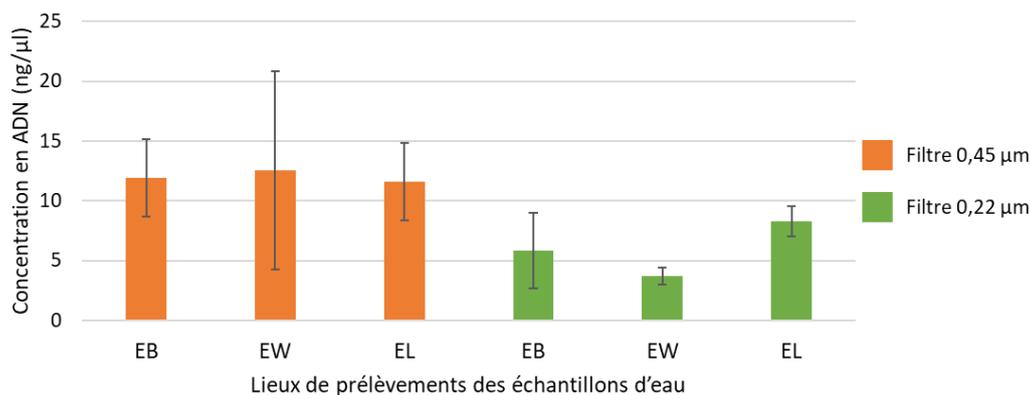


Figure 21 : Concentration des extraits d'ADN issus de la filtration des échantillons d'eau sans enrichissement ($n=3$). Les barres d'erreur représentent la variabilité des concentrations d'ADN autour de la moyenne. EB : eau de la plage de Boulogne-sur-Mer ; EW : eau de la plage de Wimereux ; EL : eau de la Liane.

Après un enrichissement des échantillons d'eau en EPT et en EPSA, nous avons observé que les concentrations en ADN extraits étaient supérieures à celles obtenues directement à partir des filtres (Figure 22). Nous avons observé une concentration en ADN trois fois plus élevée en réalisant l'extraction à partir de l'enrichissement en EPT que celui en EPSA pour l'échantillon d'eau de la Liane. Pour les échantillons d'eau des plages de Boulogne-sur-Mer et de Wimereux, les concentrations d'ADN étaient similaires entre les enrichissements en EPT et en EPSA. Ces résultats ont montré qu'avec un enrichissement en EPT et EPSA, certaines bactéries présentes dans les échantillons se sont développées.

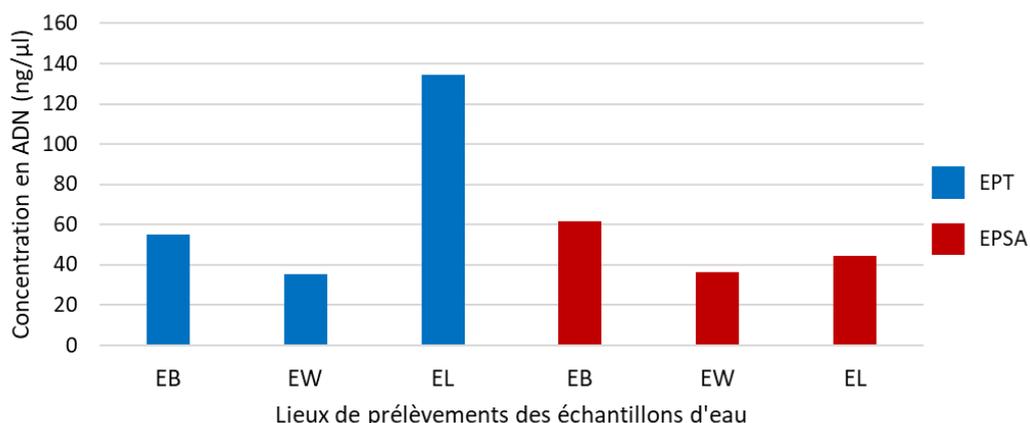


Figure 22 : Concentration des extraits d'ADN après un enrichissement des échantillons d'eau en EPT et en EPSA (n=1). EB : eau de la plage de Boulogne-sur-Mer ; EW : eau de la plage de Wimereux ; EL : eau de la Liane.

Ensuite, nous avons ciblé le gène de ménage bactérien *tuf* dans l'ensemble des échantillons filtrés afin de quantifier la population bactérienne retenue sur les filtres de 0,45 μm puis sur ceux de 0,22 μm (Figure 23). Nous avons observé une abondance absolue du gène *tuf* comprise entre 7,9 et 8,2 log copies/L d'eau pour les filtres de 0,45 μm et entre 7,1 et 7,8 log copies/L d'eau pour les filtres de 0,22 μm. En réalisant un test de Student, l'abondance absolue du gène *tuf* quantifiée à partir des filtres de 0,45 μm s'est révélée être significativement différente de celle quantifiée à partir des filtres de 0,22 μm. Nous en avons donc conclu que la quantité de bactéries récupérée sur le filtre de 0,22 μm était moins importante que celle retrouvée sur le filtre de 0,45 μm mais non négligeable au vu de l'abondance observée.

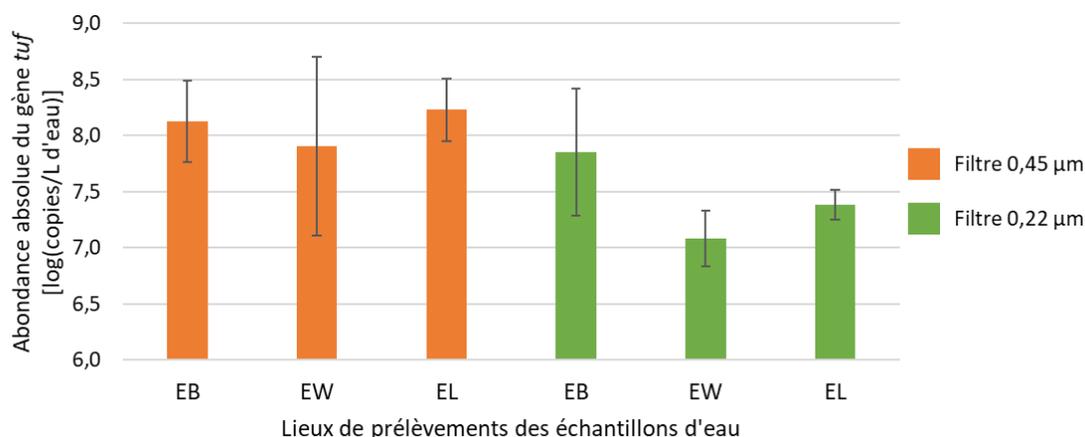


Figure 23 : Abondance absolue du gène *tuf* dans les échantillons d'ADN extraits des filtres de 0,45 et 0,22 μm (n=3). Les barres d'erreur représentent la variabilité de l'abondance absolue du gène *tuf* autour de la moyenne. EB : eau de la plage de Boulogne-sur-Mer ; EW : eau de la plage de Wimereux ; EL : eau de la Liane.

III.2. Occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les eaux fluviales et côtières

Nous avons par la suite ciblé les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* par qPCR à partir des échantillons filtrés pour déterminer leur prévalence et leur abondance absolue (Tableau 20). Dans ces eaux fluviales et côtières, les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens avaient une prévalence globale de 83,3 %.

Dans la Liane, nous avons détecté les quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les enrichissements en EPT et en EPSA excepté le gène *bla_{TEM}* dans l'enrichissement en EPSA. De plus, les gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* ont été quantifiés dans tous les extraits d'ADN des filtres de 0,45 µm et 0,22 µm pour cet échantillon d'eau avec des abondances absolues comprises entre 4,8 et 8,1 log copies/L.

Le gène *bla_{TEM}* n'a pas été détecté dans l'eau de la plage de Boulogne-sur-Mer. A partir des différents enrichissements de cet échantillon d'eau, seul le gène *sul1* a été détecté dans l'enrichissement en EPSA. Nous avons observé des abondances absolues de l'ordre de 4,8 à 6,1 log copies/L pour les gènes *tetA*, *sul1* et *int11*.

Nous n'avons également pas détecté le gène *bla_{TEM}* dans l'eau de la plage de Wimereux. L'enrichissement de l'échantillon d'eau de la plage de Wimereux en EPT a permis de détecter le gène *tetA* qui n'était pas directement quantifiable à partir des deux filtres 0,22 et 0,45 µm sans enrichissement. De plus, le gène *int11* n'a été quantifié qu'avec le filtre de 0,45 µm et n'a pas été détecté dans les enrichissements en EPT/EPSA. L'abondance absolue des gènes *sul1* et *int11* était comprise entre 4,6 et 5,2 log copies/L d'eau soit une abondance de 3 log inférieure à l'eau de la Liane et d'un log inférieure à l'eau de la plage de Boulogne-sur-Mer.

Pour l'ensemble de ces échantillons d'eaux fluviales et côtières, l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens pour le filtre de 0,45 µm était en moyenne d'un demi log supérieure à celle du filtre de 0,22 µm. Ces données ont montré que malgré une première filtration

avec les filtres de 0,45 μm , des abondances absolues élevées des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ont pu être observées sur les filtres de 0,22 μm . Des bactéries de taille inférieure à 0,45 μm étaient donc potentiellement porteuses de ces gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et se sont concentrées sur le filtre de 0,22 μm . De plus, nous avons constaté une diminution de l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens entre la Liane, la plage de Boulogne-sur-Mer et celle de Wimereux qui pouvait s'apparenter à un phénomène de dilution.

Tableau 20 : Détection et quantification (log copies/L d'eau) des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons d'eau de la Liane (EL), de la plage de Boulogne-sur-Mer (EB) et de la plage de Wimereux (EW) après enrichissement en EPT/EP SA et sans enrichissement. Vert : présence ; orange : absence.

		Lieux de prélèvements	EL	EB	EW
<i>tetA</i>	Détection	EPT			
		EP SA			
	Abondance absolue	0,45 μm	6,23 \pm 0,1	4,78 \pm 0,2	
		0,22 μm	5,72 \pm 0,1	4,75	
<i>bla_{TEM}</i>	Détection	EPT			
		EP SA			
	Abondance absolue	0,45 μm	5,34 \pm 0,3		
		0,22 μm	4,75 \pm 0,3		
<i>sul1</i>	Détection	EPT			
		EP SA			
	Abondance absolue	0,45 μm	8,13 \pm 0,03	6,08 \pm 0,4	5,18 \pm 0,5
		0,22 μm	7,69 \pm 0,4	5,68 \pm 0,7	4,63 \pm 0,3
<i>int11</i>	Détection	EPT			
		EP SA			
	Abondance absolue	0,45 μm	7,78 \pm 0,1	5,50 \pm 0,3	4,82 \pm 0,4
		0,22 μm	7,08 \pm 0,4	5,07 \pm 1,1	

Pour estimer la proportion des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens au sein de la population microbienne présente dans les échantillons d'eau, nous avons calculé l'abondance relative de ces gènes en normalisant leur abondance absolue par l'abondance absolue du gène bactérien *tuf* (Figure 24). L'abondance relative des gènes *sul1* et *int11* était la plus élevée dans les échantillons d'eau de la Liane. Au sein des mêmes échantillons, l'abondance relative du gène *tetA* était comprise entre -1,7 et -1,9 et l'abondance relative du gène *bla_{TEM}* entre -2,8 et -2,6. L'abondance relative des gènes *sul1* et *int11* était similaire entre les échantillons d'eau de la plage de Wimereux et

de Boulogne-sur-Mer. L'ensemble de ces résultats avaient une tendance similaire aux abondances absolues indiquant que l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens évoluait dans le même sens que celle des bactéries quantifiées par le gène *tuf*.

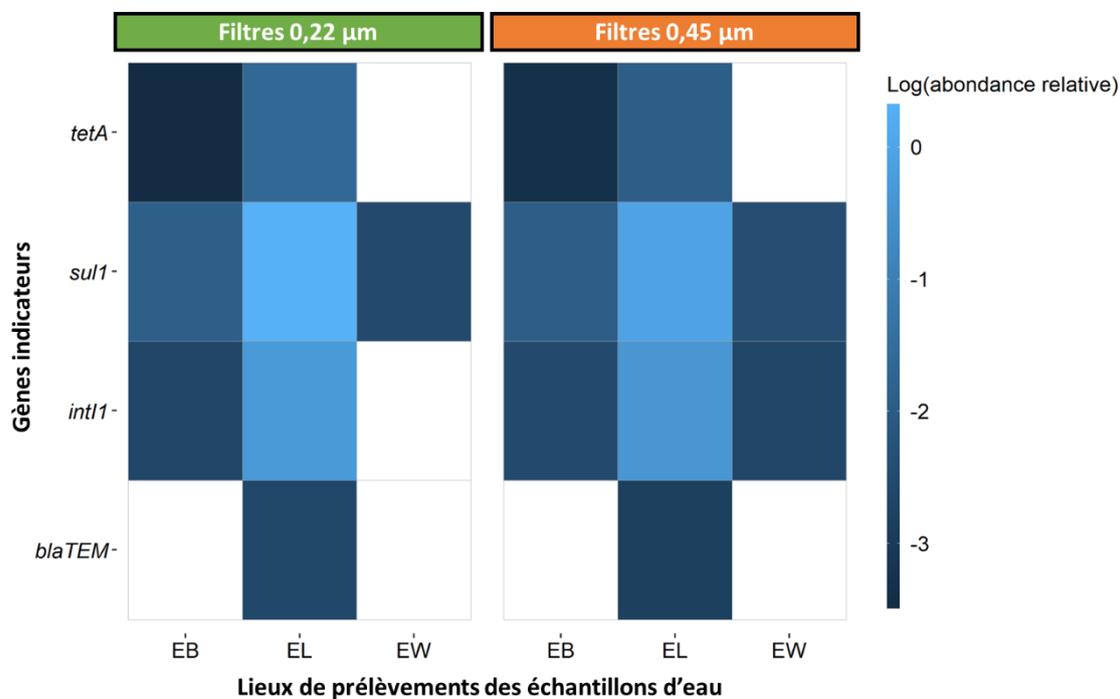


Figure 24 : Abondance relative des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int1* dans les échantillons d'eaux fluviales et côtières en fonction du filtre utilisé. EB : eau de la plage de Boulogne-sur-Mer ; EW : eau de la plage de Wimereux ; EL : eau de la Liane.

En considérant l'ensemble de ces résultats, nous avons validé le protocole de filtration d'eau et d'extraction d'ADN à partir des filtres de 0,45 µm et de 0,22 µm pour la suite de l'étude. Nous avons validé que l'analyse du filtre de 0,22 µm en plus du filtre de 0,45 µm était essentielle pour récolter un maximum de matériel génétique présent dans les échantillons d'eau. C'est pourquoi les échantillons d'ADN extraits des deux filtres ont été poolés en un échantillon unique afin de faciliter les analyses moléculaires sur les prélèvements d'eau réalisés dans la Manche et la Mer du Nord. De plus, l'enrichissement non sélectif des échantillons d'eau en EPT/EPSCA a permis de revivifier et de développer les bactéries présentes dans l'eau pour rendre détectables les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens qui avaient un nombre de copies trop faible pour être directement

quantifié par qPCR. L'utilisation de ces deux bouillons d'enrichissement pour les échantillons d'eau a donc été validée pour récupérer une plus grande diversité bactérienne.

III.3. Occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène *tuf* dans la Manche et la Mer du Nord

Nous avons étudié l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans la Manche et la Mer du Nord (Tableau 21). La prévalence globale de ces gènes dans les échantillons d'eau de mer était de 72,2 %. Les prévalences des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens étaient de 8,3 % pour le gène *tetA*, de 47,2 % pour le gène *sul1* et de 50 % pour le gène *int11*. Le gène *bla_{TEM}* n'a pas été détecté ou quantifié dans les échantillons d'eau de mer. Une co-occurrence des gènes *tetA*, *sul1* et *int11* a été observée dans 1/36 échantillons près de la Côte Ouest des Pays-Bas avec des abondances absolues comprises entre 5,2 et 6,5 log copies/L d'eau. Nous avons également observé une cooccurrence des gènes *sul1* et *int11* dans 9/36 échantillons d'eau dont 5 échantillons prélevés dans la zone de la Côte Ouest des Pays-Bas. Le gène *tetA* a été détecté dans 3/36 échantillons dans la Manche Est, l'Embouchure de la Tamise et la Côte Ouest des Pays-Bas.

Nous avons observé le gène *sul1* dans toutes les zones définies excepté dans la Manche Est. La prévalence la plus élevée de ce gène a été observée dans la zone de la Côte Ouest des Pays-Bas (71,4 %) et la plus faible dans le Centre de la Mer du Nord (37,5 %) et près de la Côte Est de l'Angleterre (42,9 %). Ce gène a été peu détecté dans les enrichissements en EPT (2/36) et en EPSA (2/36) mais a été quantifié dans 15/36 échantillons avec des abondances absolues de l'ordre de 4,5 à 6,5 log copies/L d'eau. Le gène *int11* a été détecté dans toutes les zones définies dans la Manche et la Mer du Nord avec une prévalence de 100 % dans la Manche Est. Similairement au gène *sul1*, les prévalences les plus faibles du gène *int11* ont été observées dans le Centre de la Mer du Nord (25 %) et près de la Côte Est de l'Angleterre (28,6 %). Ce gène a été détecté dans 80 % des enrichissements en EPT/EPSA des échantillons prélevés dans la Manche Est. Nous avons pu quantifier le gène *int11* dans toutes les zones définies (11/36 échantillons) excepté près de la Côte du Nord des Pays-Bas et à l'Embouchure de la Tamise. L'abondance absolue de ce gène était comprise entre 4,5 et 6,3 log copies/L d'eau, les

abondances les plus élevées ayant été observées dans la zone de la Côte Ouest des Pays-Bas (6,1 et 6,3 log copies/L).

Tableau 21 : Détection et quantification (log copies/L d'eau) des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons d'eau de mer (EM) après un enrichissement en EPT/EP SA et sans enrichissement. Vert : présence ; orange : absence. Ech : échantillon. CEA : Côte Est de l'Angleterre ; CMN : Centre de la Mer du Nord ; CNP : Côte du Nord des Pays-Bas ; COP : Côte Ouest des Pays-Bas ; ET : Embouchure de la Tamise ; ME : Manche Est. AA : abondance absolue.

Zone	Ech.	<i>tetA</i>			<i>bla_{TEM}</i>			<i>sul1</i>			<i>int11</i>		
		Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA
		EPT	EP SA		EPT	EP SA		EPT	EP SA		EPT	EP SA	
CEA	EM25												
	EM26												
	EM27									4,5			
	EM28												
	EM30									4,6			4,7
	EM31												4,6
CMN	EM12												
	EM13												
	EM20									4,6			4,6
	EM21												
	EM22												
	EM23												
	EM24									4,7			
CNP	EM09									4,7			
	EM10												
	EM11									4,8			
COP	EM07									4,8			4,7
	EM08									4,8			4,6
	EM14												
	EM15			5,2						6,5			6,1
	EM16									4,5			4,9
	EM18									6,0			6,3
ET	EM06									4,6			
	EM19												
	EM33												
	EM34									4,5			
	EM35									4,6			
	EM36									4,8			
ME	EM01												4,5
	EM02												5,2
	EM03												
	EM04												4,7
	EM05												

Le gène bactérien *tuf* a également été quantifié afin de calculer la concentration bactérienne dans ces échantillons d'eau de mer. Nous avons pu quantifier ce gène dans l'ensemble des échantillons d'eau analysés avec des abondances absolues comprises entre 6,4 et 8,0 log copies/L d'eau (données non présentées).

Afin d'estimer la proportion de bactéries porteuses des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens, nous avons déterminé l'abondance relative de ces gènes par rapport au gène *tuf* (Figure 25). L'abondance relative du gène *tetA* était de -2,1 log. Concernant le gène *sul1*, nous avons observé des abondances relatives entre -2,5 et -3,2 log dans les zones de la Côte Est de l'Angleterre, du Centre de la Mer du Nord, de la Côte du Nord des Pays-Bas et de l'Embouchure de la Tamise. Ces valeurs correspondaient à la faible abondance absolue du gène *sul1* observée dans les mêmes échantillons et à une faible prévalence du gène dans les enrichissements en EPT/EPISA. Dans la zone de la Côte Ouest des Pays-Bas, l'abondance relative de ce gène était comprise entre -1,0 et -3,1 log. Les abondances relatives les plus élevées étaient associées aux abondances absolues les plus élevées du gène *sul1* indiquant que les bactéries quantifiées par le gène *tuf* évoluaient dans le même sens que *sul1* et pouvaient être porteuses de ce gène.

L'abondance relative la plus faible du gène *int11* (-1,2 log) a été observée dans l'échantillon EM15 prélevé dans la zone de la Côte Ouest des Pays-Bas. Dans ce même échantillon, l'abondance absolue du gène *int11* la plus élevée a été observée avec une co-occurrence des gènes *tetA* et *sul1*. Une abondance relative élevée du gène *int11* a également été constatée pour les échantillons prélevés dans la Manche Est (de l'ordre de -1,8 log) par rapport à ceux prélevés près de la Côte Est de l'Angleterre (de l'ordre de -2,8 log). Les abondances absolues du gène *int11* dans ces échantillons étaient pourtant similaires. Cette différence d'1 log de l'abondance relative du gène *int11* entre ces deux zones était associée à une détection du gène dans les enrichissements en EPT/EPISA des échantillons de la Manche Est et à une absence du gène dans ceux des échantillons de la Côte Est de l'Angleterre. De plus, l'abondance absolue du gène *tuf* était d'environ 1 log plus élevée dans la zone de la Côte Est de

l'Angleterre par rapport à la Manche Est. Cela montre qu'il y avait une proportion de bactéries porteuses du gène *int11* plus importante dans la Manche Est.

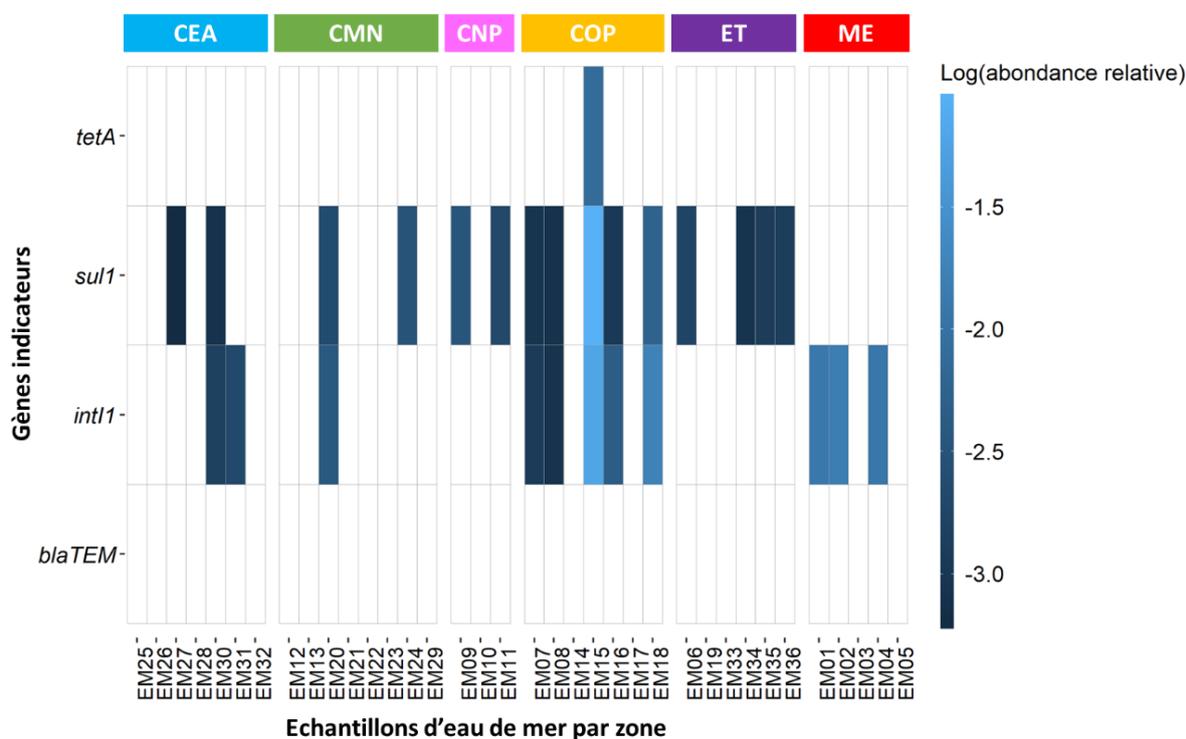


Figure 25 : Abondance relative (log) des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons d'eau de mer (EM ; n=36) prélevés dans la Manche et la Mer du Nord par zone de prélèvement. CEA : Côte Est de l'Angleterre ; CMN : Centre de la Mer du Nord ; CNP : Côte du Nord des Pays-Bas ; COP : Côte Ouest des Pays-Bas ; ET : Embouchure de la Tamise ; ME : Manche Est.

IV. Discussion

Des protocoles de filtration d'échantillons d'eau de surface et d'extraction d'ADN total à partir des filtres obtenus ont été mis au point, optimisés et validés dans cette étude. Des ADN avec des concentrations entre 3,1 et 15,2 ng/μl ont été extraits à partir des différents échantillons d'eaux fluviales et côtières. En comparant l'ADN extrait à partir des deux tailles de filtres utilisés successivement, nous avons pu voir que la concentration en ADN total était en moyenne deux fois plus élevée pour le filtre de porosité 0,45 μm que celui de 0,22 μm. De plus, l'ADN était d'une meilleure pureté pour le filtre 0,45 μm en considérant le ratio d'absorbance A260nm/A280nm. Ce ratio était supérieur à 2,0 pour les échantillons d'ADN extraits des filtres 0,22 μm pour les échantillons d'eaux côtières ce qui pouvait indiquer une contamination des échantillons par de l'ARN. En effet, le kit

d'extraction d'ADN PowerBiofilm® ne contient pas de traitement incluant de la RNase permettant leur dégradation. Des ratios de pureté incorrects pouvaient aussi être observés lorsque les concentrations d'ADN mesurées étaient inférieures à 10 ng/μl selon les informations du fabricant du spectrophotomètre Denovix. Ceci était le cas pour les échantillons d'eaux côtières avec le filtre de 0,22 μm par exemple. Un dosage des échantillons d'ADN par spectrofluorimétrie pourrait pallier ce biais permettant d'obtenir des résultats plus précis que la spectrophotométrie pour de faibles concentrations d'ADN. Cependant, la spectrofluorimétrie nécessite une préparation supplémentaire des échantillons ce qui peut prendre du temps et ne permet pas de mesurer les ratios de pureté. Une pureté moindre des extraits d'ADN pour les filtres de 0,22 μm pourrait aussi s'expliquer par une plus forte rétention de contaminants environnementaux à cette taille de filtre comme la matière organique dissoute qui est abondante dans les systèmes aquatiques et dont la taille peut varier entre 0,1 et 1,2 μm (Leenheer and Croué, 2003). Ces contaminants environnementaux peuvent alors agir comme des inhibiteurs de PCR comme nous l'avons mis en évidence dans le Chapitre I. Les enrichissements des échantillons d'eau en EPT/EPISA a permis de revivifier les bactéries et de palier le seuil de sensibilité des qPCR donnant lieu à une détection des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens alors qu'ils n'étaient pas quantifiables sans enrichissement. La détection des gènes dans les échantillons enrichis mais leur absence de quantification à partir de l'ADN total extrait des filtres pouvait donc être associée à la limite de quantification des réactions de qPCR mais aussi à la présence d'inhibiteurs. L'ajout de la souche de *L. monocytogenes* dans les échantillons comme contrôle positif de processus et la quantification du gène *hlyA* pour mettre en évidence ces inhibiteurs n'ont pas été réalisés dans cette étude. En effet, le gène *tuf* étant présent dans cette souche bactérienne, sa quantification dans les échantillons d'eau aurait entraîné une surestimation de la concentration bactérienne.

L'ADN bactérien a été extrait des filtres de 0,45 et de 0,22 μm avec une concentration et une pureté suffisante pour être quantifié par qPCR. Le gène de ménage bactérien *tuf* dont la présence a été confirmée dans plus de 50 genres bactériens à Gram + et Gram - a été ciblé (Tanaka *et al.*, 2010). Ce gène a pu être quantifié dans l'ensemble des échantillons d'eaux fluviales et d'eaux côtières avec

une différence d'environ un demi log entre les deux tailles de filtres utilisés successivement. La membrane filtrante de 0,45 μm a permis de récupérer une partie des bactéries par exemple sous forme de biofilms ou associées à du plancton de petite taille. En effet, les environnements aquatiques abritent une grande diversité bactérienne pouvant vivre sous forme libre dans la colonne d'eau ou alors sous forme de biofilms associés à des surfaces abiotiques et biotiques comme le plancton et les algues (Dang and Lovell, 2015). La taille des bactéries peut varier entre 0,2 et 3 μm selon le genre bactérien et leur morphologie (cocci/bacilles) (Westoby *et al.*, 2021) et il existe dans l'environnement des nanobactéries qui ont une taille comprise entre 0,3 et 1,0 μm ainsi que des ultramicrobactéries qui ont une taille inférieure à 0,3 μm (Duda *et al.*, 2012). Cette variation de la taille des bactéries peut expliquer les abondances absolues élevées du gène *tuf* observées sur le filtre de 0,22 μm après une première filtration avec le filtre de 0,45 μm . Cette abondance du gène *tuf* sur le filtre de 0,22 μm pouvait également indiquer la présence d'ADN libre provenant de bactéries dégradées. La dégradation des bactéries aurait pu être provoquée lors d'un stress pendant l'échantillonnage et/ou le traitement des échantillons d'eau libérant ainsi l'ADN intracellulaire. Selon la norme NF T90-471:2015, l'utilisation de membranes filtrantes de 0,45 μm en polycarbonate est préconisée pour la filtration d'échantillons d'eau démontrant une faible adsorption des protéines et de l'ADN. Cette norme précise également que les membranes filtrantes en cellulose sont à éviter car elles présentent un taux d'adsorption plus élevé pour ces composés. D'après les résultats de cette étude et afin d'étudier les GRA présents dans l'environnement aquatique, les filtres en nitrocellulose ont été privilégiés afin de favoriser la concentration de l'ADN sous forme libre en plus de la biomasse microbienne. Une première filtration a été effectuée avec une membrane filtrante de porosité 1,2 μm afin d'éviter un colmatage des filtres de plus petites tailles. Dans la littérature, les échantillons d'eau sont principalement filtrés avec des membranes de 0,22 et 0,45 μm entraînant un colmatage rapide des filtres pour les échantillons présentant une forte turbidité, c'est-à-dire une forte concentration de matières particulaires. Ceci a pour conséquence de limiter le volume d'eau filtré et donc d'entraîner une perte d'informations non négligeable (Rees *et al.*, 2014, Eichmiller *et al.*, 2016). Un filtre de porosité 1,2 μm a donc été utilisé

pour une filtration préliminaire des échantillons d'eau afin d'éliminer une première fois la matière organique et les différents contaminants de grande taille présents dans les échantillons. Même si l'utilisation de ce filtre peut entraîner la perte d'informations liées aux bactéries sous forme de biofilms, l'avantage est de pouvoir filtrer de plus gros volumes d'eau. Nous avons montré que l'utilisation combinée des membranes filtrantes de porosités 0,45 et 0,22 μm permettrait d'acquérir plus d'informations sur les gènes présents dans les échantillons qu'en utilisant un seul filtre. C'est pourquoi les ADN extraits des filtres de 0,45 μm et 0,22 μm pour les échantillons d'eau de mer prélevés lors de la campagne océanographique IBTS ont été poolés ensemble pour ne former qu'un échantillon unique afin de limiter la perte d'informations génétiques et le nombre de réactions de qPCR à réaliser.

Le gène *tuf* a été quantifié dans l'ensemble des échantillons d'eau de surface avec des abondances similaires excepté dans la Manche Est où l'abondance absolue de ce gène était la moins élevée (inférieure à 7 log copies/L d'eau). Les gènes *sul1* et *int11* avaient des abondances relatives au gène *tuf* proches de 0 dans l'échantillon d'eau de la Liane. Cela signifiait que ces gènes n'étaient pas uniquement retrouvés au sein des espèces bactériennes ciblées par le gène *tuf* et/ou sous forme d'ADN libre dans l'eau de la Liane. En revanche, concernant les échantillons d'eau de mer prélevés dans la Manche et la Mer du Nord, les abondances relatives des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens avaient une tendance similaire aux abondances absolues, montrant que ces gènes étaient principalement portés par les bactéries ciblées par le gène *tuf*. Il a été mis en évidence que les GRA pouvaient être plus abondants sous forme d'ADN extracellulaire que sous forme d'ADN intracellulaire dans les environnements aquatiques (Sivalingam *et al.*, 2020). Guo *et al.* (2018) ont montré une prévalence plus élevée des gènes *tetA*, *sul1* et *int11* associés à l'ADN extracellulaire par rapport à l'ADN intracellulaire associé aux microorganismes. Cet ADN extracellulaire une fois libéré des cellules bactériennes est alors susceptible d'être adsorbé sur différentes matrices comme la matière organique dans le milieu marin et de s'accumuler sur les membranes filtrantes lors de la filtration. De plus, les GRA peuvent également être véhiculés par les bactériophages, un vecteur important dans la dissémination de la résistance aux antimicrobiens. Les bactériophages sont les entités biologiques les

plus présentes dans l'environnement marin. Il a été estimé que le nombre de bactériophages pouvait être 10 fois supérieur au nombre des bactéries (Wommack and Colwell, 2000). Ces bactériophages peuvent transférer des GRA entre bactéries par transduction faisant d'eux des vecteurs importants dans l'acquisition et la propagation des GRA. L'étude menée par Blanco-Picazo *et al.* (2020) dans la Mer Méditerranée a mis en évidence une abondance élevée des gènes de résistance *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *sul1* et *tetW* dans des particules de bactériophages allant de 4 à 9 log copies de gène/L d'eau filtrée. Il serait donc intéressant d'analyser l'ADN phagique des bactériophages en parallèle des bactéries afin de caractériser leur rôle dans le maintien et la dissémination des GRA dans le milieu marin mais aussi fluvial. Concernant la quantification de la population microbienne, il devrait être souligné que le gène *tuf* peut être présent en une ou deux copies au sein des génomes bactériens, que ce gène peut être muté entre les différents genres bactériens et ne reflèterait donc qu'une partie de la population microbienne de l'environnement marin où la diversité bactérienne reste encore à être explorée. Il serait donc intéressant de cibler d'autres gènes de ménage bactérien en parallèle du gène *tuf* afin de confirmer ces résultats de quantification de la population microbienne.

La présence, l'abondance et la répartition géographique des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla*_{TEM}, *sul1* et *int11* ont été étudiées dans les eaux de surface prélevées à proximité de Boulogne-sur-Mer ainsi que dans la Manche et la Mer du Nord. La prévalence globale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens était de 100 % à proximité de Boulogne-sur-Mer (comprenant la Liane et les eaux côtières) et de 73,2 % dans la Manche et la Mer du Nord. Nous avons observé une prévalence de 8,3 % pour le gène *tetA*, de 47,2 % pour le gène *sul1* et de 50 % pour le gène *int11*. Les deux enrichissements en EPT et EPSA ont donné des résultats différents l'un de l'autre dans la mesure où les bactéries ayant besoin d'un niveau élevé en sels comme les *Vibrio* et *Aeromonas* vont se développer dans l'EPSA. Les Enterobacteriaceae comme *Salmonella*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Citrobacter* et *Shigella* se développent préférentiellement dans l'EPT qui ne contient pas de sel. Le gène *bla*_{TEM} codant pour la résistance aux β -lactamines n'a été détecté que dans 1/39 échantillons après un enrichissement de l'eau de la Liane et quantifié dans 1/39 échantillons d'eau à environ 5 log copies/L

d'eau de la Liane. Similairement, Su *et al.* (2020) ont observé une abondance absolue du gène *bla*_{TEM} de 5 log copies/L d'eau côtière en Mer Jaune (Chine) par qPCR soit un niveau de contamination similaire à celui que nous avons observé dans la Liane. La quantification de ce gène dans la Liane pourrait être attribuée à une contamination par les rejets des différentes STEU présentes le long du fleuve. En effet, le gène *bla*_{TEM} est majoritairement associé aux Entérobactéries comme *E. coli*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Morganella* et *Proteus* qui sont retrouvées dans la flore intestinale de l'Homme. La décontamination des eaux usées dans les STEU n'étant pas efficace à 100 %, ces bactéries potentiellement porteuses du gène *bla*_{TEM} sont alors acheminées dans les rivières et les fleuves qui constituent les principaux compartiments récepteurs. Afin de confirmer cette hypothèse, l'analyse de prélèvements d'eau en aval et en amont des STEU reliées à la Liane serait à envisager. Selon la base de données CARD, le gène *bla*_{TEM} a été identifié dans la plupart des Entérobactéries au sein de plasmides ce qui peut accroître sa prévalence et sa dissémination dans les eaux de surface par un transfert horizontal de gènes avec des bactéries autres que les Entérobactéries.

Le gène *tetA* codant pour la résistance aux tétracyclines a été détecté dans 4/39 échantillons d'eau après un enrichissement en EPT/EPISA et quantifié dans 3/39 échantillons d'eau prélevés dans la Liane, à la plage de Boulogne-sur-Mer et en Mer du Nord à l'Ouest des Pays-Bas. Nous avons noté une abondance absolue de 6,0 log copies/L dans la Liane, 4,8 log copies/L dans la Manche près de Boulogne-sur-Mer et 5,2 log copies/L dans la Mer du Nord à proximité de la Côte Ouest des Pays-Bas. Cette diminution de l'abondance absolue du gène *tetA* reflétait l'effet de dilution des GRA entre les fleuves et le compartiment marin récepteur. Par comparaison, Guo *et al.* (2018) ont observé jusqu'à 7 log copies du gène *tetA* par litre d'eau dans un estuaire en Chine soit une concentration 100 fois supérieure à l'abondance absolue que nous avons observé en Mer du Nord et dans la Manche à proximité de Boulogne-sur-Mer. Cette différence pourrait être expliquée par une pollution plus importante de l'estuaire en Chine qui reçoit des apports considérables de polluants provenant de sources terrestres via les fleuves et les rivières après un traitement des eaux usées incomplet dans les STEU. De plus, la Chine est le principal pays producteur d'antibiotiques dans le monde avec une

consommation élevée dans l'agriculture, la santé humaine et animale pouvant entraîner une plus forte pression de sélection sur les bactéries environnementales (Lu *et al.*, 2018). Dans les travaux de Tiirik *et al.* (2014) menés en Mer Baltique, le gène *tetA* a été quantifié entre 3 et 4 log copies/L d'eau de mer à environ 35 km des côtes de la Finlande et 50 km des côtes de l'Estonie. Cette abondance était comparable à celle que nous avons observé près de la Côte Ouest des Pays-Bas.

Les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *sul1* et *int11*, codant respectivement pour la résistance aux sulfonamides et pour l'intégrase de l'intégron de classe 1, ont été les plus quantifiés dans notre étude que ce soit dans les prélèvements d'eau fluviale, d'eaux côtières ou d'eaux collectées en pleine mer. Nous avons observé pour les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *sul1* et *int11* des abondances absolues qui étaient en moyenne de 8 log copies/L d'eau dans la Liane (considérée comme le récepteur secondaire), de 4 à 5 log copies/L au niveau des plages de Boulogne-sur-Mer et de Wimereux, et de 5 log copies/L dans la Manche et la Mer du Nord (considérées comme les récepteurs tertiaires). Similairement au gène *tetA*, un effet de dilution des gènes *sul1* et *int11* a été observé du fleuve à la mer à mesure que l'impact anthropique caractérisé par les différents rejets dans le fleuve diminuait comme indiqué dans la publication de Gao *et al.* (2018). Dans la Manche et la Mer du Nord, le gène *sul1* a été détecté dans 47,2 % des échantillons et le gène *int11* dans 50 % des échantillons avec une co-occurrence de ces 2 gènes dans 27,8 % des échantillons. Alors que le gène *sul1* a été quantifié seul dans 53 % des échantillons (sans *int11*), le gène *int11* a quant à lui été quantifié dans 36 % échantillons dépourvus de *sul1*. Ces observations ont également été rapportées dans des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques isolées d'une rivière en Inde où 73 % des souches possédaient au moins un intégron avec le gène *sul1* et 8 % avaient le gène *sul1* mais pas le gène *int11* (Chaturvedi *et al.*, 2021). En effet, les intégrons de classe 1 sont composés d'une région 5' conservée où est situé le gène *int11* et une région 3' conservée avec un gène de résistance aux sulfonamides (comme *sul1*, *sul2* ou *sul3*) entre lesquelles un ou plusieurs GRA peuvent être insérés sous forme de cassettes. La prévalence et l'abondance élevée du gène *int11* dans l'environnement marin peut favoriser la dissémination des GRA par transferts horizontaux entre les bactéries. Les intégrons de

classe 1 sont les plus souvent impliqués dans la dissémination des GRA, leur incorporation dans le chromosome bactérien mais également dans l'acquisition de multirésistances (Luo *et al.*, 2010). Le suivi de ce gène dans l'environnement marin est donc important pour évaluer la dissémination des GRA par les intégrons.

L'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord différerait selon la zone géographique étudiée, c'est-à-dire selon la nature et l'origine de l'impact anthropique. Etant donné le manque de données sur ces deux mers, certaines hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. La plus forte abondance des gènes *tetA*, *sul1* et *int1* a été observée au sein d'un même échantillon d'eau de mer que nous avons prélevé à environ 66 km de la Côte Ouest des Pays-Bas. Certains facteurs pourraient expliquer cette forte concentration en gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens comme les eaux usées d'origine humaine provenant des structures offshore présentes dans cette zone. Ces structures offshore renvoient aux différentes installations présentes en Mer du Nord comme les fermes éoliennes et les plateformes pour l'exploitation du pétrole et du gaz. En effet, plus de 120 plateformes éoliennes ont été construites en Europe au cours des dernières années dont la majorité est située en Mer du Nord (WindEurope, 2019). Les différents rejets d'origine humaine provenant des plateformes pour l'exploitation du pétrole et du gaz pourraient constituer une source de contamination potentielle des eaux marines par les BRA et les GRA. Mais à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'efficacité des traitements des eaux usées de ces installations pour l'élimination des contaminants biologiques. Les animaux marins comme les mammifères, les poissons et les oiseaux à proximité de ces structures peuvent également être un vecteur de contamination de l'environnement marin par les GRA. Une étude réalisée en Mer du Nord a mis en évidence l'attraction de certaines espèces d'oiseaux comme le goéland par ces plateformes éoliennes (Vanermen *et al.*, 2014) tandis que les fèces de ces oiseaux marins se sont avérés être un vecteur important de contamination par les GRA. Au Portugal, des souches d'*E. coli* porteuses de différents gènes de type *bla*, *sul* et *tet* ont été isolées de fèces de mouettes (Poeta *et al.*, 2008). Des souches d'*E. coli*

productrices de β -lactamases à spectre élargi ont également été isolées de cloaques de mouettes sur les côtes au Nord du Chili dans une zone d'accès pourtant interdite à l'Homme (Báez *et al.*, 2015). Cela révèle une implication potentielle des fèces d'oiseaux marins contaminés au niveau terrestre dans la pollution de l'environnement marin par la résistance aux antimicrobiens même dans des zones peu impactées par l'Homme.

De fortes abondances des gènes *sul1* et *int11* ont également été observées plus au sud de cette zone à une distance d'environ 4 km des côtes hollandaises et de 15 km de l'embouchure du canal de la Mer du Nord. Ce canal est sujet à divers rejets d'origine anthropique notamment avec la ville d'Amsterdam à proximité et son port. Il est maintenant reconnu que les eaux de rivières sont contaminées par différentes natures de polluants incluant les GRA qui ne sont pas totalement éliminés lors du traitement des eaux usées et disséminent dans les environnements en aval des rejets (Zhang *et al.*, 2009). De plus, trois parcs éoliens offshore sont situés à proximité constituant un impact potentiel sur l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens.

Les gènes *sul1* et *int11* ont également été quantifiés à une distance d'environ 25 km des côtes hollandaises où le Rhin et la Meuse, deux grands fleuves longs de 1 233 km et 950 km respectivement, se jettent dans la Mer du Nord. Dans une étude récente, ces deux gènes ont été quantifiés tout le long du Rhin en Suisse, en Allemagne et aux Pays-Bas (Paulus *et al.*, 2020). Les auteurs ont montré que la présence et l'abondance des gènes *sul1* et *int11* variaient entre les points de prélèvement des différents pays mais que l'abondance de ces deux gènes était la plus élevée dans deux zones polluées par des industries pharmaceutiques et dans la zone plus en aval juste avant l'embouchure. L'impact des effluents du Rhin et de la Meuse sur la pollution de la Mer du Nord pourrait s'ajouter à l'impact de la ville de Rotterdam et de son port qui est le plus grand port maritime d'Europe. Ce port est caractérisé par un trafic maritime intense avec plus de 30 000 bateaux faisant escale chaque année mais également par de grandes zones industrielles composées de raffineries de pétrole et d'industries

chimiques. Cependant, peu d'études décrivent le rôle des effluents de ces différentes installations dans la propagation de la résistance aux antimicrobiens et le traitement des eaux usées à bord des bateaux.

Les gènes *sul1* et *int11* ont été quantifiés dans le même échantillon d'eau de mer prélevé à 45 km de l'embouchure de l'Humber, un grand estuaire maritime situé sur la côte Est du Nord de l'Angleterre. Cet estuaire constitue la plus grande source d'eau douce rejetée de l'Angleterre dans la Mer du Nord. Une étude réalisée sur ces eaux estuariennes a permis d'identifier des souches de *V. parahaemolyticus* résistantes à plusieurs antibiotiques (kanamycine, gentamicine, céfazoline et tétracycline) indiquant que cet estuaire pourrait être une potentielle source de contamination par les GRA (Daramola *et al.*, 2009). De plus, cette zone est caractérisée par la présence de plusieurs parcs éoliens mais également de ports en amont de l'estuaire comme le port de Hull, le Green Port Hull et le port d'Immingham.

Dans la Manche Est, seul le gène *int11* a été quantifié. Dans cette zone, une abondance plus élevée de ce gène a été observée dans un échantillon d'eau de mer prélevé à environ 15 km du Havre qui est le second port de France dans le trafic maritime et le cinquième port européen dans le trafic de conteneurs, situé à l'embouchure de la Seine. Une étude a mis en évidence la présence du gène *int11* dans la Seine qui réceptionne les effluents de 16 STEU (Laroche *et al.*, 2009). Ce gène a ainsi été détecté dans des souches d'*E. coli* isolées le long du fleuve et avait une prévalence plus élevée dans l'estuaire près de Tancarville et d'Honfleur, deux villes situées à proximité du Havre. De surcroît, la Manche est considérée comme une « autoroute de la mer » avec environ 800 bateaux naviguant chaque jour dans ces eaux (Amara, 2010). A l'inverse, seul le gène *sul1* a été quantifié dans la zone s'étendant de l'embouchure de la Tamise à la ville de Calais au Nord de la France. Cette zone est soumise aux rejets de la Tamise, un fleuve de 346 km de long, lui-même soumis à différents effluents. Plusieurs études ont révélé que ces eaux étaient polluées notamment par des résidus d'antibiotiques et des GRA. Entre autres, White *et al.* (2019) ont détecté trois antibiotiques de la famille des sulfonamides (sulfadiazine, sulfaméthoxazole et sulfanilamide) le long de la Tamise jusqu'à l'embouchure, en aval des effluents de 7 STEU qui exerceraient une potentielle pression de sélection sur les bactéries environnantes et

conduisant ainsi à l'apparition de souches résistantes aux sulfonamides. Les eaux de cette rivière ont également montré une grande diversité de GRA associée une forte abondance des gènes *ermB*, *bla_{TEM}*, *tetA*, *tetG*, *tetW*, *tetX*, *sul1*, *sul2*, *int11* et *int12* qui ont été quantifiés jusqu'à 8 log copies/L d'eau (Xu *et al.*, 2019b). Dans la zone au Nord de la France, l'échantillon avec l'abondance la plus élevée du gène *sul1* a été prélevé près de Calais. Ce secteur est caractérisé par le passage de nombreux navires à passagers comme les ferrys qui relient Calais à la ville de Douvres en Angleterre. De plus, nous avons montré dans cette étude que l'eau de la Liane qui se jette à une trentaine de kilomètres au sud de Calais était contaminée par les gènes *bla_{TEM}*, *tetA*, *sul1* et *int11*. Cette occurrence du gène *sul1* a également été observée dans deux échantillons au Nord des Pays-Bas à une distance de 50 km et de 80 km des côtes hollandaises où deux parcs éoliens offshore sont actuellement en service.

Les gènes *sul1* et *int11* ont également été quantifiés au centre de la Mer du Nord. Cette zone est contrairement aux autres assez éloignée des côtes et donc de leur potentielle influence, mais concentre différentes installations offshore pour l'exploitation du pétrole et du gaz (Fujii, 2015). L'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans cette zone pourrait refléter une contamination des eaux marines par les rejets liés à ces structures ou alors une importante dissémination des BRA et des GRA sur de longues distances favorisée par différents facteurs tels que les courants marins. Cette dispersion des BRA et GRA par les courants marins est plus difficile à suivre que leur dispersion dans les eaux fluviales dans la mesure où les mers et les océans sont des milieux très vastes mais constitue une perspective intéressante. De plus, cette dispersion des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin peut soulever des questions sur l'implication du trafic maritime intense dans ces eaux et des différents rejets que cela implique comme les eaux de lestage qui sont pompées puis rejetées en mer. Très peu d'informations sont disponibles sur la contamination de ces eaux de lestage par les BRA et les GRA ainsi que leur dissémination dans les eaux marines. Cependant, il a été estimé qu'environ 10^{19} bactéries sont transportées dans le monde chaque année dans les eaux de lestage des bateaux (Brinkmeyer, 2016). De plus, une étude menée récemment a mis en évidence une importante diversité de GRA dans des eaux de lestage de navires

venant du monde entier (Australie, Japon, Europe, Corée, Asie, Amérique du Sud) et ayant accostés dans deux ports en Chine (Lv *et al.*, 2020). Ainsi, les gènes *sul1*, *sul2*, *tetM*, *tetQ*, *ermB*, *strB* et *int11* ont été quantifiés dans ces eaux avec des abondances pouvant aller jusqu'à 9 log copies/L d'eau. Le remplacement de ces eaux de lestage au sein des réservoirs des bateaux est réalisé sur le littoral mais aussi en pleine mer, ce qui peut entraîner une dispersion de ces contaminants sur de longues distances. Entre 1998 et 1999 en Mer du Nord et dans la Manche, il a été estimé qu'environ 3 millions et 6 millions de tonnes d'eaux de lestage ont été déversées dans les ports de Dunkerque et du Havre, respectivement, par des navires en provenance d'Afrique, d'Asie, du Moyen-Orient, d'Amérique du Nord et d'Asie du Sud-Est (Masson *et al.*, 2000). Plusieurs espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme ont été détectées dans ces eaux telles que *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Outre ces eaux de lestage, il est également important de prendre en considération l'impact des rejets d'eaux usées des bateaux. Ces eaux usées comprennent les eaux noires qui correspondent aux eaux usées des salles de bain et des toilettes ainsi que les eaux grises qui correspondent aux eaux usées des éviers et des machines à laver. Des traces d'antibiotiques ont été détectées dans ces eaux usées comme le sulfaméthoxazole de la famille des sulfamides. Ces résidus d'antibiotiques ont été identifiés dans des bateaux de croisière sur le port de Hambourg (Allemagne) et pourraient exercer une pression de sélection sur les bactéries environnementales et induire l'apparition de souches résistantes (Westhof *et al.*, 2016).

V. Conclusion

- Le protocole de **filtration** d'échantillons d'eau et **d'extraction d'ADN** à partir de membranes filtrantes a été mis en place et validé. Une **préfiltration** sur un filtre de 1,2 µm puis **deux filtrations successives** sur des filtres de 0,45 et 0,22 µm ont été retenues pour récupérer un maximum de matériel génétique.
- L'eau de la Liane (eau fluviale) avait un niveau de **contamination** par les **gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens** plus important que les eaux côtières et marines.
- La **prévalence globale** des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens était de **74,4 %** dans les **eaux de surface** (fluviales, côtières et de pleine mer) et de **72,2 %** dans les **eaux marines** de la **Manche** et la **Mer du Nord**.
- La **prévalence** des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les **eaux de surface** était de **2,6 %** pour le gène *bla_{TEM}* (0 % dans les eaux de pleine mer), de **15,4 %** pour le gène *tetA* (8,3 % dans les eaux de pleine mer), de **51,3 %** pour le gène *sul1* (47,2 % dans les eaux de pleine mer) et de **53,8 %** pour le gène *int11* (50 % dans les eaux de pleine mer).
- Un phénomène de **décroissance de l'abondance** des gènes *sul1* et *int11* entre le point d'émission (le fleuve) et le compartiment final (la Manche et la Mer du Nord) montrait une **dissémination** importante de la résistance aux antimicrobiens.
- Une **contamination plus importante** de la zone de la Côte Ouest des Pays-Bas par les gènes *tetA*, *sul1* et *int11* a été observée révélant l'impact potentiel des **installations offshore** et du **trafic maritime** sur la pollution de l'environnement marin par la résistance aux antimicrobiens.
- Les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens quantifiés dans cette étude pourraient être portés par d'autres vecteurs de transmission que les **bactéries** ciblées par le gène *tuf* comme les **bactériophages** ou alors étaient sous forme **d'ADN libre** dans les eaux marines.
- Les gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* seraient de bons **indicateurs de contaminations** des eaux **fluviales** et **côtières** par la résistance aux antimicrobiens mais seuls les gènes *sul1* et *int11* seraient **pertinents** pour un suivi de cette contamination dans les **eaux en pleine mer**.

Chapitre III : Occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans un réseau trophique benthique

I. Contexte

Nous avons mis en évidence une prévalence globale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* de 72,2 % dans les eaux en pleine mer de la Manche et de la Mer du Nord. Ces gènes avaient des abondances plus élevées dans certaines zones révélant un impact anthropique potentiel. Une fois les BRA et les GRA présents dans l'environnement marin, ces contaminants biologiques peuvent se propager sous forme libre dans l'eau mais également s'associer à des surfaces biotiques et abiotiques. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux surfaces biotiques qui comprennent différentes espèces marines (animales et végétales) réparties dans des niveaux trophiques différents et constituant des réseaux trophiques complexes. Les espèces marines peuvent être contaminées via leur alimentation en consommant les végétaux/animaux d'un niveau trophique inférieur porteurs eux aussi des contaminants et/ou en filtrant l'eau de mer contaminée. Les espèces marines benthiques, c'est-à-dire les espèces vivant près des fonds marins, sont également en contact avec les sédiments marins qui sont des réservoirs de GRA (Habibi *et al.*, 2022). La présence de ces gènes dans les réseaux trophiques benthiques représente un risque sanitaire dans la mesure où les espèces marines de niveau trophique supérieur comme les poissons plats et les mollusques peuvent être destinés à la consommation humaine. S'il existe des données dans la littérature montrant un phénomène d'accumulation de contaminants chimiques comme les résidus d'antibiotiques dans un réseau trophique marin (Liu *et al.*, 2017), aucune information n'a été publiée quant à l'occurrence et l'accumulation de GRA au sein de ce type de réseau trophique benthique.

Le but de ces travaux a été d'étudier l'occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans des échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats représentatifs d'un réseau trophique benthique dans la Manche et la Mer du Nord. Ces échantillons ont été prélevés lors de la campagne océanographique IBTS 2020 et analysés en relation avec les résultats des échantillons d'eau de pleine mer du Chapitre II partie III.3.

Dans une première partie, nous avons cherché à détecter les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par qPCR après une étape d'enrichissement des différents échantillons marins en EPT et en EPSA. Les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ont également été quantifiés à partir de l'ADN total extrait des mêmes échantillons afin d'évaluer leur abondance absolue et leur abondance relative par rapport au gène bactérien *tuf*. La méthode de détection des gènes dans l'ADN des échantillons enrichis et leur quantification dans l'ADN des échantillons non enrichis a été validée pour les échantillons d'eau de surface dans le Chapitre II partie III.3.

Dans une seconde partie, nous avons réalisé des cartographies représentant différents niveaux de contamination des échantillons marins par la résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord afin d'identifier les sources potentielles de contamination.

Dans une troisième partie, nous avons évalué l'influence potentielle de certains facteurs biotiques et abiotiques sur l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons marins prélevés près de la surface comprenant le phytoplancton, le zooplancton et l'eau de mer dont les résultats ont été présentés dans le Chapitre II partie III.3 et intégrés dans cette partie de l'étude.

Dans une dernière partie, les données d'abondance relative des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens observées dans l'ensemble des échantillons marins (réseau trophique et eau de mer) ont été regroupées afin d'établir des modèles d'accumulation des gènes le long d'un réseau trophique benthique.

II. Matériel et méthodes

II.1. Plan d'échantillonnage

Le plan d'échantillonnage a été réalisé en considérant la position des espèces marines dans la colonne d'eau et par rapport à leur consommation d'espèces marines de niveau trophique inférieur. En raison de la complexité des réseaux trophiques, nous avons décidé de simplifier l'appartenance des espèces marines analysées dans cette étude à un niveau trophique défini en s'appuyant sur l'étude de Giraldo *et al.* (2017) réalisée dans la Manche (Figure 26). Les résultats des analyses des échantillons d'eau de pleine mer prélevés près de la surface ont été présentés dans le Chapitre II partie III.3 et ils constituaient le niveau 0 du réseau trophique. Le phytoplancton appartenait au niveau 1 et était composé d'organismes végétaux et de matière organique particulaire. Le zooplancton, principalement composé de copépodes, représentait le niveau 2 du réseau trophique. Le niveau 3 était composé d'*Aequipecten opercularis* (pétoncle blanc), une espèce de mollusque bivalve benthique reposant sur les fonds marins, et de deux espèces de poissons plats également benthiques : *Limanda limanda* (limande commune) et *Pleuronectes platessa* (plie commune). Le pétoncle blanc est un suspensivore qui se nourrit de la matière organique et du plancton en suspension en filtrant l'eau grâce à ses branchies. La limande et la plie se nourrissent aux stades larvaires et juvéniles d'organismes unicellulaires et de zooplancton comme les copépodes et une fois adultes de crustacés et de mollusques bivalves. Etant donné la diversité de taille des espèces pêchées et donc de leur stade de développement, nous avons choisi de considérer leur appartenance au niveau trophique 3. Les plies et les limandes n'ont pas été différenciées dans cette étude en raison de leurs similitudes morphologiques, comportementales et alimentaires, et aussi pour avoir un nombre d'échantillons plus significatif. Nous les avons donc désignées comme « poissons plats ».

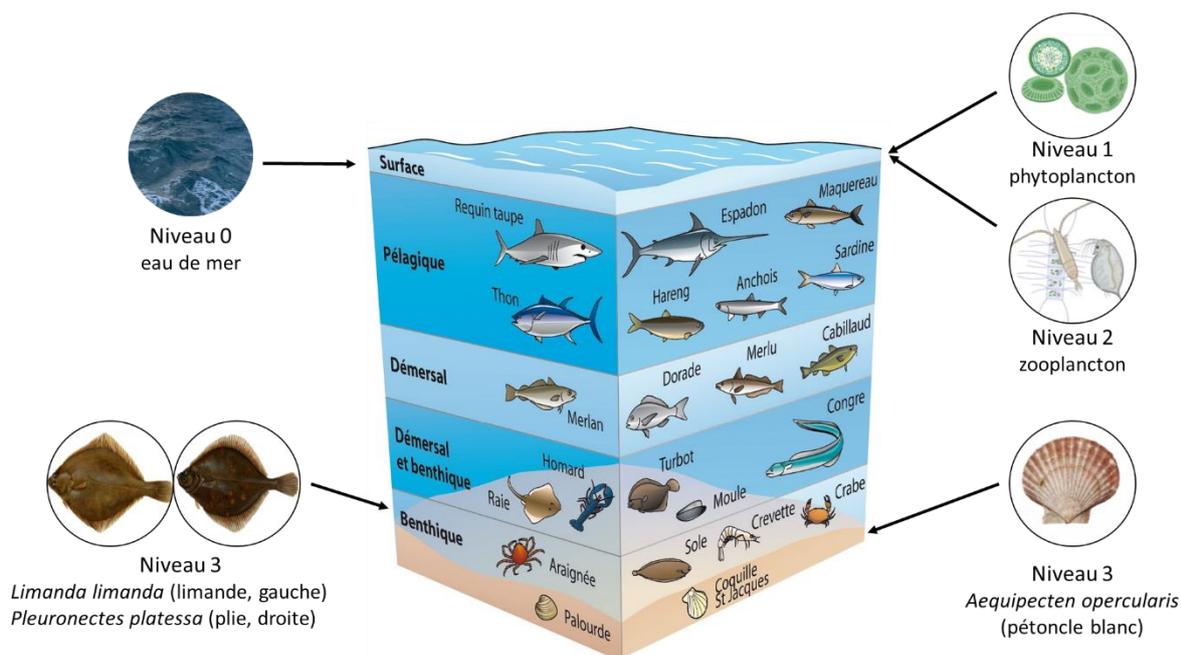


Figure 26 : Répartition des espèces marines analysées dans la colonne d'eau et leur appartenance à un niveau trophique défini. Images tirées des sites aquaportail.com ; ec.europa.eu et de BioRender.com sous le numéro d'agrément AS24394NSB.

II.2. Echantillonnage

Les échantillons analysés ont été prélevés en parallèle des échantillons d'eau de pleine mer lors de la campagne océanographique IBTS 2020 dans la Manche et la Mer du Nord présentée dans le Chapitre II partie II.2.

Les échantillons de phytoplancton ($n = 16$) ont été prélevés aux stations d'échantillonnage présentées en Figure 27. Pour cela, un filet BabyNet avec une taille de maille de $20 \mu\text{m}$ relié à une capsule a été immergé près de la surface (Figure 28A). Le contenu de la capsule a ensuite été transféré sur un tamis de $20 \mu\text{m}$, rincé avec de l'eau de mer filtrée et placé dans un flacon contenant de l'eau de mer filtrée et 20 % de glycérol. Les échantillons de zooplancton ($n = 16$) ont été prélevés aux mêmes stations d'échantillonnage que le phytoplancton (Figure 27). Pour ces échantillons, un filet WP2 avec une taille de maille de $200 \mu\text{m}$ relié à une capsule a été utilisé (Figure 28B). Le contenu de la capsule a été tamisé sur un tamis de $180 \mu\text{m}$ puis rincé avec de l'eau de mer filtrée et placé dans un flacon contenant de l'eau de mer filtrée et 20 % de glycérol. Tous ces échantillons de phytoplancton et de

zooplancton ont été conservés à - 20 °C à bord du navire puis transférés dans un congélateur à - 20 °C au laboratoire jusqu'à leur analyse.

Les échantillons de mollusques bivalves (n = 40) et de poissons plats (n = 350) correspondant au « benthos » ont été prélevés par chalutage de fond aux stations d'échantillonnage indiquées en Figure 29 et Figure 30, respectivement, à raison de 10 individus par station. Pour cela, un chalut de fond 36/47 à grande ouverture verticale (GOV) a été traîné de jour à l'arrière du navire pendant une durée de 30 min et une vitesse constante de 4 nœuds (Figure 28D). Suite au chalutage, les échantillons ont été triés, identifiés et placés dans des sachets hermétiques. Ces échantillons ont été conservés dans une chambre froide à - 20 °C à bord du navire avant d'être transférés à - 20 °C au laboratoire.

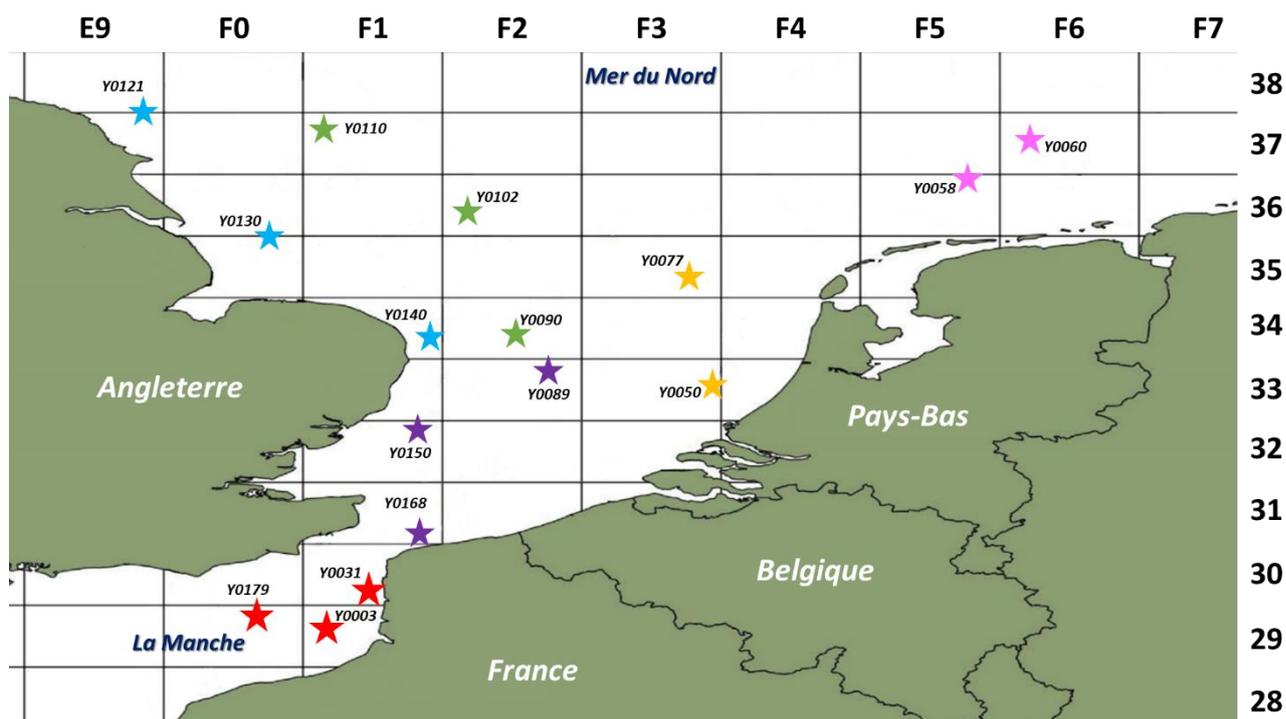


Figure 27 : Stations d'échantillonnage des prélèvements de phytoplancton (n = 16) et de zooplancton (n = 16) dans les différentes zones définies dans la Manche et la Mer du Nord. Etoiles rouges : Manche Est (ME) ; violettes : Embouchure Tamise (ET) ; bleues : Côte Est Angleterre (CEA) ; vertes : Centre Mer du Nord (CMN) ; jaunes : Côte Ouest des Pays-Bas (COP) ; roses : Côte du Nord des Pays-Bas (CNP).

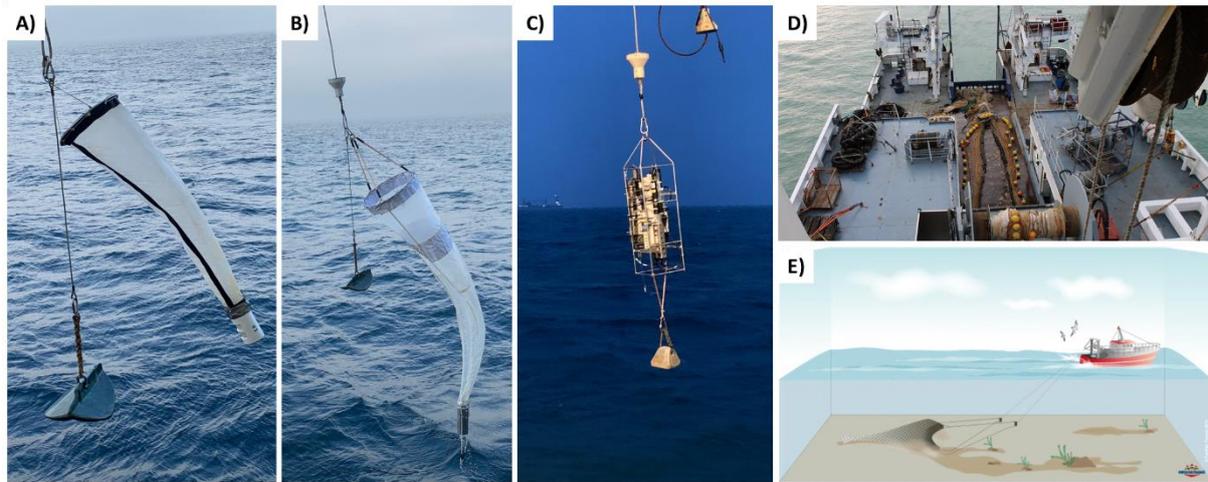


Figure 28 : Equipements utilisés lors de la campagne océanographique IBTS 2020. A) Filet BabyNet de 20 μm pour les prélèvements de phytoplancton. B) Filet WP2 de 200 μm pour les prélèvements de zooplancton. C) Bathysonde pour les mesures des paramètres environnementaux. D) Chalut de fond à GOV (Grande Ouverture Verticale). E) Schéma du chalutage de fond (d'après le Comité National des Pêches (2019)).

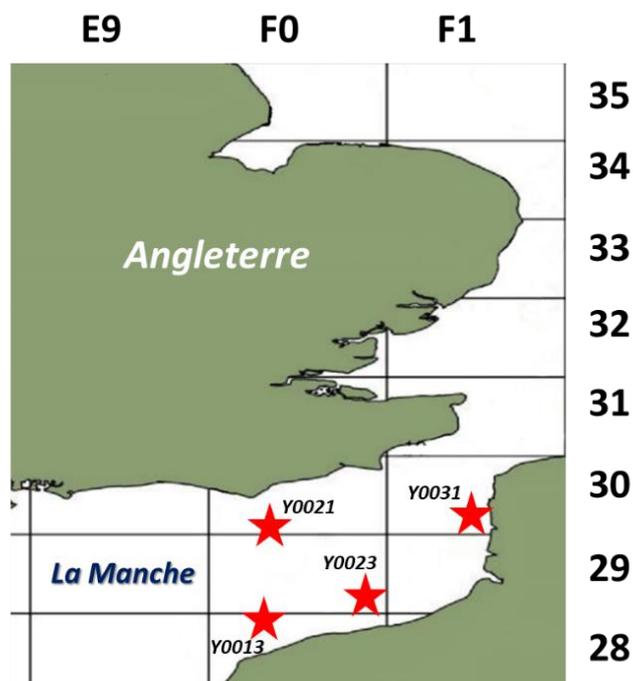


Figure 29 : Stations d'échantillonnage des mollusques bivalves (n = 40 ; 10 individus par station) dans la Manche Est.

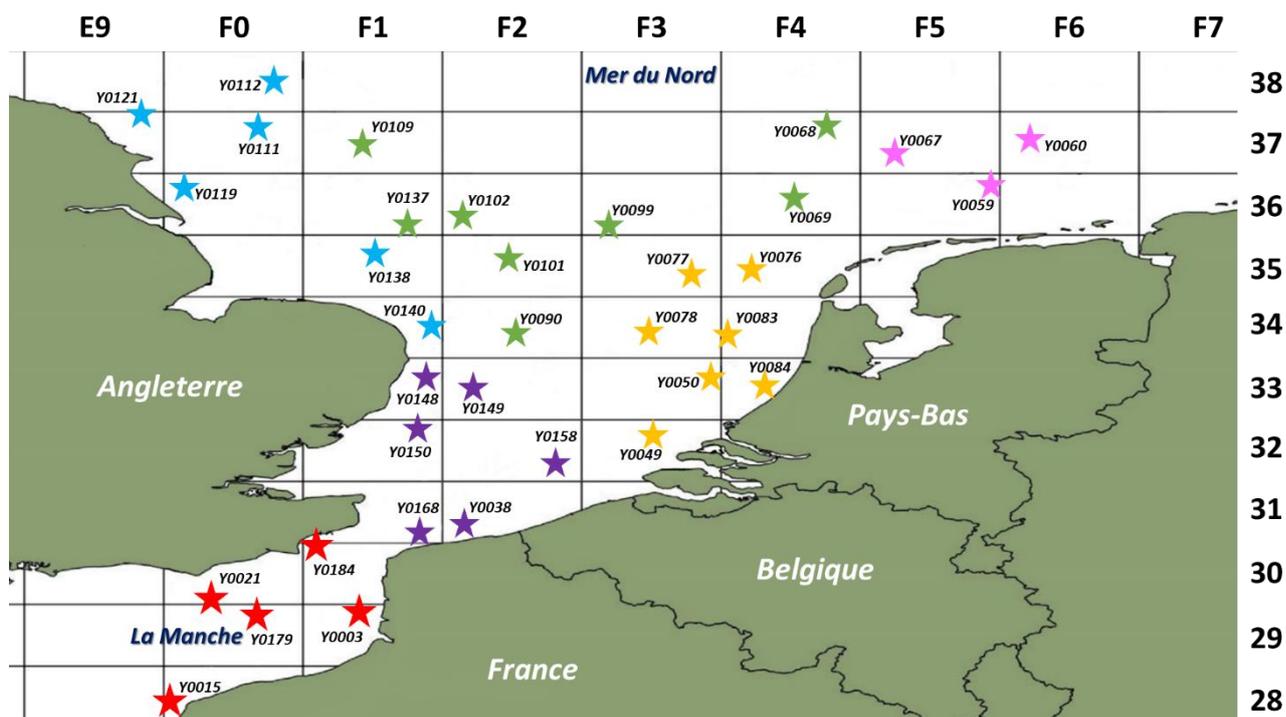


Figure 30 : Stations d'échantillonnage des poissons plats (n = 350 ; 10 individus par station) dans les différentes zones définies dans la Manche et la Mer du Nord. Etoiles rouges : Manche Est (ME) ; violettes : Embouchure Tamise (ET) ; bleues : Côte Est Angleterre (CEA) ; vertes : Centre Mer du Nord (CMN) ; jaunes : Côte Ouest des Pays-Bas (COP) ; roses : Côte du Nord des Pays-Bas (CNP).

Les informations sur les prélèvements de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats sont répertoriées en Annexe IX, Annexe X et Annexe XI.

En parallèle de ces échantillonnages, certains paramètres environnementaux ont été mesurés à l'aide d'une bathysonde (Sea-Bird Scientific, Bellevue, Etats-Unis) comportant différents capteurs (Figure 28C). Cette sonde a été immergée près de la surface après chaque chalutage et a notamment permis d'obtenir les paramètres suivants considérés comme les facteurs abiotiques dans cette étude :

- la température de l'eau (en °C)
- le pH
- la pression (en mbar)
- la salinité (en PSU ; Practical Salinity Unit)
- la saturation en oxygène (en %)
- la turbidité (en FTU ; Formazine Turbidity Unit)

La concentration en algues ($\mu\text{g/L}$) a également été mesurée avec la bathysonde et constitue un des facteurs biotiques analysés dans notre étude.

II.3. Préparation des échantillons

Les échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats ont été préparés selon le protocole défini dans le Chapitre I en partie II.1.B. Chaque échantillon de phytoplancton ($n = 16$) et de zooplancton ($n = 16$) a été analysé individuellement. La chair de chacun des dix individus de mollusques bivalves prélevés à chaque station d'échantillonnage a été poolée en un échantillon unique ($n = 4$) pour réaliser les analyses. Les informations relatives aux caractéristiques de ces échantillons sont indiquées en Annexe XII. De même, les prélèvements de peau, de branchies et de viscères de dix individus de poissons plats prélevés à la même station d'échantillonnage ont été poolés pour donner 35 échantillons par nature de prélèvement. Nous avons estimé la superficie des poissons en assimilant leur forme à une ellipse. Ainsi, la superficie totale des poissons a été calculée selon la formule suivante :

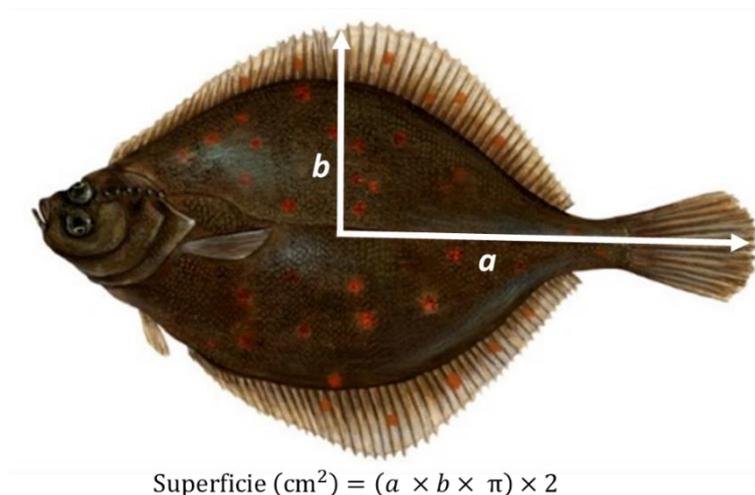


Figure 31 : Estimation de la superficie des poissons plats en cm^2 .

Les données relatives aux caractéristiques de ces prélèvements sont indiquées en Annexe XIII.

Comme pour les échantillons d'eau, les différentes natures d'échantillons ont eu 2 enrichissements distincts en diluant 500 µl d'échantillon dans 500 µl d'eau peptonée tamponnée (EPT, Oxoid, Dardilly, France) et 500 µl d'eau peptonée saline alcaline (EPSA, Oxoid). Ces enrichissements ont été incubés pendant 48 h à 30 °C.

II.4. Extraction de l'ADN total des échantillons marins

Afin d'extraire l'ADN total à partir des différents échantillons, le kit DNeasy® PowerBiofilm® (Qiagen, Hilden, Allemagne) sélectionné dans le Chapitre I a été utilisé. Ainsi, l'ADN a été extrait à partir d'1 ml de broyat en suivant le protocole d'extraction indiqué dans le Chapitre I partie II.1.D. Pour extraire l'ADN à partir des enrichissements en EPT et en EPSA, les bouillons ont été centrifugés pendant 3 min à 13 000 rpm puis le culot a été resuspendu dans 400 µl de solution MBL et 100 µl de solution FB du kit PowerBiofilm®. La solution a été transférée dans les tubes à billes puis nous avons suivi le protocole décrit dans le Chapitre I partie II.1.D. Les échantillons d'ADN ont été conservés à - 20 °C jusqu'à leur analyse.

II.5. Quantification des gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1*, *int11* et *tuf*

Les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* ainsi que le gène bactérien *tuf* ont été détectés et quantifiés par qPCR en suivant les mêmes conditions que celles utilisées pour les échantillons d'eau (Chapitre II partie II.6). Afin de réduire l'effet des inhibiteurs potentiellement présents dans les échantillons, nous avons dilué les extraits d'ADN à 1/10 dans de l'eau nuclease-free pour réaliser les réactions de qPCR.

II.6. Analyse des données et traitements statistiques

La validation des résultats de qPCR et le calcul de la concentration des gènes (copies/ml d'ADN) ont été effectués conformément au Chapitre II partie II.7 (Annexe XIV). L'abondance absolue des gènes a été calculée en normalisant la concentration du gène avec le volume ou la masse de l'échantillon analysé. Pour les échantillons de phytoplancton et de zooplancton, la concentration du gène a été

divisée par le volume d'échantillon utilisé pour l'extraction (soit 1 ml) : l'abondance absolue était donc exprimée en copies du gène/ml d'échantillon. Concernant les échantillons de chair de mollusques bivalves, de branchies et de viscères de poissons plats, la concentration des gènes a été normalisée avec la masse des échantillons en prenant en compte le facteur de dilution utilisé lors de la préparation des broyats (1/2) : l'abondance absolue était exprimée en copies du gène/g. Pour les échantillons de peau de poissons plats, la concentration des gènes a été divisées par la superficie totale des poissons calculée précédemment : l'abondance absolue était exprimée en copies du gène/cm². Nous avons calculé l'abondance relative des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens en divisant l'abondance absolue du gène par l'abondance absolue du gène *tuf*. Cette abondance relative n'avait donc pas d'unité. Nous avons également calculé l'abondance absolue totale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens en additionnant l'abondance absolue de chaque gène pour un échantillon donné. Cette abondance absolue totale a été classée en 4 groupes distincts afin de définir des niveaux de contamination des échantillons marins par la résistance aux antimicrobiens Tableau 22.

Tableau 22 : Détermination arbitraire des niveaux de contamination des échantillons marins selon l'abondance absolue totale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens mesurée. PH : phytoplancton ; ZO : zooplancton ; PE : peau de poissons plats ; BR : branchies de poissons plats ; VI : viscères de poissons plats ; CH : chair de mollusques bivalves.

Niveau de contamination	Abondance absolue totale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens		
	PH – ZO	PE	BR – VI – CH
0 (nul)	Aucune quantification		
1 (faible)	< 5 log copies/ml	< 2 log copies/cm ²	< 4 log copies/g
2 (moyen)	5 - 6 log copies/ml	2 - 3 log copies/cm ²	4 - 5 log copies/g
3 (fort)	> 6 log copies/ml	> 3 log copies/cm ²	> 5 log copies/g

Pour évaluer l'impact des facteurs biotiques et abiotiques sur l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons d'eau de mer, de phytoplancton et de zooplancton, le coefficient de corrélation de Pearson (*r*) a été calculé. Ce coefficient n'a pas été analysé pour les échantillons de mollusques bivalves et de poissons plats étant donné que la mesure des paramètres environnementaux n'a été réalisée qu'en surface. L'analyse des corrélations pour un gène donné a été réalisée si ce gène a pu être quantifié dans au moins 15 % des échantillons analysés. La

force de la corrélation entre les données a été définie de manière arbitraire comme suit : très faible corrélation ($0 < r < 0,19$), faible corrélation ($0,20 < r < 0,39$), corrélation modérée ($0,40 < r < 0,59$), forte corrélation ($0,60 < r < 0,79$), très forte corrélation ($0,80 < r < 0,99$) et corrélation parfaite ($r = 1,00$). Les p -values ont été obtenues pour chaque paire de variables par un test de significativité.

Afin de modéliser l'accumulation des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans le réseau trophique benthique, les abondances ont été représentées sous forme de nuages de points. Au sein du même graphique, la droite de régression linéaire définie par la méthode des moindres carrés ainsi que la courbe de régression locale (de type lowess) représentant la tendance globale entre les variables ont été tracées. Les intervalles de confiance à 95 % de la courbe de lowess ont également été représentées. Si la droite de régression linéaire était située dans cette intervalle de confiance, l'hypothèse de linéarité du modèle était acceptée. Pour les régressions linéaires, plusieurs paramètres ont pu être identifiés : l'équation de la droite de régression de type $y = ax + b$; le coefficient de détermination R^2 et la p -value obtenue par un test de la pente.

Les analyses statistiques ainsi que les figures ont été réalisés avec le logiciel RStudio version 1.4.1717 (RStudio, Inc, Boston, Etats-Unis).

III. Résultats

III.1. Occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord

Afin d'étudier l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord, nous avons ciblé les gènes *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* par qPCR dans les différents échantillons marins après une étape d'enrichissement en EPT et en EPSA mais également sans étape d'enrichissement pour évaluer leur abondance absolue. En prenant en compte les résultats des échantillons d'eau de pleine mer présentés dans le Chapitre II partie III.3, nous avons observé une prévalence globale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord de 81,4 %. En considérant uniquement les échantillons représentatifs du réseau trophique

benthique (le phytoplancton, le zooplancton, les mollusques bivalves et les poissons plats), la prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord était de 83,7 %. Le gène *int11* était le plus présent dans les échantillons (63,8 %), suivi du gène *sul1* (59,6 %) puis des gènes *tetA* (47,5 %) et *bla_{TEM}* (46,1 %). La suite des analyses a été présentée par nature d'échantillon.

III.1.A. Phytoplancton

Les communautés phytoplanctoniques analysées étaient une des matrices les plus contaminées avec une prévalence de 93,8 % des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens (Tableau 23). Les gènes *tetA* et *bla_{TEM}* étaient moins présents (43,8 et 50 %, respectivement) que les gènes *sul1* et *int11* (87,5 et 62,5 %, respectivement). Nous avons noté une co-occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans 5/16 échantillons de phytoplancton dont 3 échantillons dans lesquels les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ont pu être quantifiés. L'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens était plus élevée dans ces 3 échantillons que dans les autres, entre 4,0 et 4,9 log copies du gène *tetA*/ml d'échantillon, entre 5,1 et 5,6 log copies du gène *bla_{TEM}*/ml d'échantillon, entre 5,5 et 6,2 log copies du gène *sul1*/ml d'échantillon et entre 5,2 et 5,4 log copies du gène *int11*/ml d'échantillon. Dans les autres échantillons, l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens était de l'ordre de 4,3 - 5,2 log copies/ml d'échantillon. Une co-occurrence des gènes *sul1* et *int11* a été observée dans 10/16 échantillons de phytoplancton. Dans 6/16 échantillons de phytoplancton, les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ont pu être détectés dans les enrichissements en EPT et/ou en EPSA mais n'ont pas été quantifiés. A l'inverse, nous avons observé une quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans 4/16 échantillons alors que ces gènes n'ont pas été détectés dans les enrichissements en EPT et en EPSA comme par exemple les gènes *tetA* et *bla_{TEM}* dans les échantillons PH01 et PH06.

Tableau 23 : Détection des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons de phytoplancton (PH) après enrichissement en EPT et en EPSA et abondance absolue des gènes (AA ; en log copies du gène/ml d'échantillon). Vert : présence ; orange : absence.

Echantillon	<i>tetA</i>			<i>bla_{TEM}</i>			<i>sul1</i>			<i>int11</i>		
	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA
	EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA	
PH01			4,0			5,1			5,5			5,2
PH02			-			4,9			4,5			-
PH03			-			-			-			-
PH04			-			-			-			-
PH05			-			-			5,2			4,8
PH06			4,9			5,6			6,2			5,4
PH07			-			-			5,0			4,2
PH08			-			-			4,3			-
PH09			-			-			-			-
PH10			-			-			-			-
PH11			-			-			-			-
PH12			4,8			5,3			5,9			5,3
PH13			-			-			5,1			4,4
PH14			-			-			4,4			4,2
PH15			-			-			4,5			-
PH16			-			-			4,9			4,3

III.1.B. Zooplancton

La prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons de zooplancton était de 87,5 %, soit un niveau de contamination plus faible que ceux de phytoplancton (Tableau 24). Par rapport au phytoplancton, les gènes *tetA* et *bla_{TEM}* ont été moins détectés, dans respectivement 18,8 et 12,5 % des échantillons de zooplancton. Nous avons quantifié ces deux gènes dans un seul et même échantillon (ZO08), dans lequel les gènes *sul1* et *int11* ont également été quantifiés. Les abondances absolues des gènes observées dans cet échantillon étaient les plus élevées et étaient comprises entre 5,3 et 6,9 log copies/ml d'échantillon. Une co-occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens a également été observée dans un autre échantillon de zooplancton (ZO09) mais dans lequel seul le gène *sul1* a été quantifié. Comme les échantillons de phytoplancton, les gènes *sul1* et *int11* ont été les plus détectés, dans respectivement 87,5 et 81,3 % des échantillons. De même, une co-occurrence de ces deux gènes a été notée dans 13/16 échantillons de zooplancton avec des abondances absolues similaires aux échantillons de phytoplancton (entre 4,2 et 6,2 log copies/ml d'échantillon).

Tableau 24 : Détection des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons de zooplancton (ZO) après enrichissement en EPT et en EPSA, et abondance absolue des gènes (AA ; en log copies du gène/ml d'échantillon). Vert : présence ; orange : absence.

Echantillon	<i>tetA</i>			<i>bla_{TEM}</i>			<i>sul1</i>			<i>int11</i>		
	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA
	EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA	
ZO01			-			-			5,2			4,4
ZO02			-			-			-			-
ZO03			-			-			5,5			4,7
ZO04			-			-			-			-
ZO05			-			-			4,8			4,4
ZO06			-			-			4,5			-
ZO07			-			-			-			-
ZO08			6,9			5,3			6,2			5,7
ZO09			-			-			4,4			-
ZO10			-			-			5,1			4,5
ZO11			-			-			4,5			4,2
ZO12			-			-			5,1			4,4
ZO13			-			-			4,9			4,7
ZO14			-			-			4,8			5,1
ZO15			-			-			4,4			4,9
ZO16			-			-			-			-

III.1.C. Poissons plats

Concernant les poissons plats, nous avons considéré trois natures de prélèvements : la peau, les branchies et les viscères. La prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associée aux poissons plats était de 80,95 % en considérant ces trois natures de prélèvements. La prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens sur la peau des poissons plats était de 82,9 % ce qui représentait un niveau de contamination légèrement plus faible que les échantillons de phytoplancton et de zooplancton (Tableau 25). Le gène *bla_{TEM}* était également le moins détecté dans ces échantillons de peau avec une prévalence de 20 % suivi du gène *tetA* avec une prévalence de 28,6 %. Nous avons noté que les gènes *bla_{TEM}* et *tetA* étaient toujours associés à au moins un autre gène indicateur de résistance aux antimicrobiens. Les gènes *sul1* et *int11* étaient les plus présents avec des prévalences respectives de 51,4 et 62,9 %. Une co-occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens a été observée dans trois échantillons de peau de poissons plats (PE02, PE04 et PE05). Comme les autres matrices, les abondances absolues des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens les plus élevées étaient associées à la co-occurrence des quatre gènes

au sein de l'échantillon PE02. Globalement, l'abondance absolue des gènes *tetA* et *bla*_{TEM} pouvait être plus élevée dans certains échantillons (entre 2,9 et 4,8 log copies/cm²) comparée à celle des gènes *sul1* et *intl1* (entre 1,9 et 4,5 log copies/cm²) malgré le peu de quantification des gènes *tetA* et *bla*_{TEM} dans les échantillons de peau.

Les branchies des poissons plats étaient la matrice la moins contaminée dans ces travaux, avec une prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens de 71,4 % (Tableau 26). Cependant, nous avons observé des prévalences similaires entre les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens qui étaient comprises entre 42,9 et 48,6 % avec une co-occurrence des quatre gènes dans 28,6 % des échantillons. Cette co-occurrence a été principalement constatée dans les enrichissements en EPT/EP SA des échantillons BR31 à BR35 et dans les échantillons BR01 à BR08 sans enrichissement avec des abondances absolues de l'ordre de 3,2 - 4,8 log copies/g.

Les viscères étaient l'organe avec le niveau de contamination le plus élevé des poissons plats avec une prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens de 88,6 % (Tableau 27). Le gène le plus détecté était *bla*_{TEM} avec une prévalence de 82,9 % suivi des gènes *tetA* (74,3 %), *intl1* (74,3 %) et *sul1* (60 %). Les gènes ont été principalement détectés après un enrichissement des échantillons de viscères en EPT et/ou en EP SA. Les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ont été quantifiés dans seulement 27,5 % des échantillons et avaient des abondances absolues de l'ordre de 3,2 - 4,4 log copies/g qui étaient similaires aux échantillons de branchies. Une co-occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens a été observée dans 54,3 % des échantillons de viscères ce qui était plus élevé que pour les autres matrices analysées.

Tableau 25 : Détection des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons de peau de poissons plats (PE) après enrichissement en EPT et en EPSA, et abondance absolue des gènes (AA ; en log copies du gène/cm² de peau). Vert : présence ; orange : absence.

Echantillon	<i>tetA</i>			<i>bla_{TEM}</i>			<i>sul1</i>			<i>int11</i>		
	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA
	EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA	
PE01			-			-			2,2			1,9
PE02			4,1			4,8			4,5			3,4
PE03			-			-			-			-
PE04			3,0			-			-			-
PE05			2,9			-			2,2			1,9
PE06			2,9			3,1			-			-
PE07			-			-			-			2,0
PE08			-			-			2,5			-
PE09			-			-			2,4			-
PE10			-			-			-			1,9
PE11			-			-			-			-
PE12			-			-			-			2,0
PE13			-			-			-			-
PE14			-			-			2,2			1,9
PE15			-			-			-			-
PE16			3,2			-			-			-
PE17			-			-			-			-
PE18			-			-			-			-
PE19			-			-			-			2,1
PE20			-			-			-			2,7
PE21			-			-			2,1			2,1
PE22			-			-			-			-
PE23			-			-			-			-
PE24			-			-			-			-
PE25			-			-			-			-
PE26			-			-			-			-
PE27			-			-			-			2,2
PE28			-			-			-			2,1
PE29			-			-			2,2			-
PE30			-			3,0			2,7			2,2
PE31			-			-			2,4			2,4
PE32			-			-			-			-
PE33			-			-			-			2,3
PE34			-			-			-			-
PE35			-			-			2,1			2,0

Tableau 26 : Détection des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons de branchies de poissons plats (BR) après enrichissement en EPT et en EPSA, et abondance absolue des gènes (AA ; en log copies du gène/g de branchies). Vert : présence ; orange : absence.

Echantillon	<i>tetA</i>			<i>bla_{TEM}</i>			<i>sul1</i>			<i>int11</i>		
	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA
	EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA	
BR01	Vert	Vert	4,2	Vert	Orange	-	Orange	Orange	4,8	Orange	Orange	3,2
BR02	Vert	Vert	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	3,5	Orange	Orange	-
BR03	Vert	Vert	4,1	Orange	Orange	4,3	Vert	Orange	4,0	Orange	Orange	-
BR04	Vert	Vert	4,5	Orange	Orange	4,4	Orange	Orange	-	Orange	Orange	3,7
BR05	Vert	Vert	4,3	Vert	Orange	-	Orange	Vert	3,5	Vert	Orange	-
BR06	Orange	Vert	-	Orange	Orange	4,8	Orange	Orange	3,8	Vert	Orange	-
BR07	Vert	Vert	-	Orange	Orange	4,5	Orange	Vert	-	Orange	Orange	-
BR08	Vert	Vert	4,3	Orange	Orange	-	Orange	Orange	3,6	Orange	Orange	-
BR09	Orange	Vert	-	Vert	Orange	-	Vert	Orange	-	Orange	Orange	-
BR10	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR11	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR12	Orange	Vert	-	Orange	Vert	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR13	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR14	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR15	Vert	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR16	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR17	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR18	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR19	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Vert	Vert	-
BR20	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-	Orange	Vert	-
BR21	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-
BR22	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR23	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR24	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-
BR25	Orange	Orange	4,1	Orange	Vert	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR26	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-
BR27	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR28	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-
BR29	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-	Orange	Orange	-
BR30	Orange	Orange	-	Vert	Vert	-	Vert	Orange	-	Vert	Vert	-
BR31	Vert	Orange	-	Vert	Vert	-	Vert	Vert	-	Vert	Vert	-
BR32	Orange	Vert	-	Vert	Vert	-	Vert	Vert	-	Vert	Vert	-
BR33	Orange	Vert	-	Orange	Vert	-	Orange	Orange	-	Orange	Vert	-
BR34	Vert	Vert	-	Orange	Vert	-	Vert	Vert	-	Orange	Vert	-
BR35	Orange	Vert	-	Vert	Vert	-	Orange	Vert	-	Orange	Vert	-

Tableau 27 : Détection des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons de viscères de poissons plats (VI) après enrichissement en EPT et en EPSA, et abondance absolue des gènes (AA ; en log copies du gène/g de viscères). Vert : présence ; orange : absence.

Echantillon	<i>tetA</i>			<i>bla_{TEM}</i>			<i>sul1</i>			<i>int11</i>		
	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA
	EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA	
VI01			-			-			-			-
VI02			-			-			4,4			3,5
VI03			-			-			-			-
VI04			-			4,2			-			-
VI05			3,9			-			-			-
VI06			-			-			-			-
VI07			4,0			4,1			-			-
VI08			-			-			-			-
VI09			4,0			-			-			-
VI10			-			-			-			-
VI11			-			-			-			-
VI12			-			-			-			-
VI13			-			-			-			-
VI14			-			-			-			-
VI15			-			-			-			-
VI16			-			-			-			3,2
VI17			-			-			-			-
VI18			-			-			-			-
VI19			-			-			-			-
VI20			-			-			-			-
VI21			-			-			-			-
VI22			-			-			-			-
VI23			-			-			3,2			-
VI24			-			-			-			-
VI25			-			-			-			-
VI26			-			-			-			-
VI27			-			-			4,1			-
VI28			-			-			-			-
VI29			-			-			-			-
VI30			-			-			-			-
VI31			4,1			-			-			-
VI32			-			-			-			-
VI33			-			-			-			-
VI34			-			-			-			-
VI35			-			-			-			-

III.1.D. Mollusques bivalves

Dans cette étude, l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens a été étudiée dans 4 pools de 10 individus de mollusques bivalves constituant un échantillonnage restreint lors de la campagne IBTS 2020 en raison du caractère aléatoire de la pêche de capture par chalutage de fond (Tableau 28). Chaque échantillon (pool) analysé était contaminé par au moins un gène indicateur de résistance aux antimicrobiens ce qui représentait une prévalence de 100 %. Le gène *tetA* a été détecté dans 4/4 échantillons, les gènes *sul1* et *int11* dans 2/4 échantillons et le gène *bla_{TEM}* dans 1/4 échantillons. Aucune co-occurrence des 4 gènes n'a été observée. Une co-occurrence des gènes *tetA*, *sul1* et *int11* a été observée dans l'échantillon CH02. Concernant les abondances absolues des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens, nous avons constaté que le nombre de copies du gène *tetA* était plus élevé que ceux des gènes *bla_{TEM}* et *sul1*, qui étaient également plus élevés que celui du gène *int11*.

Tableau 28 : Détection des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans les échantillons de chair de mollusques bivalves (CH) après enrichissement en EPT et en EPSA, et abondance absolue des gènes (AA ; en log copies du gène/g de chair). Vert : présence ; orange : absence.

Echantillon	<i>tetA</i>			<i>bla_{TEM}</i>			<i>sul1</i>			<i>int11</i>		
	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA	Détection		AA
	EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA		EPT	EPSA	
CH01			4,9			-			-			-
CH02			-			-			3,5			2,8
CH03			-			-			-			2,6
CH04			-			3,8			-			-

III.2. Distribution géographique des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord

Les résultats d'abondances absolues des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens au sein des échantillons marins indiquaient que ces échantillons étaient différemment contaminés par la résistance aux antimicrobiens. Une hypothèse expliquant cette différence de contamination concernait les sites de prélèvement des échantillons dans la Manche et la Mer du Nord qui ont été regroupés en 6 zones distinctes caractérisées par des sources de contaminations différentes.

Afin de réaliser des cartographies de la résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord, nous avons calculé l'abondance absolue totale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans chaque échantillon, c'est-à-dire la somme des abondances absolues des quatre gènes. Cette abondance absolue totale était donc proportionnelle à la co-occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens au sein d'un même échantillon : plus il y avait de gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens quantifiés dans l'échantillon, plus l'abondance absolue totale était élevée. Nous avons alors regroupé ces abondances absolues totales en 4 niveaux de contamination (Tableau 22) avant de les représenter sur des cartes en fonction de la nature de l'échantillon (Figure 32). Toutes les zones de la Manche et de la Mer du Nord étaient caractérisées par un niveau de contamination des échantillons marins qui différait selon leur nature. Concernant les résultats obtenus sur les échantillons d'eau de mer analysés dans le Chapitre II, un niveau de contamination élevé a été observé dans les échantillons EM15 et EM18 prélevés près de la Côte Ouest des Pays-Bas avec une abondance absolue totale supérieure à 6,0 log copies/L d'eau (données non montrées). Nous avons constaté un niveau moyen de contamination de 3 échantillons prélevés près de la Côte Ouest des Pays-Bas et d'un échantillon prélevé dans la Manche Est (abondance absolue totale entre 5,0 et 6,0 log copies/L d'eau). Enfin, un faible niveau de contamination a été observé pour 13/36 échantillons d'eau de mer répartis dans les zones de la Manche Est, de l'Embouchure de la Tamise, de la Côte du Nord des Pays-Bas, du Centre de la Mer du Nord et de la Côte Est de l'Angleterre.

Dans la Manche Est, nous avons observé un niveau moyen de contamination des échantillons de phytoplancton et d'un seul échantillon de zooplancton localisés au large de la baie de Somme (France). Une contamination des échantillons de peau et de branchies de poissons plats a également été constatée près des côtes françaises et anglaises. A proximité du Havre (France), le niveau de contamination était élevé pour la peau des poissons plats, moyen pour les viscères et faible pour les branchies, là où nous avons constaté une forte abondance absolue du gène *intl1* dans l'eau de mer. Aucune contamination des viscères de poissons plats n'a été constatée pour les autres points de prélèvement dans la Manche Est. Concernant les échantillons de mollusques bivalves, un niveau élevé de contamination de la chair a été observé au large de la ville de Fécamp (France) qui se trouve au nord du Havre.

Dans la zone de l'Embouchure de la Tamise, nous avons observé un faible niveau de contamination du phytoplancton, un niveau moyen de contamination des échantillons de zooplancton, de branchies et de viscères de poissons plats ainsi que des niveaux moyens et élevés de contamination des échantillons de peau de poissons plats. Ces niveaux de contamination ont été observés à deux endroits : au nord de l'embouchure de la Tamise et à proximité des villes de Calais et de Dunkerque (France). Pour le zooplancton, la peau et les viscères de poissons plats, un niveau moyen de contamination a également été observé plus au large des côtes.

Concernant la zone de la Côte Est de l'Angleterre, aucune contamination des branchies de poissons plats n'a été observée. Le niveau de contamination le plus élevé a été observé pour le phytoplancton prélevé au large de l'Humber qui est un des principaux estuaires d'Angleterre. Un niveau de contamination globalement moyen a été observé pour les échantillons de zooplancton et de peau de poissons plats le long des côtes anglaises. En revanche, nous avons constaté une contamination des viscères de poissons plats plus loin des côtes par rapport aux autres matrices.

Dans la zone de la Côte du Nord des Pays-Bas, il n'y avait aucune contamination des échantillons de phytoplancton, de branchies et de viscères de poissons plats. Cependant, nous avons observé un

niveau moyen de contamination des échantillons de zooplancton et de peau des poissons plats au large de l'estuaire de l'Ems (Pays-Bas).

En ce qui concerne la zone de la Côte Ouest de Pays-Bas, il y avait une faible contamination du phytoplancton et une contamination élevée du zooplancton là où nous avons constaté des abondances élevées des gènes *tetA*, *sul1* et *int11* dans l'eau de mer à proximité des stations offshore. De même, au large de l'embouchure de la Meuse, nous avons constaté un faible niveau de contamination des viscères de poissons plats, un niveau moyen de contamination des branchies mais un niveau élevé de contamination de la peau qui étaient associés à une co-occurrence des gènes *sul1* et *int11* dans l'eau de mer. Seul un niveau de contamination moyen de la peau des poissons plats a été observé à l'embouchure du canal de la mer du Nord en aval de la ville d'Amsterdam et pouvait être liée à la forte abondance des gènes *sul1* et *int11* dans l'eau de mer.

Finalement, la zone du Centre de la Mer du Nord était globalement caractérisée par des échantillons de peau, de branchies et de viscères de poissons plats d'un faible niveau de contamination. Une contamination élevée a été observée pour un échantillon de peau de poissons plats et un échantillon de phytoplancton au large de la Côte Est de l'Angleterre. De faibles niveaux et des niveaux moyens de contamination de tous les échantillons marins étaient visibles d'une manière dispersée dans le Centre de la Mer du Nord témoignant d'un grand potentiel de dissémination des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens.

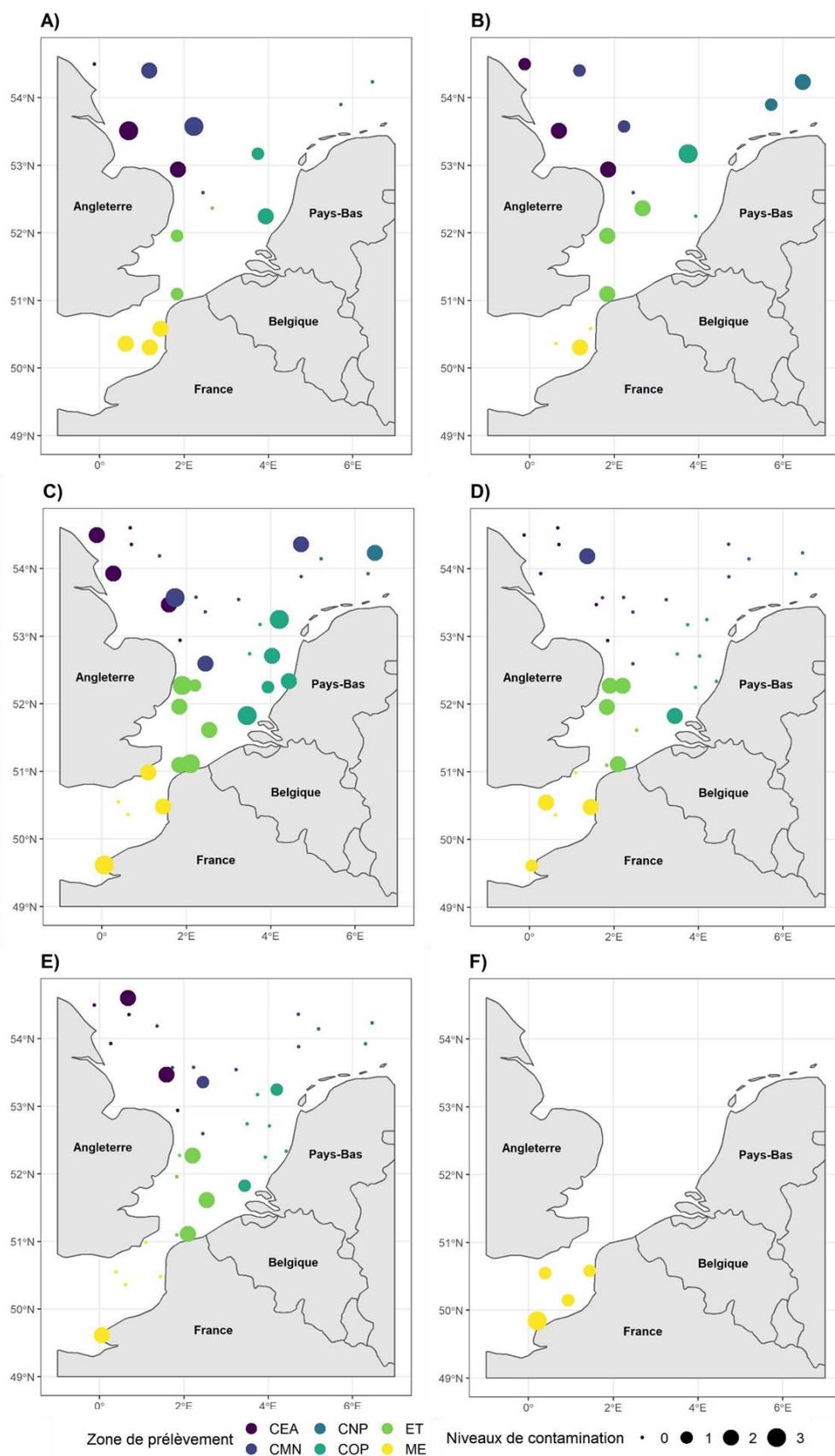


Figure 32 : Cartographie des niveaux de contamination par les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens des échantillons de (A) phytoplancton, (B) zooplancton, (C) peau de poissons plats, (D) branchies de poissons plats, (E) viscères de poissons plats et (F) chair de mollusques bivalves dans la Manche et la Mer du Nord. CEA : Côte Est Angleterre ; CMN : Centre Mer du Nord ; CNP : Côte Nord Pays-Bas ; COP : Côte Ouest Pays-Bas ; ET : Embouchure Tamise ; ME : Manche Est.

III.3. Influence de facteurs biotiques et abiotiques sur l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens

Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle de la population microbienne dans l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. Pour cela, le gène bactérien *tuf* a été quantifié dans les échantillons par qPCR (Annexe XV). Une quantification de ce gène a été observée dans tous les échantillons de phytoplancton avec une abondance absolue de l'ordre de 6,0 - 7,8 log copies/ml d'échantillon. En revanche, nous avons quantifié le gène *tuf* dans seulement 2/16 échantillons de zooplancton. Les abondances absolues étaient de 6,5 et 7,1 log copies/ml d'échantillon. Comme les échantillons de phytoplancton, le gène *tuf* a été quantifié dans l'ensemble des échantillons de peau et de branchies de poissons plats avec des abondances de l'ordre de 3,8 - 5,4 log copies/cm² et de 5,0 - 6,6 log copies/g, respectivement. Concernant les viscères de poissons plats, nous n'avons quantifié le gène *tuf* que dans 3/35 échantillons avec des abondances absolues de 5,8 à 6,6 log copies/g. Des abondances absolues de ce gène entre 5,8 et 6,6 log copies/g de chair ont été observées pour tous les échantillons de mollusques bivalves. Les échantillons marins étaient donc colonisés par des concentrations différentes de bactéries qui peuvent être des hôtes potentiels des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens.

En regardant l'abondance relative des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par rapport au gène *tuf*, nous avons observé des tendances similaires aux abondances absolues (Annexe XV). Une abondance élevée des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens était donc associée à une abondance élevée de la population microbienne dans les échantillons indiquant que les bactéries étaient porteuses des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ciblés. Mais dans certains échantillons marins comme l'échantillon PE02, nous avons noté des log d'abondances relatives positifs pour les gènes *tetA*, *bla_{TEM}* et *int11*. L'abondance de ces trois gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens était donc supérieure à la biomasse microbienne quantifiée par le gène *tuf* indiquant que les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens n'étaient pas forcément portés par les bactéries et/ou que le gène *tuf* ne ciblait pas la totalité de la population microbienne. Une analyse des

corrélations a été effectuée afin d'évaluer la relation entre l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et celle de la population microbienne. Nous avons observé que l'abondance absolue du gène *tuf* n'était pas corrélée à celle du gène *sul1* mais était faiblement et positivement corrélée à celle du gène *int11* dans les échantillons d'eau de pleine mer dont les résultats ont été obtenus dans le Chapitre II partie III.3 (Figure 33). En revanche, l'abondance absolue du gène *tuf* était fortement et positivement corrélée aux abondances absolues des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* mais également parfaitement corrélée à l'abondance absolue du gène *tetA* associées aux échantillons de phytoplancton (Figure 34).

L'influence de certains facteurs biotiques et abiotiques mesurés dans l'environnement marin sur l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et de la population microbienne a également été estimée par une analyse de corrélations. Cette analyse a été réalisée pour les échantillons qui ont été prélevés près de la surface de la mer (eau de mer, phytoplancton et zooplancton) puisque les paramètres environnementaux ont été mesurés entre 0 et 50 m de profondeur et non dans les fonds marins où ont été prélevés les échantillons de mollusques bivalves et de poissons plats. Les données relatives à la mesure des différents paramètres environnementaux sont disponibles à la demande sur le portail des données marines de l'Ifremer (<http://data.ifremer.fr/pdmi/portalssearch/main>). Aux stations de prélèvements prises en compte dans cette étude, il y avait une variation des valeurs de pH entre 8,04 et 8,14, de la température de l'eau entre 7,4 et 11,2 °C, de la salinité entre 30,9 et 35,3 PSU, de la saturation en oxygène entre 82,1 et 87,8 %, de la pression entre 125,5 et 145,3 mbar, de la turbidité entre 1,03 et 20,17 FTU ainsi que de la concentration en algues entre 1,8 et 4,4 µg/L. Les matrices de corrélation représentant les coefficients *r* et les *p*-values obtenues par le test de significativité sont indiquées dans les Annexe XVI à Annexe XVIII. Pour rappel, seuls les coefficients de corrélation significatifs (*p* < 0,05) ont été représentés dans les corrélogrammes (Figure 33 à Figure 35).

Dans un premier temps, les abondances absolues des gènes *sul1*, *int11* et *tuf* dans les échantillons d'eau de mer (calculées dans le Chapitre II) ont été analysées en lien avec les différents facteurs biotiques et abiotiques (Figure 33). Les abondances absolues des gènes *sul1* et *int11* étaient fortement corrélées entre elles et avec les mesures de turbidité et de saturation en oxygène. Nous avons cependant observé une faible corrélation de l'abondance des gènes *sul1* et *int11* avec les valeurs de salinité. Aucune corrélation significative n'a été observée entre l'abondance absolue des gènes *sul1* et *int11* et les valeurs de pH, de pression, de température et de concentrations en algues. Comme les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens, l'abondance absolue du gène *tuf* était fortement corrélée au taux de saturation en oxygène et plus faiblement aux valeurs de turbidité. Cependant, l'abondance absolue du gène *tuf* était négativement corrélée aux valeurs de pH, de pression, de température et de salinité.

Ensuite, nous avons analysé les corrélations des facteurs biotiques et abiotiques avec les abondances absolues des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associées aux communautés phytoplanctoniques (Figure 34). Nous avons observé une forte corrélation entre les abondances absolues des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* ainsi qu'une corrélation parfaite entre l'abondance absolue du gène *sul1* et celle du gène *int11*. Ces résultats confirmaient la co-occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens évoquée précédemment.

Comme pour les échantillons d'eau de mer, l'abondance absolue des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène *tuf* étaient fortement corrélées aux mesures de turbidité et de saturation en oxygène. Nous avons noté que la concentration en algues et les valeurs de pression étaient très fortement corrélées à l'abondance absolue des gènes *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* et fortement corrélées à l'abondance absolue des gènes *tetA* et *tuf*. Cette disparité de corrélation entre les gènes a également été observée avec les abondances absolues des gènes *tetA* et *tuf* qui étaient négativement et très fortement corrélées aux valeurs de pH et de température. Les abondances absolues des gènes

bla_{TEM}, *sul1* et *int11* étaient en revanche négativement et modérément corrélées aux valeurs de pH et négativement et fortement corrélées à la température. En revanche, aucune corrélation significative n'a été observée avec les mesures de salinité alors qu'elles étaient négativement corrélées à l'abondance absolue des gènes *tuf*, *sul1* et *int11* dans l'eau de mer.

Enfin, nous avons évalué l'influence des paramètres environnementaux sur l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *sul1* et *int11* dans les communautés zooplanctoniques (Figure 35). Peu de corrélations significatives ont été observées entre l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et les paramètres environnementaux. Seule l'abondance du gène *int11* était fortement corrélée aux mesures de turbidité et à la concentration en algues. L'abondance du gène *sul1* n'était pas corrélée à l'abondance du gène *int11* ni aux paramètres environnementaux.

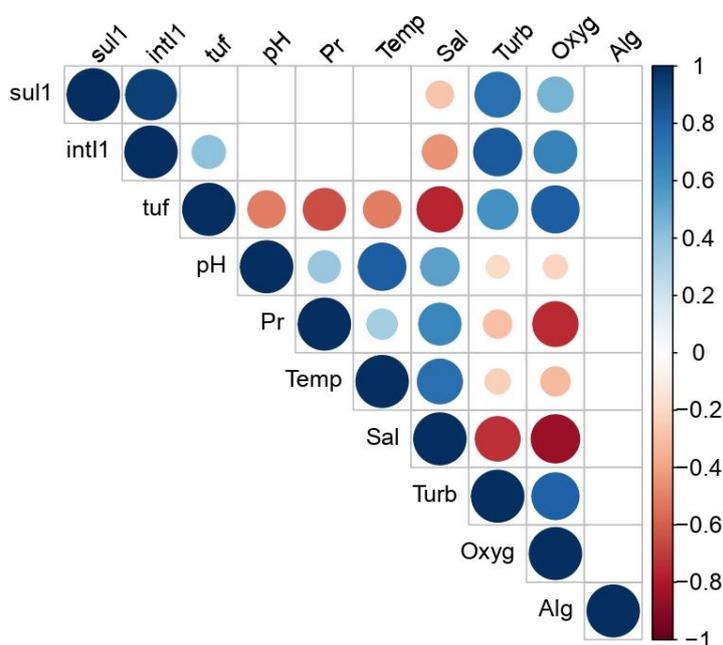


Figure 33 : Corrélogramme de l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens, du gène *tuf* et des paramètres environnementaux associés aux échantillons d'eau de mer (résultats obtenus dans le Chapitre II partie III.3).
Pr : pression ; Temp : température de l'eau ; Sal : salinité ; Turb : turbidité ; Oxyg : saturation en oxygène ; Alg : concentration en algues.

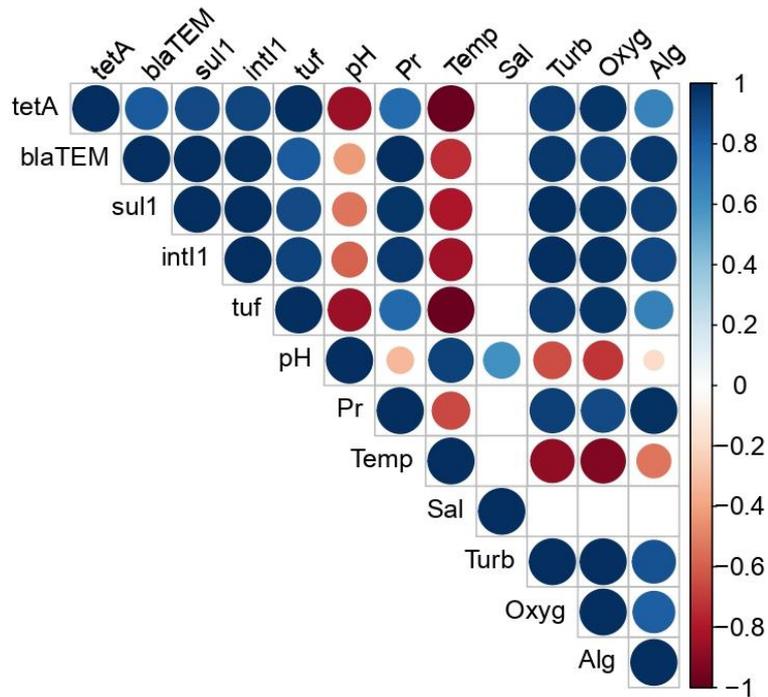


Figure 34 : Corrélogramme de l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens, du gène *tuf* et des paramètres environnementaux associés aux échantillons de phytoplancton. Pr : pression ; Temp : température de l'eau ; Sal : salinité ; Turb : turbidité ; Oxyg : saturation en oxygène ; Alg : concentration en algues.

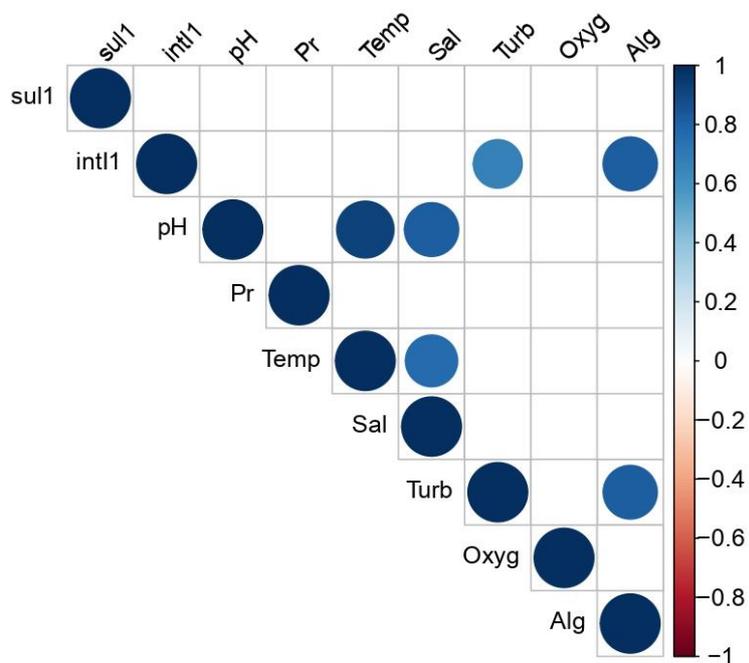


Figure 35 : Corrélogramme de l'abondance absolue des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et des paramètres environnementaux associés aux échantillons de zooplancton. Pr : pression ; Temp : température de l'eau ; Sal : salinité ; Turb : turbidité ; Oxyg : saturation en oxygène ; Alg : concentration en algues.

III.4. Accumulation des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens le long d'un réseau trophique benthique

Afin d'étudier un potentiel phénomène d'accumulation des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens au sein des différents échantillons représentatifs d'un réseau trophique benthique dans la Manche et la Mer du Nord, des modèles de régression ont été construits. L'abondance relative des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par rapport au gène *tuf* a été utilisée dans ces modèles pour pouvoir comparer les données en ayant une grandeur unique entre les différents niveaux trophiques. Les niveaux 0 et 1 de la modélisation du réseau trophique étaient représentés par les échantillons d'eau de pleine mer (résultats obtenus dans le Chapitre II partie III.3) et de phytoplancton, respectivement. Le niveau 3 était caractérisé par les différents prélèvements des spécimens du niveau trophique le plus élevé, c'est-à-dire la chair des mollusques bivalves ainsi que la peau et les branchies des poissons plats. Le zooplancton (représentant le niveau 2 du réseau trophique) et les viscères de poissons plats (niveau 3 du réseau trophique) n'ont pas été inclus dans les modèles étant donné la faible quantification du gène *tuf* dans ces échantillons. Pour la validation de l'hypothèse de linéarité des modèles construits, les graphiques représentant les différentes régression linéaires et locales combinées avec l'intervalle de confiance ont été réalisés et figurent dans les Annexe XIX à Annexe XXII.

En raison d'une faible quantification du gène *tetA* dans les échantillons de niveaux trophiques inférieurs, la droite de régression linéaire était en dehors de l'intervalle de confiance à 95 % (Annexe XIX). L'hypothèse de linéarité entre l'abondance de ce gène et les niveaux trophiques n'a pas été validée. Nous avons donc construit des modèles de régressions locales pour caractériser l'accumulation du gène *tetA* dans ces échantillons (Figure 36). Sur ces modèles de régression, nous avons observé une abondance relative constante du gène *tetA* entre les niveaux trophiques 0 et 1 à environ - 2,1 log. En revanche, une augmentation de cette abondance relative au niveau trophique 3 (Figure 36A et Figure 36B) a révélé une accumulation du gène *tetA* sur la peau et dans les branchies des poissons plats analysés. Une faible quantification de ce gène dans la chair des mollusques bivalves

n'a pas permis la réalisation d'un modèle de régression (Figure 36C). Cependant, une abondance relative du gène *tetA* 2,5 fois plus élevée dans la chair de bivalve par rapport à l'eau de mer et le phytoplancton a été observée.

Comme le gène *tetA*, l'hypothèse de linéarité n'a pas été concluante entre l'abondance relative du gène *bla_{TEM}* et les niveaux trophiques (Annexe XX). Des modèles de régressions locales ont donc été tracés pour ce gène (Figure 37). Etant donné qu'il n'y avait aucune quantification du gène *bla_{TEM}* dans les échantillons d'eau de mer, seules les abondances relatives dans les échantillons de phytoplancton, de chair de mollusques bivalves, de peau et de branchies de poissons plats ont été prises en compte. Ainsi, nous avons observé une plus faible accumulation du gène *bla_{TEM}* dans les échantillons de phytoplancton que sur la peau et les branchies des poissons plats. Concernant la chair de mollusques bivalves, la construction du modèle de régression n'était pas concluante mais les abondances relatives du gène *bla_{TEM}* étaient globalement similaires avec les échantillons de phytoplancton.

Concernant l'abondance relative du gène *sul1*, l'hypothèse de linéarité avec les niveaux trophiques a été validée (Annexe XXI). Des modèles de régressions linéaires ont donc été construits pour ce gène et les paramètres de ces droites de régressions ont été considérés (Figure 38). En considérant la pente de ces droites, nous avons noté une plus forte accumulation dans les branchies des poissons plats ($a = 0,29$) et dans la chair des mollusques bivalves ($a = 0,33$) que sur la peau des poissons plats ($a = 0,16$). Les faibles valeurs du coefficient de détermination R^2 indiquaient que les valeurs d'abondances relatives du gène *sul1* étaient très dispersées autour de la droite de régression et donc que les échantillons étaient différemment contaminés par ce gène. Ce modèle d'accumulation du gène *sul1* dans les niveaux trophiques est donc à considérer avec précaution.

De même que pour le gène *sul1*, l'hypothèse de linéarité entre l'abondance relative du gène *int11* et les niveaux trophiques a été validée (Annexe XXII). Les modèles de régressions linéaires pour ce gène sont présentés en Figure 39. A l'inverse du gène *sul1*, la pente de la droite n'indiquait aucune accumulation du gène *int11* au niveau de la peau des poissons plats. En revanche, une accumulation

de ce gène dans les branchies des poissons plats a été constatée avec une pente de la droite à 0,12. Cette accumulation du gène *int11* était plus faible que celle du gène *sul1* dans les branchies. De façon surprenante, un effet de dilution du gène *int11* a été observé entre les échantillons d'eau de mer, de phytoplancton et de chair de mollusques bivalves ($a = -0,25$). Les valeurs du coefficient R^2 des droites de régression indiquaient que les échantillons étaient contaminés de manière hétérogène par le gène *int11*. Comme le gène *sul1*, ce modèle est également à considérer avec précaution.

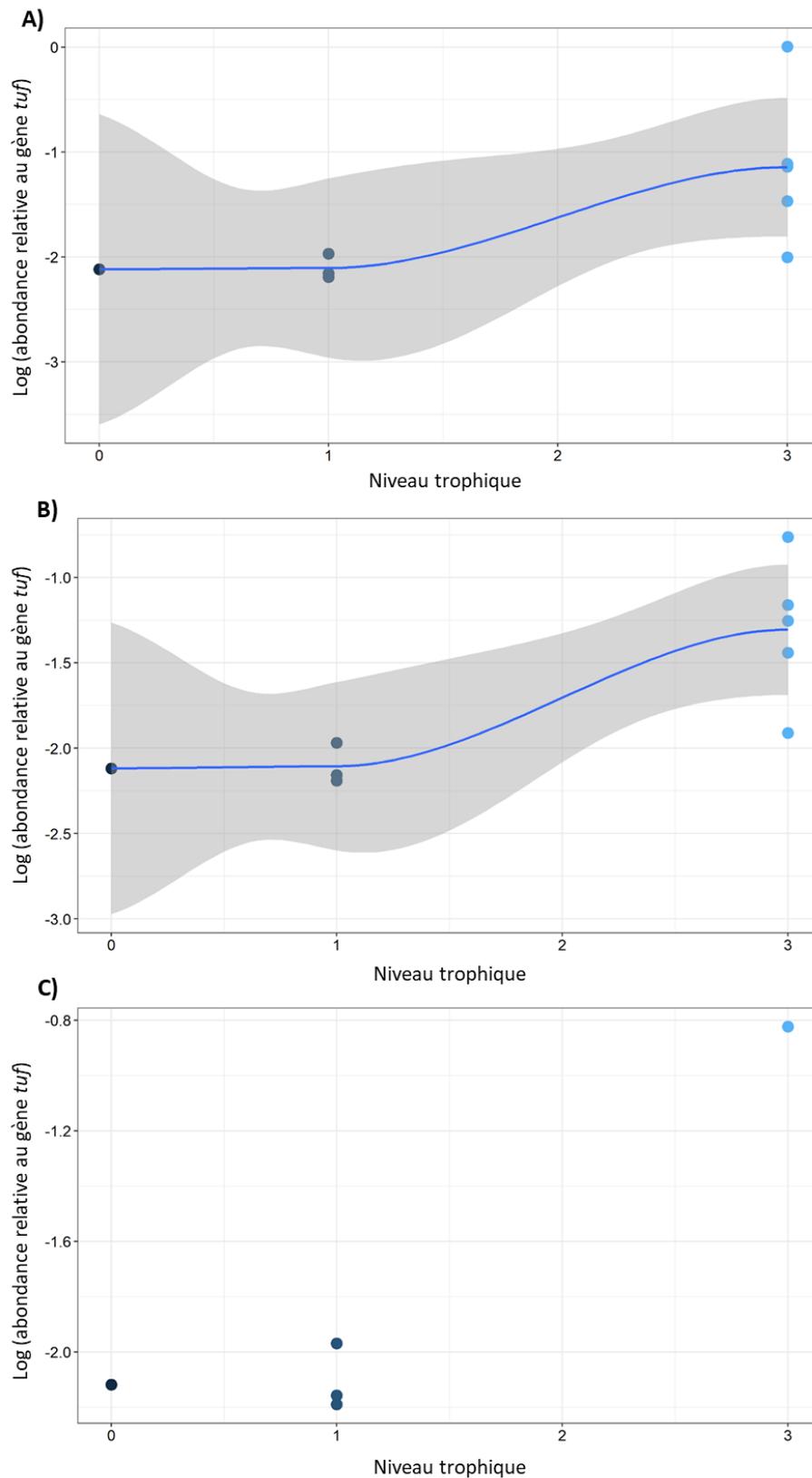


Figure 36 : Modèles de régressions locales (de type lowess) de l'abondance relative du gène *tetA* en fonction du niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspond aux échantillons de (A) peau de poissons plats, (B) branchies de poissons plats et (C) chair de mollusques bivalves.

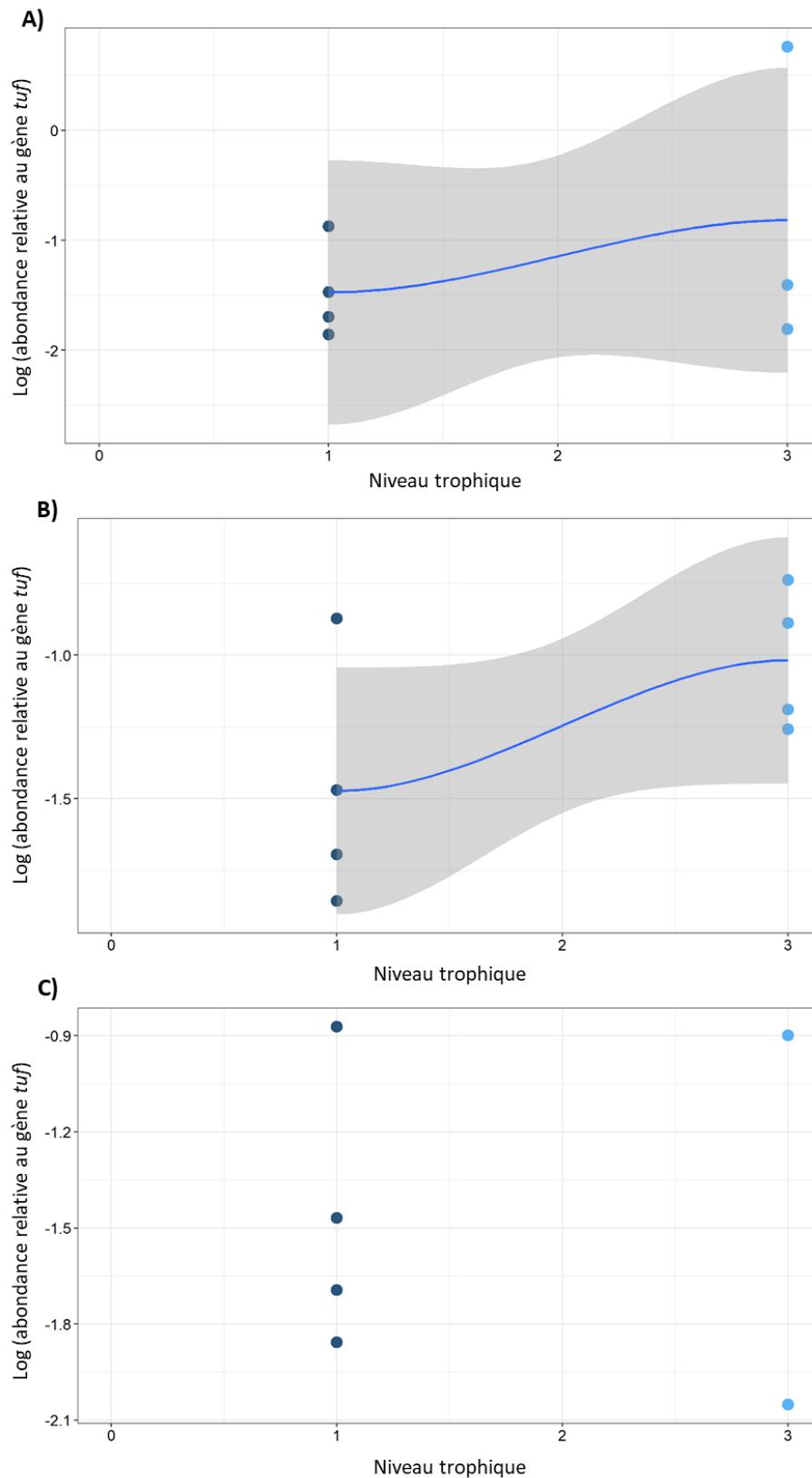


Figure 37 : Modèles de régressions locales (de type lowess) de l'abondance relative du gène *bla*_{TEM} en fonction du niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspond aux échantillons de (A) peau de poissons plats, (B) branchies de poissons plats et (C) chair de mollusques bivalves.

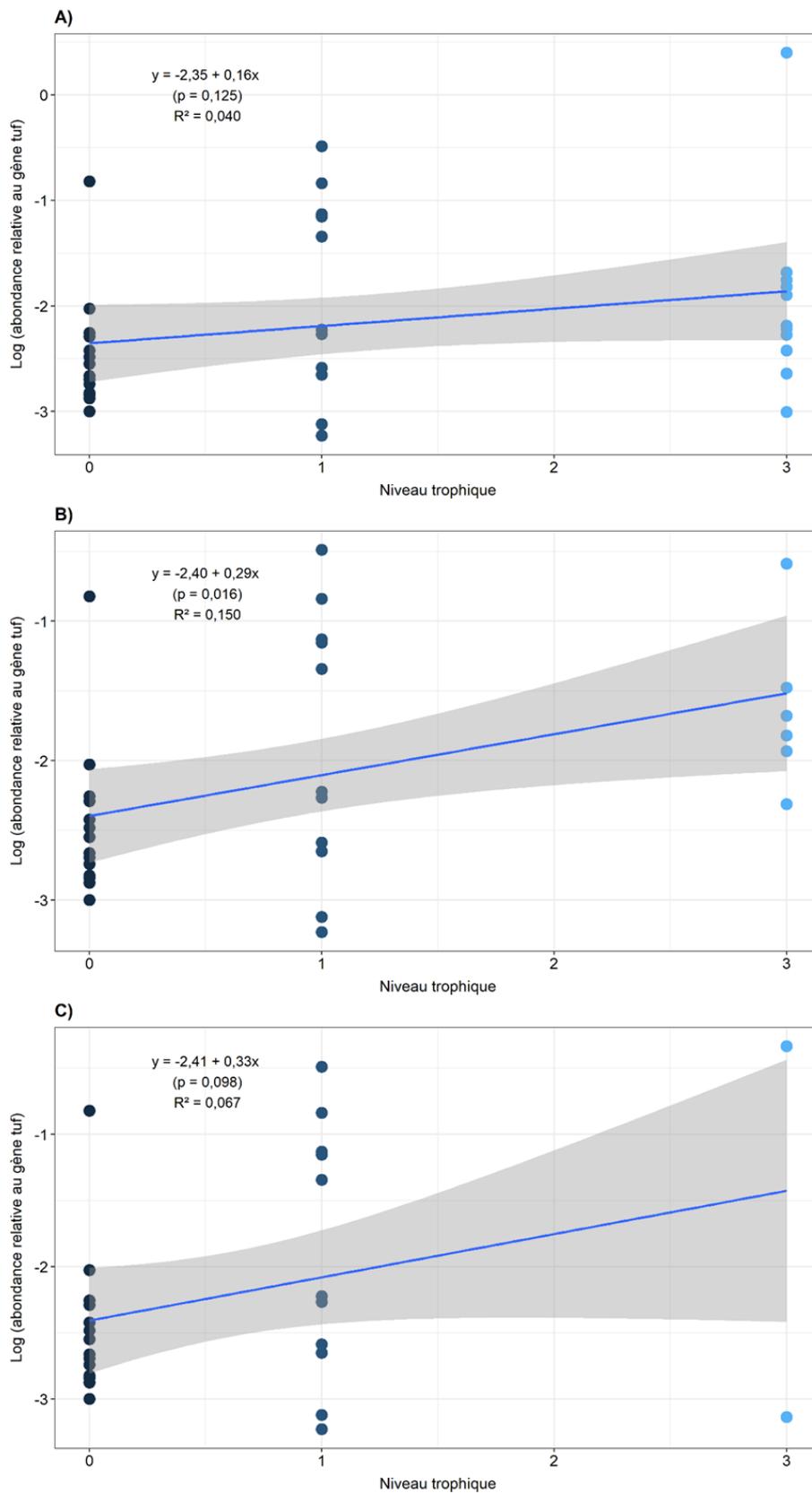


Figure 38 : Modèles de régressions linéaires de l'abondance relative du gène *sul1* en fonction du niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspond aux échantillons de (A) peau de poissons plats, (B) branchies de poissons plats et (C) chair de mollusques bivalves.

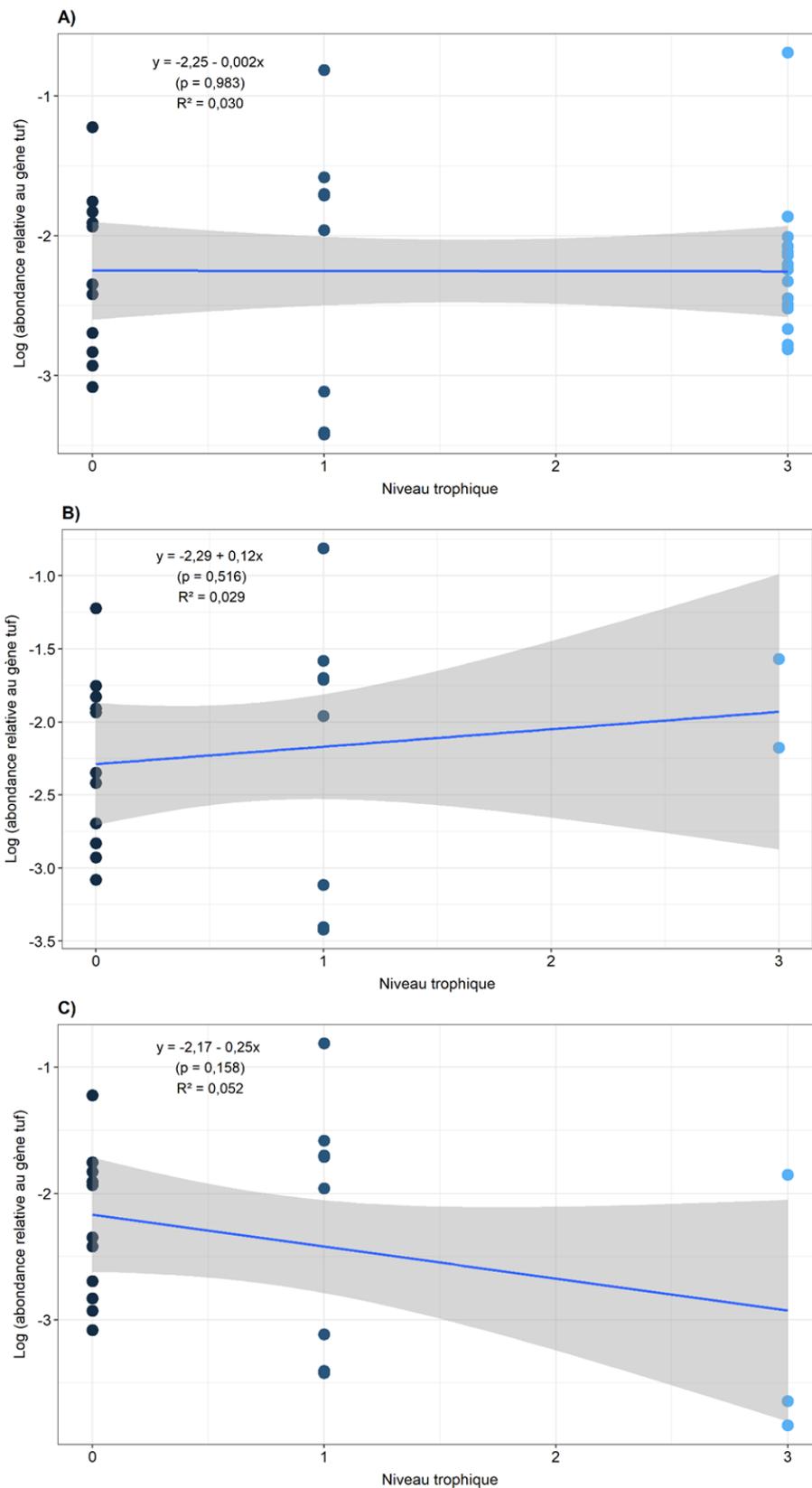


Figure 39 : Modèles de régressions linéaires de l'abondance relative du gène *int1* en fonction du niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspond aux échantillons de (A) peau de poissons plats, (B) branchies de poissons plats et (C) chair de mollusques bivalves.

IV. Discussion

Cette étude menée sur l'occurrence de gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens a été la première réalisée sur un réseau trophique benthique représenté par des échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats mais également la première réalisée dans la Manche et la Mer du Nord. En effet, peu de données ont été acquises sur la contamination de l'environnement marin en France par les GRA (ANSES, 2020a). Pour pallier cela, nous avons suivi les quatre gènes indicateurs résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans des échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats.

La prévalence totale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons marins représentatifs du réseau trophique benthique dans la Manche et la Mer du Nord était de 83,7 % et de 81,4 % si on tient compte des résultats sur les échantillons d'eau de pleine mer analysés dans le Chapitre II. En considérant uniquement les échantillons représentatifs du réseau trophique (sans l'eau de pleine mer), nous avons observé des prévalences de 47,5 % pour le gène *tetA*, de 46,1 % pour le gène *bla_{TEM}*, de 59,6 % pour le gène *sul1* et de 63,8 % pour le gène *int11*. Les gènes *sul1* et *int11*, codant respectivement pour la résistance aux sulfonamides et l'intégrase de l'intégron de classe 1, ont été détectés dans plus de 60 % des échantillons de phytoplancton et de zooplancton. Les abondances absolues observées pour ces échantillons variaient entre 4,2 et 6,2 log copies/ml d'échantillon selon la zone de prélèvement considérée. Comme pour les échantillons d'eau de mer analysés dans le Chapitre II, les gènes *bla_{TEM}* et *tetA*, codant respectivement pour la résistance aux β -lactamines et aux tétracyclines, ont été les moins détectés notamment dans les échantillons de phytoplancton et de zooplancton (entre 6 et 25 % des échantillons). Les abondances absolues observées pour ces deux gènes étaient globalement inférieures à celles des gènes *sul1* et *int11*. Des résultats similaires ont été mis en évidence dans l'étude de Xue *et al.* (2021) dans laquelle l'analyse de communautés de phytoplancton et de zooplancton prélevées le long d'une rivière en Chine a révélé des abondances du gène *sul1* plus élevées que celles du gène *tetA*. Le gène *bla_{TEM}* n'a pas été ciblé dans leur étude mais de faibles abondances des gènes *bla_{NDM-1}*, *bla_{IMP-4}* et *bla_{SHV}* codant également pour

des β -lactamases ont été mises en évidence. Les gènes *int11* et *sul2* ont également été quantifiés par ddPCR (Digital Droplet PCR) dans du plancton marin entre $3,0 \cdot 10^{-3}$ et $2,9 \cdot 10^{-1}$ copies d'unités génomes dans le sud de la Mer du Nord, la Mer d'Irlande et l'Atlantique Nord (Di Cesare *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent comme les nôtres que les communautés de phytoplancton et de zooplancton marins sont des réservoirs de GRA.

Peu d'échantillons de mollusques bivalves ont été prélevés dans le cadre de la campagne océanographique IBTS 2020 constituant un échantillonnage restreint à la Manche Est. En effet, les mollusques bivalves n'ont pas pu être pêchés à chaque station d'échantillonnage comme les poissons plats à cause du caractère aléatoire de la pêche de capture par chalutage de fond. Au moins un gène indicateur de résistance aux antimicrobiens a pu être quantifié dans chacun des pools d'individus avec des abondances variant entre 2,6 et 5,5 log copies/g de chair. Les plus fortes abondances étaient associées aux échantillons prélevés près des côtes pouvant indiquer l'impact potentiel des rejets côtiers sur l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les mollusques. Peu d'études ont été menées sur la quantification des GRA dans les mollusques bivalves. Cependant, certains travaux de recherche ont mis en évidence la présence de GRA comme les gènes *bla_{ampC}* et *tet(34)* dans des souches de *Vibrio* isolées de moules, de pétoncles et d'huîtres prélevés près des côtes norvégiennes (Håkonsholm *et al.*, 2020). Les gènes *dfrA14*, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetD*, *bla_{TEM}* et *bla_{CTX-M-3}* ont été identifiés par un séquençage complet du génome de souches de *K. pneumoniae* isolées de ces mollusques bivalves (Håkonsholm *et al.*, 2022). Près des côtes norvégiennes, des souches d'entérobactéries ont également été isolées de mollusques bivalves (Grevskott *et al.*, 2017). Parmi ces souches, 38 % présentaient une résistance phénotypique à au moins un des antibiotiques testés et 5 % étaient multirésistantes. Une majorité des souches d'*E. coli* isolées dans cette étude étaient porteuses du gène *bla_{TEM-1B}* et certaines souches possédaient les gènes *tetA*, *tetB*, *tetD*, *sul1*, *sul2*, *strA* et *strB*. En se nourrissant des particules en suspension dans l'eau par filtration, les mollusques bivalves sont ainsi sujets à l'accumulation de GRA au niveau de leur chair. De plus, en vivant au contact des fonds marins,

les mollusques bivalves sont particulièrement exposés au réservoir de GRA que constituent les sédiments marins.

Afin d'étudier l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associés aux poissons plats, nous avons considéré trois natures de prélèvements : la peau, les branchies et les viscères. Les gènes *tetA* et *bla_{TEM}* ont été détectés dans 20 à 28,6 % des échantillons de peau, 48,6 % des échantillons de branchies et dans 74,3 à 82,9 % des échantillons de viscères. La prévalence des gènes *sul1* et *int11* au sein de ces échantillons variait peu : entre 51,4 et 62,9 % dans les échantillons de peau, entre 42,9 et 45,7 % dans les échantillons de branchies, et entre 60 et 74,3 % dans les échantillons de viscères. Globalement, l'abondance absolue des gènes *tetA* et *bla_{TEM}* était supérieure à celle des gènes *sul1* et *int11* dans les trois matrices étudiées. L'occurrence des GRA et des EGM au sein des populations de poissons marins sauvages est peu décrite. La peau des poissons est caractérisée par une sécrétion de mucus qui constitue une barrière immunitaire et est colonisée par différentes espèces bactériennes commensales et/ou opportunistes appartenant principalement aux phyla des Protéobactéries, des Firmicutes et des Acidobactéries (Minniti *et al.*, 2017). Des GRA tels que les gènes *bla_{DHA}*, *tetM* et *vgaB* (codant pour la résistance à la streptogramine A et aux composés apparentés) ont été identifiés sur la peau et les filets de truites arc-en-ciel d'élevage (*Oncorhynchus mykiss*) où les conditions environnementales sont très différentes du milieu marin (Helsens *et al.*, 2020). L'intestin des poissons sécrète également du mucus pour les protéger des agressions et peut être caractérisé par une grande diversité bactérienne qui peut être associée à des GRA. Dans les intestins de soles sauvages (*Cynoglossus semilaevis*) prélevées dans la Baie de Bohai au Nord Est de la Chine, une abondance élevée de gènes de résistance aux aminoglycosides, aux β -lactamines et aux tétracyclines a été observée (Jia *et al.*, 2022). De même, une quantification des gènes *sul1*, *bla_{TEM}* et *qnrS* avec des abondances relatives au gène de l'ARNr 16S entre 10^{-1} et 10^{-5} a été reportée dans des échantillons de mucus intestinal de carpes (*Cyprinus carpio*), de barbeaux (*Luciobarbus graellsii*) et de truites sauvages (*Salmo trutta*) d'eau douce en Espagne (Marti *et al.*, 2018). Les branchies constituent également un réservoir de GRA étant un site clé de la respiration et d'échanges avec l'environnement

pour les poissons. En Mer Méditerranée, plusieurs souches d'Entérobactéries ont été isolées des branchies et des viscères de sardines (*Sardina pilchardus*), de saupes (*Sarpa salpa*), de chinchards (*Trachurus trachurus*) et d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) (Brahmi *et al.*, 2018). Environ 15 % de ces isolats possédaient le gène *bla*_{TEM} et 11 % le gène *sul1*.

Une co-occurrence des gènes *sul1* et *intl1* a été constatée dans 46,8 % des échantillons marins analysés. Ces résultats étaient cohérents avec les résultats d'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les prélèvements d'eau de mer (résultats obtenus dans le Chapitre II), étant donné que les gènes *sul1* et *intl1* sont majoritairement localisés au sein des intégrons de classe 1. De plus, les abondances absolues de ces deux gènes étaient fortement corrélées entre elles dans les échantillons d'eau de mer et de phytoplancton selon l'analyse des corrélations que nous avons effectué. Une co-occurrence des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla*_{TEM}, *sul1* et *intl1* a été observée dans au moins un échantillon de chaque matrice excepté dans les mollusques bivalves. Cette co-occurrence était associée à une plus forte abondance des gènes pouvant démontrer une plus forte contamination des zones où ces échantillons ont été prélevés. L'échantillon de zooplancton présentant cette co-occurrence des quatre gènes a été prélevé au niveau de la Côte Ouest des Pays-Bas, la zone où nous avons constaté une plus forte contamination de l'eau de mer par les gènes *sul1* et *intl1*. Trois échantillons de phytoplancton présentaient une co-occurrence des quatre gènes et ont été prélevés en Manche Est, près de la Côte Est de l'Angleterre et même au Centre de la Mer du Nord. Cette co-occurrence au sein des échantillons de phytoplancton a été appuyée par une forte corrélation entre ces quatre gènes. Ces résultats étaient assez différents de ceux observés par Xue *et al.* (2021) qui ont mis en évidence une corrélation partielle entre les gènes *intl1* et *sul1* ainsi qu'une corrélation très faible du gène *intl1* avec les gènes *tetA*, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-4} et *bla*_{SHV} associés aux communautés de phytoplancton et de zooplancton. Cependant, leur étude portait sur un système fluvial en Chine donc présentant des caractéristiques, des impacts anthropiques et des populations bactériennes différents de l'environnement marin.

L'abondance totale des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les diverses matrices environnementales nous a permis d'observer des disparités dans la contamination des zones selon la nature de l'échantillon analysée. Globalement, les zones de la Manche Est et de l'Embouchure de la Tamise étaient caractérisées par une contamination plus importante des échantillons marins par la résistance aux antimicrobiens alors que les zones de la Côte du Nord des Pays-Bas et du Centre de la Mer du Nord avaient un niveau de contamination moins élevé. Ces résultats montrent que les échantillons ont potentiellement été impactés de manière différente par des sources de contamination de diverses origines. La plus forte contamination au niveau de la Manche Est pouvait s'expliquer par un trafic maritime intense dans ces eaux et la présence de plusieurs ports au niveau des côtes. Une contamination plus importante des mollusques bivalves par les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens a d'ailleurs été observée au large des villes de Fécamp et de Le Touquet-Paris-Plage, deux secteurs caractérisés respectivement par les rejets du port de plaisance de Fécamp et de la Canche, un long fleuve côtier exposé à de nombreux affluents dans le Pas-de-Calais. La zone de l'Embouchure de la Tamise est principalement impactée par les effluents de la Tamise, le plus long fleuve d'Angleterre qui réceptionne de nombreux affluents potentiellement contaminés par la résistance aux antimicrobiens. La contamination de l'Embouchure de la Tamise observée dans cette étude fait également suite à l'actualité concernant les déversements d'eaux usées non traitées par le Royaume-Uni dans les rivières et la mer. Selon une norme législative britannique, en cas de fortes pluies comme en août 2022 par exemple, les compagnies des eaux usées sont dispensées de traiter les eaux usées et ont la possibilité de les rejeter en mer près des côtes. Entre 2016 et 2021, il a été estimé qu'environ 1,2 millions de déversements en mer ont eu lieu dont 400 000 en 2021 pouvant entraîner une pollution des eaux côtières par des BRA et GRA d'origine fécale entre autres. Nous avons également observé une contamination des échantillons de phytoplancton et de la peau des poissons plats dans la zone du Centre de la Mer du Nord théoriquement sujette à peu d'impacts anthropiques. Comme nous l'avons développé dans la partie discussion du Chapitre II, la présence de plateformes offshore dans cette zone pourrait jouer un rôle dans la propagation des GRA par les différents

effluents et/ou les animaux marins contaminés par les résistances aux antimicrobiens qui sont attirés par ces plateformes. Cela démontre la complexité des études dans des milieux aussi vastes que la Manche et la Mer du Nord dans lesquels il est difficile de relier les niveaux de contamination à la proximité des côtes et des rejets d'origine terrestre tout en considérant l'impact des activités en mer et des courants marins. Ces différences dans l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens selon la zone d'étude et la nature de l'échantillon considéré peuvent en effet traduire une dissémination importante des GRA dans l'environnement marin.

Les bactéries sont l'un des acteurs majeurs impliqués dans la dissémination des GRA dans l'environnement. Afin d'estimer cette population microbienne dans chaque nature d'échantillon prélevé dans le milieu marin, le gène bactérien *tuf* a été quantifié. Ce gène a pu être quantifié dans l'ensemble des échantillons de phytoplancton, de chair de mollusques bivalves, de peau et de branchies de poissons plats avec des abondances qui variaient peu selon les zones de prélèvements. De plus, nous avons mis en évidence par l'analyse des corrélations qu'une abondance élevée du gène *tuf* était en partie associée à une abondance élevée des gènes *sul1* et *int11* dans l'eau de mer et des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associés aux communautés de phytoplancton. L'abondance relative des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par rapport au gène *tuf* a pu être déterminée pour les échantillons de phytoplancton, de chair de mollusques bivalves, de peau et de branchies de poissons plats et avaient une tendance similaire aux abondance absolues. Ces résultats indiquaient que les bactéries quantifiées par le gène *tuf* étaient les principaux hôtes des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. Étonnamment, le gène *tuf* a été peu quantifié dans les échantillons de zooplancton. Ceci pouvait être expliqué par le fait que la totalité de la flore bactérienne associée à ces matrices n'était pas ciblée par le gène *tuf*. Il a été mis en évidence qu'une très faible densité de bactéries était associée aux copépodes, principaux représentants du zooplancton, rendant leur quantification difficile par des méthodes de biologie moléculaire (Brandt *et al.*, 2010). Nous avons d'ailleurs détecté les gènes *tetA* et *bla_{TEM}* dans respectivement 6 et 13 % des enrichissements des échantillons de zooplancton. La faible quantification

du gène *tuf* pouvait provenir d'une hétérogénéité de colonisation du zooplancton par les bactéries étant donné la diversité des espèces composant ce zooplancton comme les larves de vertébrés, d'invertébrés, le krill, les copépodes ... Ces espèces possèdent des systèmes immunitaires différents et peuvent donc être plus ou moins colonisées par des espèces bactériennes assez variées dépendantes du milieu environnemental où elles vivent. Par exemple, des bactéries des genres *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Vibrio* et *Aeromonas* étaient associées à des espèces phytoplanctoniques comme les diatomées et les dinoflagellés et zooplanctoniques (principalement les copépodes) en Mer Ionienne et Tyrrhénienne (Maugeri *et al.*, 2004). Cela montre que ces communautés de plancton peuvent être colonisées et véhiculer les microorganismes dans l'environnement marin. De plus, Chaix *et al.* (2017) ont mis en évidence des souches d'*Aeromonas* présentant des résistances phénotypiques au sulfaméthoxazole (sulfonamide), à l'ertapénème (carbapénème) ainsi qu'à certaines céphalosporines et pénicillines. Ces souches ont été isolées de copépodes à l'embouchure de l'estuaire de la Seine à proximité de Tancarville. Certains isolats d'*Aeromonas* présentaient même une résistance jusqu'à 6 antibiotiques indiquant que le zooplancton peut être un vecteur de bactéries porteuses de GRA. L'étude du phytoplancton et du zooplancton reste cependant complexe en raison de leur mouvement horizontal sur de longues distances via les courants marins et du mouvement vertical du zooplancton qui peut directement impacter l'alimentation des espèces benthiques comme les mollusques bivalves et les poissons plats.

Le gène *tuf* n'a été détecté que dans 3/35 échantillons de viscères de poissons plats. Une présence élevée de sels biliaires et de polysaccharides complexes dans les viscères de poissons a été mise en évidence dans l'étude de Larsen *et al.* (2014). Ces composés sont connus pour agir comme inhibiteurs de la PCR ce qui peut expliquer la faible quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène bactérien *tuf* dans les échantillons de viscères. Nous avons d'ailleurs mis en évidence lors de notre comparaison des méthodes d'extraction de l'ADN bactérien (Chapitre I) un taux de 28 % de faux négatifs lié à la présence d'inhibiteurs dans les échantillons de viscères de poissons plats. Une prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens plus élevée dans les

enrichissements en EPT/EPISA que sans aucune étape d'enrichissement a d'ailleurs été observée principalement pour les viscères de poissons plats. Cela confirme qu'une absence de quantification pouvait être liée aux composés inhibiteurs de la PCR ou à une sensibilité insuffisante des réactions de qPCR pour quantifier un faible nombre de copies des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. Le gène qui a été le plus détecté dans ces échantillons enrichis de viscères était *bla*_{TEM} codant pour la β -lactamase la plus couramment retrouvée dans les Entérobactéries. Des genres bactériens comme *Vibrio*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium* sont les plus fréquemment identifiés dans les viscères de poissons marins tels que le cabillaud (*Gadus morhua*), le flétan (*Hippoglossus hippoglossus*) et la sole (*Solea solea*) (Egerton *et al.*, 2018) et sont souvent caractérisés par une multirésistance aux antimicrobiens (Briet *et al.*, 2018, Thomassen *et al.*, 2022, Clark *et al.*, 2009). Concernant les autres échantillons marins, certains gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ont été quantifiés alors qu'aucune détection dans les enrichissements des échantillons en EPT/EPISA n'a été observée. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. Premièrement, il a été mis en évidence que seulement 1 % des bactéries présentes dans l'environnement seraient cultivables en laboratoire, le reste étant dans un état viable mais non cultivable ou en mort cellulaire (Bloomfield *et al.*, 1998). Les enrichissements en EPT et en EPISA que nous avons faits n'étaient peut-être pas des conditions optimales (milieu, température et temps d'incubation) pour revivifier et développer toutes les bactéries stressées présentes dans les échantillons et porteuses des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. Il faudrait alors tester et optimiser les conditions de culture des bactéries dans des échantillons complexes comme ceux analysés dans ces travaux. Deuxièmement, les GRA dans l'environnement marin peuvent également être encapsidés au sein de bactériophages qui sont considérés comme l'entité biologique dominante dans l'environnement, jouant un rôle majeur dans la dissémination par le transfert des GRA par transduction (Wommack and Colwell, 2000, Blanco-Picazo *et al.*, 2020). L'analyse moléculaire des particules virales isolées des échantillons marins permettrait de confirmer cette hypothèse. L'analyse

de l'ADN extracellulaire permettrait également de caractériser son rôle dans le portage et la dissémination des GRA.

Afin d'évaluer l'impact potentiel des facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement marin sur l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associés aux échantillons prélevés à la surface de la mer, une analyse de corrélations a été effectuée. La turbidité et la saturation en oxygène étaient positivement corrélées avec l'abondance des gènes *sul1* et *int11* dans l'eau de mer ainsi qu'avec l'abondance des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associée au phytoplancton. La mesure de la turbidité près de la surface reflétait la présence de matière biotique en suspension tels que les microorganismes mais également le phytoplancton et le zooplancton sur lesquels les microorganismes peuvent s'agréger. La turbidité peut également indiquer de la matière abiotique comme les microplastiques qui sont reconnus comme étant un hotspot pour les GRA portés par les BRA qui s'agrègent sur ces particules (Liu *et al.*, 2021). Une forte turbidité exprimée par une concentration importante de cellules phytoplanctoniques serait à l'origine d'une augmentation du processus de photosynthèse en plus d'une quantité élevée de microorganismes associés au phytoplancton. Cela expliquerait la forte corrélation entre l'abondance absolue du gène bactérie *tuf*, la turbidité, la saturation en oxygène et la concentration en algues. De plus, une forte turbidité limiterait la pénétration des rayons UV dans l'eau constituant ainsi une protection des microorganismes et de l'ADN sous forme libre de la dégradation. Des eaux avec une forte turbidité liée à la présence de microorganismes et de communautés phytoplanctoniques constitueraient donc un milieu propice à l'occurrence et au transfert des GRA entre les bactéries. Concernant les échantillons de zooplancton, nous avons observé peu d'impact des facteurs environnementaux sur l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. Seules la turbidité et la concentration en algues étaient positivement corrélées à l'abondance du gène *int11*. Des observations similaires ont été constatées dans l'étude de Reichert *et al.* (2021) qui a été réalisée sur des eaux de rivières en Allemagne et dans laquelle l'abondance des gènes de résistance *bla_{TEM}*, *sul1*, *tetM* et *ermB* était fortement corrélée à la turbidité. De même, Chen *et al.* (2020) ont mis en évidence au niveau d'un

estuaire en Chine qu'une forte turbidité de l'eau était associée à des abondances plus élevées des gènes *sul2*, *sul3*, *tetW* ou encore du gène *intl1* impliquant que la matière particulaire en suspension dans l'eau pouvait être un réservoir de GRA. La saturation en oxygène mesurée dans notre étude pourrait également être un facteur important dans le maintien des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin que ce soit en suspension dans l'eau ou associés aux communautés de phytoplancton. De même, Tao *et al.* (2016) ont montré que l'oxygène pouvait avoir un impact sur la structure des communautés microbiennes dans les systèmes de traitement des eaux usées notamment dans les proportions des bactéries des genres *Xanthomonas*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Porphyromonas*. L'oxygène serait donc un facteur environnemental favorisant la croissance de certaines espèces bactériennes potentiellement porteuses de GRA. Une expérience *in vitro* menée par Rysz *et al.* (2013) a permis de mettre en évidence que la maintenance de souches d'*E. coli* porteuses du gène de résistance *tetC* sur un plasmide était favorisée en condition aérobie plutôt qu'anaérobie. Aucune corrélation n'a été observée entre la concentration en algues et l'abondance des gènes *sul1*, *intl1* et *tuf* associés à l'eau de mer. Mais nous avons démontré une corrélation significative entre l'abondance des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène *tuf* et la concentration en algues mesurée dans les communautés de phytoplancton. Cette mesure de la concentration en algues comprenait les algues vertes, les cyanobactéries, les diatomées et les cryptophytes qui sont les principaux représentants du phytoplancton. Une concentration élevée de cellules phytoplanctoniques serait donc associée à une plus forte abondance de la population microbienne ainsi qu'à une plus forte abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. Cette observation était cohérente avec l'étude de Wang *et al.* (2020) réalisée sur l'occurrence de GRA dans des cyanobactéries prélevées dans un lac en Chine. Ils ont mis en évidence que les cyanobactéries étaient associées à des abondances élevées des gènes *intl1*, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetB*, *bla_{TEM}*, *qnrB* et *strA*, jusqu'à $1,0 \cdot 10^6$ copies/g de cellules de cyanobactéries montrant ainsi que ces algues constituent une source de GRA et d'EGM. Leur étude a également permis de mettre en évidence que les GRA associés à ces cyanobactéries étaient relativement stables dans

l'eau à faible température et qu'une forte concentration en cyanobactéries était propice aux transferts conjugatifs de ces résistances. De plus, nous avons observé un effet négatif de la salinité sur l'abondance des gènes *sul1*, *int11* et *tuf* associés à l'eau de mer. Ces résultats étaient cohérents avec ceux observés par Tan *et al.* (2019) qui ont montré *in vitro* que l'abondance des gènes impliqués dans la résistance aux antimicrobiens comme *tetR*, *acrA*, *acrB*, *mexF* et *mphA* diminuait significativement au sein des communautés bactériennes à mesure que la salinité augmentait. Ils ont également mis en évidence une diminution de l'abondance de gènes de transposases (*tnpA-02* à *tnpA-07*) ainsi qu'une diminution de la fréquence de transfert de plasmides résistants par conjugaison. Dans notre étude, les variations de salinité dans la mer auraient un impact indirect sur l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens en ayant un effet direct sur la composition des communautés microbiennes porteuses de ces gènes. Nous n'avons mis en évidence aucun impact significatif d'une variation du pH, de la pression et de la température de l'eau sur l'abondance des gènes *sul1* et *int11* dans l'eau de mer. Cependant, ces trois facteurs abiotiques ont démontré une corrélation négative avec l'abondance de la population bactérienne estimée par le gène *tuf* indiquant qu'une augmentation du pH, de la pression et de la température de l'eau pourrait induire un stress dans les bactéries environnementales et entraîner une baisse de leur abondance ou une modification de la diversité bactérienne ou de leur viabilité. Concernant l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène *tuf* associés aux communautés de phytoplancton, une corrélation négative avec le pH et la température a été observée. Mais contrairement aux échantillons d'eau de mer, l'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et de la population bactérienne était positivement corrélée à la pression de l'eau. Ces résultats différents de ceux des échantillons d'eau pourraient être expliqués par un attachement des bactéries sur les communautés de phytoplancton sous forme de biofilm et qui résisteraient alors mieux aux stress environnementaux comme une variation de pression. L'étude menée *in vitro* par Morrissey *et al.* (2021) sur des algues vertes marines prélevées en Mer Adriatique a permis de mettre en évidence un effet significatif d'une variation de température d'environ 6 °C (soit une variation de 2 °C de plus que dans notre étude) sur

la diversité microbienne associée à ces algues montrant ainsi que le microbiome algal était dynamique face à ce stress environnemental. Ces résultats suggèrent que certains facteurs biotiques et abiotiques liés à l'environnement marin seraient susceptibles d'influencer l'occurrence des GRA et des EGM parmi les communautés de plancton mais également dans l'eau de mer. Xue *et al.* (2021) ont souligné des effets directs et indirects des communautés de phytoplancton et de zooplancton dans la dynamique de la résistance aux antimicrobiens. L'effet direct est caractérisé par la sécrétion de carbone organique par ces communautés de plancton qui protègent les GRA de la dégradation par des nucléases présentes dans l'environnement. Concernant l'effet indirect, il a été mis en évidence que la matière organique produite par le plancton est une source de nutriments pour les bactéries, hôtes principaux des GRA, qui viendraient alors se fixer et se développer à leur surface. Tous les facteurs biotiques et abiotiques analysés dans notre étude auraient donc une influence sur la croissance des bactéries dans l'eau de mer et associées au phytoplancton ce qui provoquerait les variations d'abondance des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens que nous avons observé.

Des régressions locales et linéaires ont été modélisées afin d'étudier une potentielle accumulation des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens à chaque niveau trophique. Etant donné que les unités de mesure de l'abondance absolue des gènes différaient selon la nature de l'échantillon (cm², gramme, ml d'échantillon, L d'eau), l'abondance relative par rapport au gène bactérien *tuf* a été utilisée. Concernant les gènes *tetA* et *bla*_{TEM}, les régressions locales étaient assez limitées en raison d'une faible prévalence dans les différents échantillons. Cependant, nous avons noté une accumulation de ces gènes associés à la population microbienne qui était plus importante au niveau des peaux et des branchies de poissons plats ainsi que dans la chair de mollusques bivalves par rapport à l'eau de mer et au phytoplancton. De même, une accumulation du gène *su11* a été observée au sein des mêmes échantillons alors que le gène *int11* montrait différentes tendances selon l'échantillon analysé. En effet, une accumulation de ce gène au niveau des branchies des poissons plats, un phénomène de dilution au niveau de la chair des mollusques bivalves mais une abondance relativement constante au niveau de la peau des poissons plats a été observée. Dans la mesure où les

mollusques bivalves sont des suspensivores, il est maintenant reconnu que ces espèces marines filtrent, retiennent et concentrent les particules en suspension dans la colonne d'eau faisant d'eux des candidats idéals comme indicateurs de contamination des environnements aquatiques (Grevskott *et al.*, 2017). Des contaminants tels que les bactéries libres, les bactéries associées au plancton dont les mollusques se nourrissent, ou encore les GRA sont donc accumulés au niveau de leur chair ce qui a été observé dans notre étude concernant les gènes *tetA*, *bla*_{TEM} et *sul1*. De même, le rôle des branchies des poissons dans l'accumulation de contaminants chimiques a déjà été mis en évidence, par exemple dans l'accumulation de microplastiques (Yin *et al.*, 2022) ou encore de métaux lourds (Fakankun *et al.*, 2012). Sachant que les poissons plats sont en contact très étroit avec leur environnement, les microorganismes présents dans l'eau de mer et les sédiments sont retrouvés au niveau de la peau et des branchies des poissons. Notamment, une similarité dans la diversité bactérienne a été démontrée entre l'eau de mer, la peau et les branchies de maquereaux (Minich *et al.*, 2020). Les viscères des poissons n'ont pu être incorporés dans les modèles de régression étant donné la faible quantification des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène bactérien *tuf*. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que la diversité microbienne et la diversité des GRA présentes dans le système digestif des poissons refléterait également ce qui est observé dans les eaux marines et dans les espèces marines dont se nourrissent les poissons plats. De même, les communautés de zooplancton n'ont pu être intégrées aux modèles pour les mêmes raisons. Néanmoins, la majorité des espèces de zooplancton jouent un rôle important dans le transport des bactéries le long de la colonne d'eau par migration verticale, se déplaçant vers les eaux profondes pour échapper aux prédateurs. Les BRA et les GRA sous forme libre dans la colonne d'eau peuvent se fixer sur les matières en suspension comme la matière organique et le phytoplancton formant ainsi des agrégats qui vont descendre dans les eaux profondes. Mais ces BRA et GRA peuvent également être ingérés par des organismes filtreurs tels que certaines espèces de zooplancton et être libérés dans les eaux plus profondes par les matières fécales ou être ingérés par les organismes consommateurs de ce zooplancton comme les mollusques bivalves ou les poissons de petite taille. Tout ceci formerait un gradient descendant le long de la colonne d'eau.

De plus, les microorganismes et les GRA peuvent également se déplacer de manière horizontale lorsqu'ils sont associés à des espèces marines migratrices de plus grande taille telles que les poissons entraînant alors leur dispersion sur de longues distances en complément des courants marins. Afin d'améliorer la qualité des modèles construits, il faudrait harmoniser les prélèvements effectués afin d'avoir une même unité de mesure comme la masse d'échantillon analysé et de réaliser l'ensemble des prélèvements au sein d'une même station de prélèvement soumise à une même source de contamination par la résistance aux antimicrobiens. De plus, nous sommes conscients de la variabilité de contamination de nos échantillons dans la mesure où les échantillons de poissons plats et de mollusques bivalves étaient composés de 10 individus et les échantillons de plancton de plusieurs milliers de cellules de phytoplancton/zooplancton. Néanmoins, les modèles réalisés dans cette étude ont permis d'obtenir une première approche de l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les différents niveaux trophiques. Ces modèles constituent une première piste intéressante concernant le rôle des réseaux trophiques dans l'accumulation des GRA.

V. Conclusion

- La **prévalence totale** (eau de pleine mer et échantillons du réseau trophique benthique) des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord était de **81,4 %**.
- La **prévalence** des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons du réseau trophique benthique était de **63,8 %** pour le gène *intl1*, de **59,6 %** pour le gène *sul1*, de **47,5 %** pour le gène *tetA* et de **46,1 %** pour le gène *bla_{TEM}*.
- Les gènes *sul1/intl1* ont été les indicateurs les plus quantifiés dans les échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats avec une **co-occurrence** dans 46,8 % des échantillons.
- Les gènes *tetA/bla_{TEM}* ont été peu quantifiés dans les échantillons mais avaient une **prévalence** élevée dans les enrichissements des échantillons notamment des **branchies** et des **viscères** de poissons plats.
- Les **gènes indicateurs** de résistance aux antimicrobiens étaient majoritairement portés par la **population microbienne** mais pouvaient également se **propager** dans l'environnement potentiellement sous forme d'**ADN libre** ou associés aux **bactériophages**.
- Une **contamination** plus **importante** des échantillons a été constatée en **Manche Est**, une zone considérée comme une véritable autoroute de la mer en raison d'un **trafic maritime intense** et impliquant différents **rejets** dans l'environnement marin ainsi qu'à **l'Embouchure de la Tamise** qui est soumise aux effluents du fleuve.
- Certains **facteurs abiotiques** tels que la **turbidité** et la **saturation en oxygène** du milieu marin étaient impliqués dans le **maintien** des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les communautés de **phytoplancton** et dans **l'eau de mer** alors que les variations de **pH** et de **salinité** avaient un effet **négatif** sur l'occurrence des gènes.

- **L'accumulation** des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associés à la **population microbienne** était plus prononcée au niveau des **branchies** de **poissons plats** et de la **chair** des **mollusques bivalves** étant donné leur rôle dans la filtration d'eau et leur capacité de concentrer les polluants. Une **légère accumulation** des gènes a également été notée au niveau de la **peau** des **poissons plats** reflétant une contamination non négligeable de la surface des poissons par des GRA pouvant provenir d'une **sédimentation** des gènes dans les eaux profondes, de la présence des gènes au niveau des **sédiments** ou d'un **transfert des gènes** à la flore commensale des poissons.
- Les gènes *sul1* et *int1* seraient de **bons indicateurs** de contamination de **l'environnement marin** par la résistance aux antimicrobiens tant au niveau de l'eau de mer que dans les espèces représentatives d'un réseau trophique benthique.

Chapitre IV : Mise au point d'une
méthode de métagénomique
fonctionnelle sur des souches de *Vibrio
parahaemolyticus* isolées de produits de
la pêche pour l'identification des gènes
de résistance aux antimicrobiens

I. Contexte

Pour nos travaux, nous avons sélectionné quatre gènes indicateurs *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans une liste de 16 gènes décrits par Berendonk *et al.* (2015) sur la base des connaissances actuelles de la contamination du milieu marin par les GRA mais principalement sur celles du milieu terrestre qui sont beaucoup plus importantes. Dans les Chapitres II et III, nous avons mis en évidence une prévalence globale de 72,2 % des 4 gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* par qPCR dans l'eau de mer et de 83,7 % dans les échantillons représentatifs du réseau trophique benthique prélevés dans la Manche et la Mer du Nord. Les abondances absolues de ces gènes variaient selon la nature de l'échantillon et la zone de prélèvement. A la vue de nos résultats, les deux gènes *sul1* et *int11* peuvent paraître intéressants pour être des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens des réseaux trophiques benthiques mais il faut conforter ces travaux préliminaires par d'autres campagnes spatio-temporelles. Elargir à d'autres réseaux trophiques et voir si d'autres gènes pourraient être plus pertinents comme indicateurs de la contamination antimicrobienne de l'environnement marin. De plus, de nouveaux gènes, pas encore décrits, pourraient être encore plus intéressants comme gènes indicateurs de l'environnement marin. Pour nos travaux, nous avons utilisé des méthodes classiques de qPCR pour détecter/quantifier les quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens cibles dans des échantillons environnementaux. Mais ces méthodes permettent de cibler uniquement des gènes déjà identifiés et dont les séquences génétiques sont connues pour pouvoir dessiner des couples d'amorces spécifiques. De même, des techniques plus récentes comme la métagénomique par séquençage haut-débit de l'ADN environnemental permet d'obtenir des informations sur le résistome en identifiant des gènes déjà présents dans les bases de données. Ces techniques ont l'inconvénient de ne pas pouvoir identifier de nouveaux GRA qui pourraient être pertinents comme indicateurs de la contamination antimicrobienne de l'environnement.

Une technique très récente, la métagénomique fonctionnelle, commence un peu à se développer. C'est un outil puissant et innovant pour caractériser le résistome et le mobilome de

matrices environnementales indépendamment de la culture des microorganismes. De plus, elle permet de caractériser de nouveaux gènes de résistance à partir de l'ADN extrait d'échantillons complexes comprenant la fraction cultivable mais aussi non cultivable des microorganismes et l'ADN libre, ce qui est une perspective très intéressante pour les échantillons environnementaux où la flore cultivable n'est que de 1 % et encore assez peu identifiée. Mais malgré ces importants avantages, cette technique est encore très peu utilisée de nos jours car beaucoup d'étapes de préparation sont nécessaires pour son application sur des échantillons complexes. En effet, l'ADN total doit être extrait de l'échantillon complexe et fragmenté avant de le cloner dans un vecteur de clonage comme un plasmide qui sera ensuite transformé dans un hôte bactérien par exemple. Ces bactéries constituent des bibliothèques métagénomiques qui sont criblées en présence d'antibiotiques à une concentration capable d'inhiber la croissance de l'hôte sauf s'il possède un gène de résistance cloné dans le plasmide. Le fragment d'ADN est alors isolé puis séquencé afin d'identifier le gène responsable de la résistance. Quelques exemples de publications dans lesquelles la métagénomique fonctionnelle a été utilisée pour caractériser de nouveaux GRA dans l'environnement et les animaux marins sont indiqués dans le Tableau 29. Ces études ont permis d'identifier de nouveaux gènes de résistance aux β -lactamines, à la rifampicine, au chloramphénicol, aux aminoglycosides et à la tétracycline.

Cependant, les auteurs de ces publications ont utilisé des protocoles très différents les uns des autres et aucune information n'est donnée sur la validation de leur protocole de métagénomique fonctionnelle ni sur la mise en place de contrôles permettant de valider les étapes critiques de cette méthode. Il a donc été difficile de définir la perte d'informations génétiques liée aux nombreuses étapes de la méthode dans ces études ainsi que la répétabilité, la reproductibilité et la robustesse des protocoles employés. En effet, cette méthode comporte des étapes critiques telles que la fragmentation de l'ADN en fragments de tailles optimales pour contenir des GRA ou encore l'étape de transformation bactérienne des plasmides recombinants. Toutes les étapes successives entre l'extraction de l'ADN et le criblage des bibliothèques métagénomiques sur antibiotiques peuvent conduire à une perte de l'information génétique et donc à une identification seulement partielle du résistome

présent dans les échantillons complexes environnementaux. Il est donc nécessaire d'avoir recours à une mise au point de la méthode de métagénomique fonctionnelle sur des souches bactériennes déjà caractérisées génétiquement par un séquençage complet du génome pour valider la méthode sur des gènes déjà connus. Il apparaît donc intéressant de travailler sur des souches de *V. parahaemolyticus* qui est une espèce pathogène alimentaire indigène du milieu marin, isolée principalement de crustacés et de coquillages. Les bactéries du genre *Vibrio* ont une certaine plasticité génétique avec deux chromosomes et un certain nombre de plasmides. Elles peuvent acquérir des EGM et elles possèdent des intégrons chromosomiques. Ce genre bactérien a été proposé comme indicateur de la résistance aux antibiotiques pour le milieu aquatique (Banerjee and Farber, 2018).

L'objectif de ce travail a été de mettre au point une méthode de métagénomique fonctionnelle sur les souches de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629, 13-B3PA-2931 et 16-B3PA-0006 qui pourra être par la suite appliquée à des échantillons complexes et permettra l'identification de gènes potentiellement pertinents comme indicateurs de la contamination antimicrobienne de l'environnement marin. Ces souches ont été isolées de produits de la pêche et leurs résistances phénotypiques aux antibiotiques ont été caractérisées dans le cadre de la thèse ANTIBIOFISH (Briet, 2018).

Dans un premier temps, les bibliothèques métagénomiques des souches de *Vibrio* ont été construites en clonant leur ADN dans un vecteur plasmidique et en transformant les plasmides recombinants dans un hôte bactérien. Pour cela, différentes conditions de fragmentation de l'ADN et deux méthodes de transformation bactérienne ont été comparées.

Ensuite, un criblage a été appliqué à ces bibliothèques métagénomiques avec des antibiotiques d'importances critiques et élevées en santé humaine afin d'identifier les gènes responsables des résistances phénotypiques des souches de *Vibrio* et de comparer ces résultats aux données obtenues par séquençage complet du génome de ces souches. Pour cela, différentes bases de données (NCBI,

CARD, ARG-ANNOT, ResFinder, ResFinderFG) ont été comparées pour identifier les GRA isolés par métagénomique fonctionnelle.

Tableau 29 : Exemples d'études ayant utilisé la métagénomique fonctionnelle pour caractériser les gènes de résistance aux antimicrobiens dans des matrices environnementales.

Références	(Marathe <i>et al.</i> , 2018)	(Martiny <i>et al.</i> , 2011)	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)	(Su <i>et al.</i> , 2014)
Echantillons analysés	Sédiments de rivière (Inde)	Fèces de goélands (Etats-Unis)	Effluents industriels et boues d'épuration (Angleterre)	Sols agricoles (Chine)
Plasmides	pZE21-MCS	pSMART-HCkan	pCF430	pUC19
Tailles des librairies / inserts	<u>Librairies</u> : 1 à 4 Gb <u>Inserts</u> : 0,5 à 3,5 kb	<u>Librairies</u> : ? <u>Inserts</u> : 3 kb	<u>Librairies</u> : 0,6 à 3,6 Gb <u>Inserts</u> : 3 à 9 kb	<u>Librairies</u> : 0,4 Gb <u>Inserts</u> : 2 kb
Gènes identifiés	<i>qnrB1</i> , <i>S2</i> , <i>VC1</i> , <i>D</i> (ciprofloxacine) <i>bla</i> _{CMY-4} (ampicilline) <i>bla</i> _{GES-2} , <i>bla</i> _{GES-13} , <i>bla</i> _{GES-5} (ampicilline et ceftazidime) <i>sul2</i> (sulfaméthoxazole) <i>tetA</i> (tétracycline)	9 gènes codant pour des β-lactamases 6 gènes de résistance à la tétracycline 2 pompes à efflux multirésistantes		
Nouveaux gènes identifiés	<i>bla</i> _{RSA1} , <i>bla</i> _{RSA2} , <i>bla</i> _{RSD1} , <i>bla</i> _{RSD2} , <i>bla</i> _{RSD3} (ampicilline) <i>bla</i> _{RSC1} (ampicilline et ceftazidime) <i>RSagr1</i> (amikacine)	31 gènes non annotés	5 gènes codant pour des β-lactamases : <i>bla</i> _{CX1} , <i>bla</i> _{RM3} , <i>bla</i> _{H33} , <i>bla</i> _{AM1} , <i>bla</i> _{CM1}	Gènes impliqués dans la résistance à la rifampicine (6), au chloramphénicol (11), aux aminoglycosides (25) et à la tétracycline (7)

II. Matériel et méthodes

II.1. Sélection des souches bactériennes et du vecteur plasmidique

Nous avons utilisé les souches de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629, 13-B3PA-2931 et 16-B3PA-0006 pour mettre au point la méthode de métagénomique fonctionnelle. Ces souches ont été isolées de crevettes importées et leurs résistances phénotypiques aux antimicrobiens ont été caractérisées

dans le cadre de la thèse ANTIBIOFISH (Briet, 2018). Les GRA portés par ces souches ont été identifiés par un séquençage du génome complet (Illumina) réalisé par la société Genoscreen (Lille, France). L'analyse génétique de la souche 16-B3PA-0006 a déjà été réalisée dans la publication de Briet *et al.* (2018) et l'analyse des souches 12-B3PA-1629 et 13-B3PA-2931 a été réalisée dans cette étude en interrogeant la base de données ResFinder.

Le plasmide pZE21-MCS a été utilisé comme vecteur plasmidique pour la création des bibliothèques métagénomiques et était porté par la souche d'*E. coli* DH5 α (Expressys, Bammental, Allemagne) (Lutz and Bujard, 1997). La carte et la séquence nucléotidique complète de ce plasmide sont indiquées en Annexe XXIII. Ce plasmide possède entre autre le gène de l'origine de réplication *colE1*, le gène de résistance à la kanamycine pour la sélection du plasmide, le promoteur $P_{\text{LtetO-1}}$ et un site multiple de clonage (MCS) pour le clonage des fragments d'ADN.

II.2. Construction des bibliothèques métagénomiques

Les différentes étapes décrivant la construction des bibliothèques métagénomiques à partir des trois souches de *V. parahaemolyticus* sont résumées dans la Figure 40.

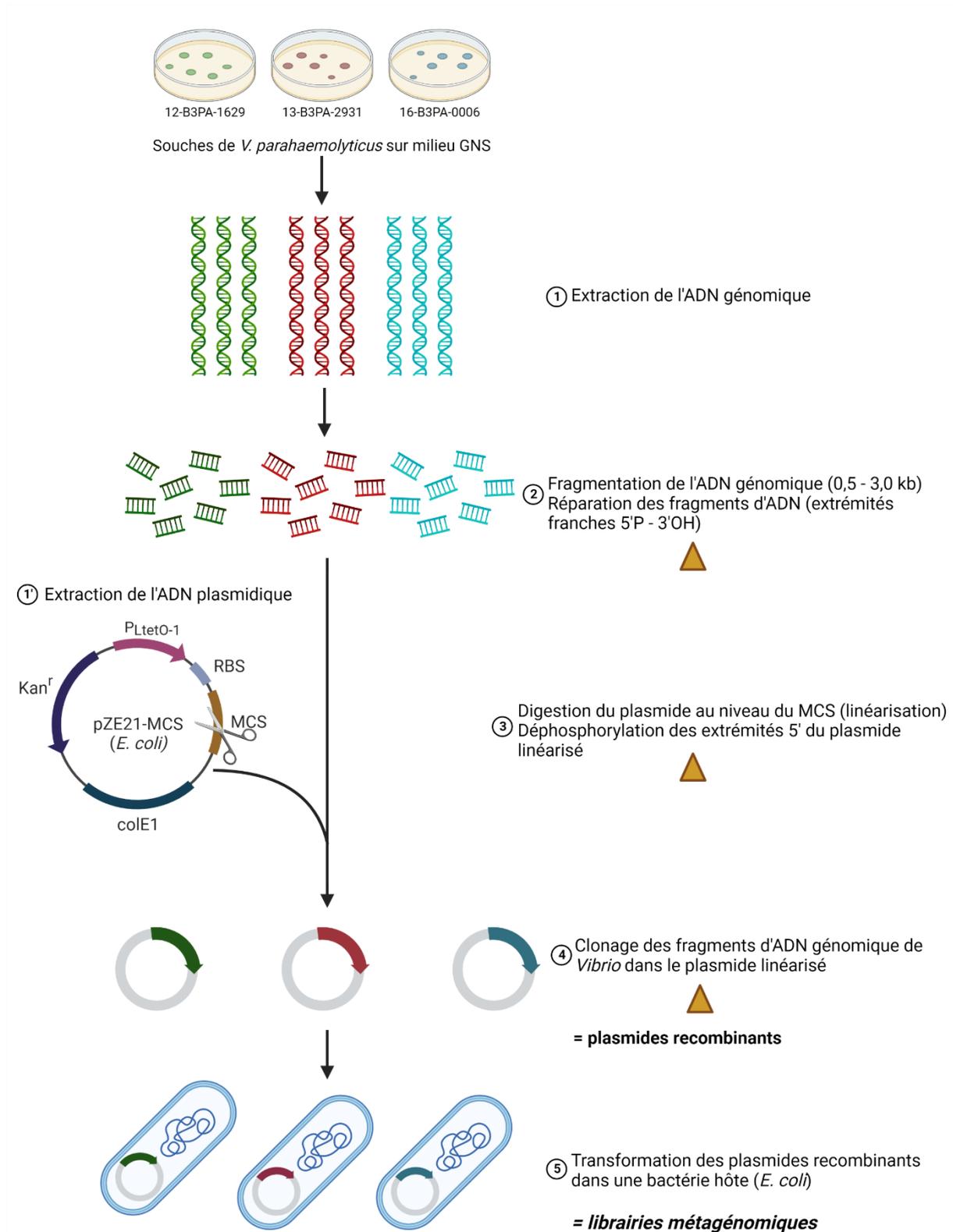


Figure 40 : Schéma décrivant les étapes de la construction des bibliothèques métagénomiques à partir des souches de *V. parahaemolyticus*. Les triangles jaunes indiquent une étape de purification de l'ADN après les réactions enzymatiques. Ce schéma a été réalisé avec BioRender.com sous le numéro d'agrément RD24C9PAOF.

II.2.A. Etape 1 : Extraction de l'ADN génomique de *Vibrio* et plasmidique d'*E. coli*

Les souches de *V. parahaemolyticus* ont été cultivées sur des géloses nutritives salées avec 1 % de NaCl (GNS, BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis) pendant 24 h à 37 °C. L'ADN a été directement extrait des colonies isolées sur gélose avec le kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le protocole indiqué dans le Chapitre I partie III.1.B.

La souche d'*E. coli* DH5α portant le plasmide pZE21-MCS a été isolée sur un milieu LB gélosé (Lysogeny Broth) supplémenté avec 40 ng/μl de kanamycine. La gélose a été incubée pendant 18 h à 37 °C puis une colonie a été repiquée dans 10 ml de bouillon LB contenant 40 ng/μl de kanamycine. La composition de ces milieux est indiquée en Annexe XXIV. Après une incubation de 18 h à 37 °C, l'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit QIAprep Miniprep (Qiagen) selon le protocole décrit dans le Chapitre I partie III.1.B.

Les extraits d'ADN ont été dosés au spectrophotomètre DS-11 (Denovix, Wilmington, Etats-Unis) puis conservés à -20 °C.

II.2.B. Etape 2 : Fragmentation et réparation de l'ADN génomique de *Vibrio*

L'ADN génomique des souches de *V. parahaemolyticus* a été fragmenté afin de générer des fragments d'ADN d'environ 500 – 3 000 pb. Pour cela, le kit NEBNext dsDNA Fragmentase (New England Biolabs, Ipswich, Etats-Unis) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Le fabricant de ce kit recommande une fragmentation de 5 ng à 3 μg d'ADN pendant 10 à 15 min afin d'obtenir des fragments d'ADN entre 1 000 et 2 000 pb. Nous avons donc choisi d'expérimenter une fragmentation de 1 et 2 μg d'ADN génomique de *V. parahaemolyticus* pendant des temps d'incubation de 5 et 10 min. Le volume réactionnel de 20 μl était donc composé de l'ADN génomique à une quantité de 1 ou 2 μg, 2 μl de tampon de réaction 10X Fragmentase v2, 2 μl de l'enzyme dsDNA Fragmentase et d'eau nuclease free pour compléter le volume. Les mélanges réactionnels ont ensuite été incubés pendant 5 ou 10 min à 37 °C. Afin d'arrêter la réaction enzymatique, nous avons ajouté 5 μl d'EDTA à 0,5 M. Les

tailles des fragments d'ADN obtenus ont été contrôlées sur un gel d'agarose à 1 % (m/v) en faisant migrer en parallèle un marqueur de taille 100 pb (Figure 41). L'ADN fragmenté a ensuite été purifié grâce au kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant.

Les fragments d'ADN purifiés ont par la suite été réparés avec le kit NEBNext End Repair Module (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fabricant. Cette étape a permis de générer des extrémités franches possédant des groupements phosphates aux extrémités 5' et des groupements hydroxyles aux extrémités 3'. L'ADN fragmenté purifié a été ajouté à 10 µl de tampon de réaction NEBNext End Repair 10X, 5 µl du mix enzymatique NEBNext End Repair et de l'eau nuclease-free pour compléter le volume réactionnel à 100 µl. Ce mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur à 20 °C pendant 30 min puis l'ADN réparé a été purifié avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant avant d'être dosé au spectrophotomètre DS-11.

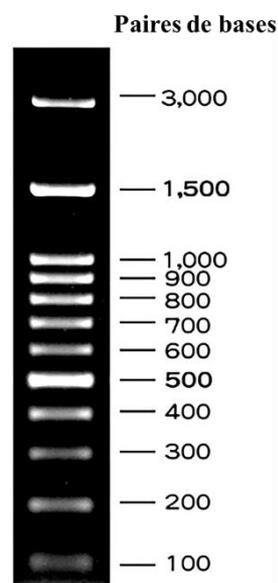


Figure 41 : Marqueur de taille 100 pb.

II.2.C. Etape 3 : Digestion et déphosphorylation du vecteur plasmidique pZE21-MCS

Le plasmide pZE21-MCS a été clivé au niveau du site multiple de clonage par l'enzyme de restriction *HincII* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Pour cliver le plasmide

pZE21-MCS, le mélange réactionnel était composé de 1 µg d'ADN plasmidique, 2 µl de tampon FastDigest 10X, 1 µl de l'enzyme *HincII* FastDigest et d'eau nuclease-free pour compléter le volume final à 20 µl. Ce mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur pendant 5 min à 37 °C puis pendant 5 min à 65 °C pour inactiver l'enzyme. Enfin, l'ADN plasmidique ainsi linéarisé a été purifié avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant puis contrôlé sur un gel d'agarose à 1% (m/v) pour vérifier le bon déroulement du clivage enzymatique. La taille attendue était d'environ 2,3 kb correspondant à la taille totale du plasmide.

Pour déphosphoryler les extrémités 5' du plasmide linéarisé, l'antarctic phosphatase (New England Biolabs) a été utilisée. Le mélange réactionnel était composé d'1 µg d'ADN plasmidique linéarisé, 2 µl de tampon de réaction antarctic phosphatase 10X, 1 µl d'antarctic phosphatase et d'eau nuclease-free pour compléter le volume final à 20 µl. Ce mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur pendant 30 min à 37 °C puis pendant 2 min à 80 °C pour inactiver l'enzyme. L'ADN plasmidique linéarisé et déphosphorylé a été purifié avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant puis dosé au spectrophotomètre DS-11.

II.2.D. Etape 4 : Clonage des fragments d'ADN de *Vibrio* dans le vecteur plasmidique

Pour insérer les fragments d'ADN génomique de *V. parahaemolyticus* au sein du site multiple de clonage du plasmide pZE21-MCS, nous avons utilisé la T4 DNA ligase (Thermo Scientific). Nous avons déterminé un ratio (insert: vecteur) de « 4: 1 » pour réaliser cette ligation. Le mélange réactionnel était constitué d'ADN génomique et d'ADN plasmidique selon le ratio mentionné précédemment, 2 µl de tampon de réaction T4 DNA ligase 10X, 1 µl de l'enzyme T4 DNA ligase, 2 µl de solution PEG 4000 à 50 % et d'eau nuclease-free pour compléter le volume réactionnel à 20 µl. Ce mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur pendant 1 h à 22 °C puis purifié à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. Ces plasmides contenant les fragments d'ADN génomique de *Vibrio* sont les plasmides recombinants.

II.2.E. Etape 5 : Transformation des plasmides recombinants dans l'hôte bactérien *E. coli*

Pour transformer les plasmides recombinants dans la cellule hôte (*E. coli*), nous avons comparé deux techniques : la transformation par choc thermique et la transformation par électroporation.

Pour la transformation par choc thermique, le kit Library Efficiency DH5 α Competent Cells (Invitrogen) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Dans un microtube préalablement réfrigéré à 4 °C, nous avons mélangé 50 μ l de cellules chimio-compétentes d'*E. coli* DH5 α du kit avec 2 μ l de plasmides recombinants. Les tubes ont été incubés sur glace pendant 30 min puis à 42 °C pendant 45 sec et de nouveau sur glace pendant 2 min pour réaliser le choc thermique. Nous avons ajouté 950 μ l de milieu de régénération SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) (Invitrogen) à température ambiante aux cellules. Les tubes ont été incubés pendant 1 h à 37 °C avec une agitation à 225 rpm avant de réaliser des dilutions successives au 1/10 avec du milieu SOC. Ces manipulations ont également été réalisées en remplaçant les 2 μ l de plasmides recombinants par 2 μ l de plasmide pUC19 à 10 pg/ μ l (Invitrogen) servant de témoin de transformation. Nous avons ensuite étalé 100 μ l de cellules contenant les plasmides recombinants ou le plasmide pUC19 et des dilutions 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³ sur des géloses LB, des géloses LB + kanamycine à 40 μ g/ml (pour les cellules contenant le plasmide pZE21-MCS) et sur des géloses LB + ampicilline à 100 μ g/ml (pour les cellules contenant le plasmide pUC19) avant de les incuber pendant 24 h à 37 °C. Les cellules restantes contenant les plasmides recombinants ont été diluées au 1/10 dans du bouillon LB avec 40 μ g/ml de kanamycine puis incubées pendant 24 h à 37 °C. A l'issue de cette incubation, 20 % (v/v) de glycérol ont été ajoutés aux cellules avant de les conserver à -80 °C constituant ainsi les bibliothèques métagénomiques.

Pour la méthode de transformation bactérienne par électroporation, les cellules NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli* (New England Biolabs) ont été utilisées selon les recommandations du fabricant. Sur glace, nous avons mélangé 50 μ l de cellules électro compétentes d'*E. coli* avec 2 μ l de plasmides recombinants dans une cuve d'électroporation 1 mm. Cette cuve a été placée dans un électroporateur Gene Pulser II (BioRad, Hercules, Etats-Unis) et l'électroporation a été réalisée à

2,0 kV, 200 Ω et 25 μ F. Pour une électroporation optimale, la constante de temps devait être comprise entre 4,8 et 5,1 msec et ne pas produire d'arc électrique. A la suite de cette électroporation, les cellules ont immédiatement été régénérées dans 950 μ l de milieu SOC préalablement chauffé à 37 °C puis transférées dans un microtube et incubées pendant 1 h à 37 °C à 225 rpm. Des dilutions successives au 1/10 des cellules régénérées ont été réalisées avec du milieu SOC. Similairement à la transformation bactérienne par choc thermique, nous avons également réalisé cette expérience avec 2 μ l de plasmide pUC19 à 10 μ g/ μ l (New England Biolabs) constituant le témoin de transformation. Un volume de 100 μ l des cellules contenant les plasmides recombinants ou le plasmide pUC19 et des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ont été étalées sur les mêmes géloses mentionnées précédemment puis incubées pendant 24 h à 37 °C. De même, les cellules restantes contenant les plasmides recombinants ont été diluées au 1/10 dans du bouillon LB avec 40 μ g/ml de kanamycine puis incubées pendant 24 h à 37 °C. Nous avons ajouté 20 % (v/v) de glycérol à ces cellules avant de les conserver à - 80 °C constituant ainsi les bibliothèques métagénomiques.

II.2.F. Comparaison des efficacités des deux méthodes de transformation bactérienne

Afin de comparer l'efficacité des deux méthodes de transformation bactérienne utilisées, nous avons estimé le nombre de bactéries ayant intégré le plasmide pZE21-MCS pour chaque méthode en dénombrant les clones s'étant développés en présence de kanamycine. Nous avons également calculé l'efficacité de transformation (E) en UFC/ μ g du plasmide pUC19 selon la formule suivante :

$$E = \frac{\text{nombre de colonies}}{\text{quantité d'ADN}(\mu\text{g})} \times \frac{\text{volume de transformants (ml)}}{\text{volume ensemencé (ml)}} \times \text{facteur de dilution}$$

Ensuite, la taille moyenne des inserts dans les plasmides et la taille totale de chaque bibliothèque métagénomique ont été estimées en réalisant des PCR sur colonies. Pour cela, le couple d'amorces pZE21-colF/pZE21-colR entourant le site multiple de clonage a été utilisé (Tableau 30, Annexe XXIII). Ces réactions de PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50 μ l contenant 5 μ l de PCR Buffer 10X (Qiagen), 0,2 mM de dNTP (Eurobio, Les Ulis, France), 0,4 μ M de chaque amorce (Eurobio),

0,5 µl de la Taq DNA Polymerase à 5 U/µl (Qiagen) et d'eau nuclease-free pour compléter le volume final. Environ 30 clones isolés des géloses LB avec kanamycine ont été piqués individuellement avec un cône de pipette (type p200) et plongés dans le mélange réactionnel. De l'eau nuclease-free a été utilisée comme témoin négatif. Nous avons également utilisé 2 µl d'ADN du plasmide pZE21-MCS initial (sans insert) afin de différencier les plasmides contenant un fragment d'ADN des plasmides vides. L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur iCycler (Biorad) avec les conditions suivantes : une première étape de dénaturation à 95 °C pendant 15 min puis 30 cycles à 94 °C pendant 45 sec, 59 °C pendant 45 sec, 72 °C pendant 2 min et une étape finale d'élongation à 72 °C pendant 10 min. A l'issue des réactions d'amplification, les tailles des amplicons ont été obtenues par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (m/v) en faisant migrer en parallèle un marqueur de taille 100 pb.

Tableau 30 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR ciblant le site multiple de clonage du plasmide pZE21-MCS.

Amorce	Séquence nucléotidique (5' – 3')	Taille de l'amplicon (plasmide vide)	Référence
pZE21-coIF	GATACTGAGCACATCAGCAGGA	321 pb	(Boolchandani <i>et al.</i> , 2017) (Sommer <i>et al.</i> , 2009)
pZE21-coIR	CCTGATTCTGTGGATAACCGTA		
pZE21-seqF	GAATTCATTAAGAGGAGAAAGGT	130 pb	
pZE21-seqR	TTTCGTTTTATTTGATGCCTCTAG		

Pour calculer la taille des bibliothèques métagénomiques (Gb), la formule suivante a été utilisée :

$$\text{Taille (Gb)} = \frac{[\text{TC} \times \left(\frac{\text{TR} - (\text{FR} + \text{NI} + \text{LS})}{\text{TR} - \text{FR}} \right) \times \text{AI}]}{10^9}$$

TC = nombre total de clones (UFC/ml) ; TR = nombre total de réactions PCR ; FR = nombre de réactions ratées (aucune bande) ; NI = nombre de clones possédant un plasmide sans insert (bande à environ 300 pb) ; LS = nombre de clones possédant un plasmide avec un insert < 500 pb (en soustrayant 300 pb) ; AI = moyenne de la taille des inserts (après soustraction de 300 pb).

II.3. Analyse des bibliothèques métagénomiques

Les différentes étapes décrivant le criblage et l'analyse des bibliothèques métagénomiques sont résumées dans la Figure 42.

II.3.A. Etape 6 : Criblage des bibliothèques métagénomiques

Pour le criblage des bibliothèques métagénomiques, nous avons dilué à 1/10 dans du bouillon LB chaque bibliothèque métagénomique conservée avec du glycérol. Nous avons étalé 100 µl de la solution mère et des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} sur une gélose LB contenant 40 µg/ml de kanamycine pour la pression de sélection du plasmide et un des antibiotiques indiqués dans le Tableau 31 à la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire à la concentration inhibant la croissance des souches d'*E. coli* porteuses du plasmide pZE21-MCS sans insert. Les géloses ont ensuite été incubées pendant 24 h à 37 °C.

Tableau 31 : Antibiotiques utilisés pour le criblage des bibliothèques métagénomiques. C3G : céphalosporine de 3^{ème} génération. Les CMI utilisées ont été tirées des travaux de Boolchandani *et al.* (2017) et Su *et al.* (2014).

Antibiotiques	Acronymes	Familles d'antibiotiques	CMI (µg/ml)	Géloses
Céfotaxime	CEF	β-lactamine (C3G)	8	LB
Ciprofloxacine	CIP	Fluoroquinolone	0,5	
Colistine	COL	Polymyxine	8	
Doripénème	DOR	β-lactamine (carbapénème)	16	
Erythromycine	ERY	Macrolide	100	
Tétracycline	TET	Tétracycline	8	
Sulfaméthoxazole	SUL	Sulfonamide	38	Mueller-Hinton (MH)

A l'issue de cette incubation, les clones résistants aux antibiotiques ont été repiqués sur une gélose contenant la kanamycine et l'antibiotique d'intérêt afin de vérifier le phénotype de résistance. Les géloses ont été incubées pendant 24 h à 37 °C et les clones résistants aux antibiotiques ont été dénombrés.

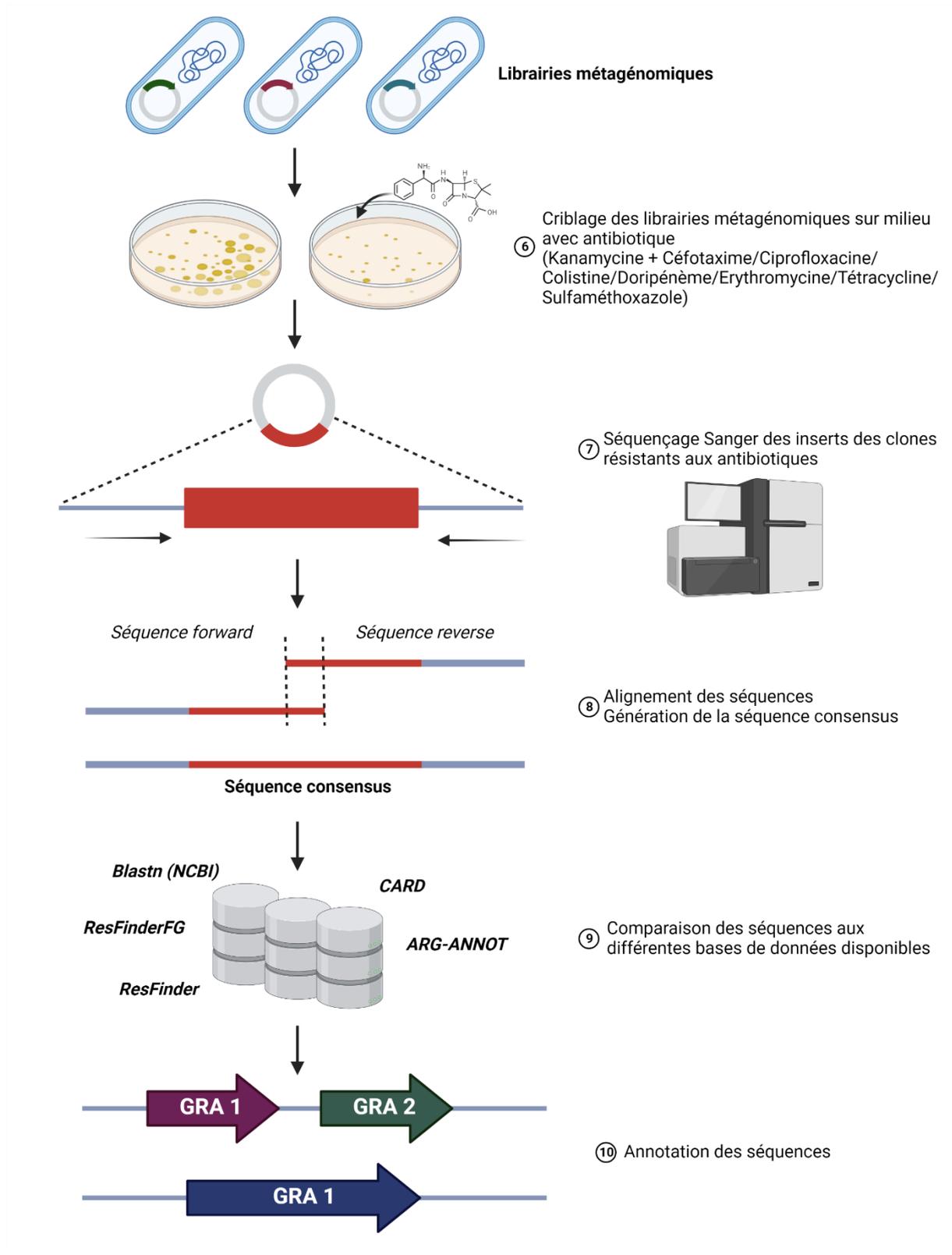


Figure 42 : Schéma décrivant les étapes de criblage des bibliothèques métagénomiques et de l'analyse des séquences (BioRender.com ; numéro d'agrément AG24D8MKTP). GRA : gènes de résistance aux antimicrobiens.

II.3.B. Etape 7 : Séquençage des inserts conférant une résistance aux clones

Des réactions de PCR ont été réalisées sur les clones phénotypiquement résistants aux antibiotiques. Pour ces PCR, les clones ont été prélevés à l'aide d'une oese stérilisée et resuspendus dans 50 µl d'eau physiologique stérilisée. Après une incubation pendant 5 min à 100 °C, les tubes ont été centrifugés pendant 5 min à 13 000 rpm. Le surnageant obtenu a été utilisé comme matrice d'ADN pour les réactions de PCR. Le couple d'amorces pZE21-seqF/pZE21-seqR a été utilisé (Tableau 30, Annexe XXIII). Le mélange réactionnel de 50 µl était composé de 5 µl de PCR Buffer 10X (Qiagen), 0,2 mM de dNTP (Eurobio), 0,4 µM de chaque amorce (Eurobio, Les Ulis, France), 0,5 µl de la Taq DNA Polymerase à 5 U/µl (Qiagen), 5 µl d'ADN et d'eau nuclease-free pour compléter le volume final. L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur iCycler (Biorad) avec les conditions suivantes : une première étape de dénaturation à 95 °C pendant 15 min puis 30 cycles à 94 °C pendant 45 sec, 60 °C pendant 45 sec, 72 °C pendant 2 min et une étape finale d'élongation à 72 °C pendant 10 min. Les tailles des amplicons ont été vérifiées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (m/v) avec un marqueur de taille 100 pb. Ces produits PCR ont ensuite été séquencés par la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne) avec un séquençage de type Sanger en utilisant les amorces pZE21-seqF et pZE21-seqR (Tableau 30).

II.3.C. Etape 8 : Traitement des séquences d'ADN

Les séquences d'ADN obtenues par le séquençage Sanger ont été traitées avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Dans un premier temps, la qualité des séquences a été contrôlée en regardant les chromatogrammes obtenus. Le complément inverse de la séquence obtenue avec l'amorce pZE21-seqR a été généré puis aligné avec la séquence obtenue avec l'amorce pZE21-seqF. La séquence consensus a ensuite été obtenue à partir de cet alignement.

II.3.D. Etape 9 : Analyse des séquences

A partir des séquences consensus obtenues, plusieurs bases de données ont été interrogées : CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database ; <http://card.mcmaster.ca>), ResFinder (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>), ResFinderFG (ResFinder Functional Metagenomics ; <http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinderFG>), ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation ; http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/blast/arg-annot_nt.html) et la base de données nucléotidiques de NCBI (National Center for Biotechnology Information ; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le seuil du pourcentage d'identité a été fixé à 90 % pour les bases de données ResFinder et ResFinderFG. Pour les autres bases de données spécialisées dans les GRA, le seuil de pourcentage d'identité ne pouvait pas être fixé. Les séquences génétiques obtenues par le séquençage complet du génome des souches de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 et 13-B3PA-2931 ont été analysées avec la base de données Resfinder.

III. Résultats

III.1. Identification des gènes de résistance aux antimicrobiens des souches de *V. parahaemolyticus* par séquençage complet du génome

Les gènes de résistance des souches de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629, 13-B3PA-2931 et 16-B3PA-0006 identifiés par le séquençage complet du génome sont présentés dans le Tableau 32. Comme indiqué dans la publication de Briet *et al.* (2018), les gènes de résistance *bla*_{NDM-1} (résistance aux β -lactamines), *floR* (résistance aux amphénicolés), *tetA* (résistance aux tétracyclines), *sul1* et *sul2* (résistance aux sulfamides), *aadA2b*, *strA*, *strB* (résistance aux aminoglycosides) et *dfrA16* (résistance aux diaminopyrimidines) ont été identifiés pour la souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 avec la base de données ResFinder. Nous avons identifié en plus pour cette souche une homologie de 99,06 % avec les gènes *bla*_{CARB-35/43/44} codant pour une β -lactamase de classe A et conférant une résistance aux carbapénèmes. Ces résultats étaient cohérents avec les résistances phénotypiques de la souche 16-B3PA-0006 à l'amoxicilline/acide clavulanique, la ceftazidime, la céfoxitine, la céfotaxime,

la céfalotine, la tétracycline, le cotrimoxazole, la streptomycine et le chloramphénicol (Briet *et al.*, 2018).

Tableau 32 : Identification des gènes de résistance aux antimicrobiens des souches de *V. parahaemolyticus* par un séquençage complet du génome avec la base de données ResFinder.

Souches de <i>V. parahaemolyticus</i>	Gènes identifiés	Antibiotiques	% d'identité	Références	
12-B3PA-1629	<i>bla</i> _{OXA-SHE}	β-lactamines	91,26 %	Cette étude	
	<i>qnrA5</i>	Quinolones	99,39 %		
13-B3PA-2931	<i>bla</i> _{CARB-26}	β-lactamines	99,53 %		
	<i>floR</i>	Amphénicols	98,02 %		
	<i>tetA</i> <i>tet(59)</i>	Tétracyclines	99,42 % 99,67 %		
	<i>sul2</i>	Sulfamides	100 %		
	<i>strA</i> <i>strB</i>	Aminoglycosides	100 % 99 %		
16-B3PA-0006	<i>bla</i> _{CARB-35/43/44}	β-lactamines	99,06 %		(Briet <i>et al.</i> , 2018)
	<i>bla</i> _{NDM-1}	β-lactamines	100 %		
	<i>floR</i>	Amphénicols	98,19 %		
	<i>tetA</i>	Tétracyclines	99,83 %		
	<i>sul1</i> <i>sul2</i>	Sulfamides	100 % 100%		
	<i>aadA2b</i> <i>strA</i> <i>strB</i>	Aminoglycosides	99,87 % 100 % 99 %		
	<i>dfrA16</i>	Diaminopyrimidines	100 %		

Pour la souche de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629, nous avons observé une homologie de 91,26 % avec le gène de résistance *bla*_{OXA-SHE} qui code pour une carbapénémase et conférant une résistance aux carbapénèmes. La résistance phénotypique liée à ce gène n'a pas été vérifiée dans la mesure où aucun carbapénème n'a été utilisé pour réaliser les antibiogrammes pour cette souche (Briet, 2018). Le gène *qnrA5* codant pour la résistance aux quinolones à médiation plasmidique a également été identifié. Cependant, aucune résistance phénotypique de la souche à la ciprofloxacine ni à l'acide nalidixique n'a été observée.

Des gènes conférant une résistance à 5 familles d'antibiotiques ont été identifiés dans la souche de *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931. Nous avons détecté la présence de gènes conférant une résistance aux β-lactamines (*bla*_{CARB-26} codant pour une carbapénémase), aux amphénicols (*floR*), aux

tétracyclines (*tet(59)* et *tetA*), aux sulfamides (*sul2*) et aux aminoglycosides (*strA* et *strB*). Ces résultats d'identification génétique étaient associés aux résistances phénotypiques de la souche au chloramphénicol, à la tétracycline, au cotrimoxazole et à la streptomycine. Mais similairement à la souche 12-B3PA-1629, la résistance aux carbapénèmes n'a pas été étudiée phénotypiquement.

III.2.Extraction et fragmentation de l'ADN génomique de *Vibrio*

La qualité de l'ADN génomique extrait des souches de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629, 13-B3PA-2931 et 16-B3PA-0006 a été contrôlée sur un gel d'agarose à 1 % (Figure 43). Pour ces trois souches, nous avons pu observer que l'ADN génomique était de bonne qualité visible par une bande bien distincte en haut du gel d'agarose. Un léger smear était apparent sous ces bandes témoignant d'une légère dégradation de l'ADN. Nous avons donc jugé ces ADN génomiques comme étant de bonne qualité pour être utilisés dans la préparation des bibliothèques métagénomiques.

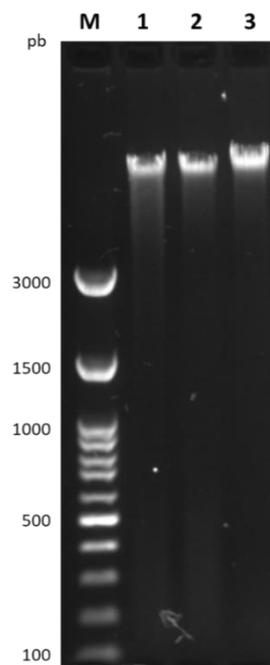


Figure 43 : Révélation sur gel d'agarose à 1 % de l'ADN génomique des souches de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 (puit 1), 13-B3PA-2931 (puit 2) et 16-B3PA-0006 (puit 3). M : marqueur de taille 100 pb.

Pour fragmenter l'ADN génomique des souches de *Vibrio* en fragments d'environ 500 – 3000 pb, une fragmentation enzymatique a été privilégiée par rapport à la sonication afin de mieux contrôler la

fragmentation. Nous avons choisi de fragmenter 1 µg et 2 µg d'ADN de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 pendant des temps d'incubation de 5 min et de 10 min. Pour vérifier la taille des fragments d'ADN obtenus, nous les avons fait migrer sur un gel d'agarose à 1 % (données non présentées). En fragmentant 1 µg d'ADN, un smear très peu visible a été observé pour les temps d'incubation de 5 et 10 min. En revanche, en fragmentant 2 µg d'ADN, le smear était plus visible pour ces deux temps d'incubation. En incubant l'ADN pendant 5 min, la taille des fragments obtenus était comprise entre 100 et 3 000 pb environ. En augmentant le temps d'incubation à 10 min, la taille des fragments allait de 100 à 1 500 pb environ. Pour obtenir une majorité de fragments d'ADN entre 100 et 3 000 pb, nous avons choisi d'utiliser le temps d'incubation le plus court, soit 5 min à 37 °C pour fragmenter l'ADN génomique des trois souches de *Vibrio*. Ces ADN fragmentés ont ensuite été réparés et des extrémités franches ont été générées avant de réaliser le clonage de ces ADN dans le plasmide pZE21-MCS.

III.3.Extraction et clivage du vecteur plasmidique pZE21-MCS

L'ADN du plasmide pZE21-MCS a été linéarisé en le clivant au niveau du site multiple de clonage par l'enzyme *HincII*. Cette enzyme reconnaît un site unique de restriction au sein du plasmide qui est le même que l'enzyme *Sall* en position 123 (Annexe XXIII). Mais au lieu de générer des extrémités cohésives comme *Sall*, l'enzyme *HincII* génère des extrémités franches ce qui favorise l'insertion des fragments d'ADN. Pour vérifier la linéarisation du plasmide pZE21-MCS, nous avons fait migrer l'ADN clivé par l'enzyme *HincII* sur un gel d'agarose à 1 % (Figure 44). En faisant migrer l'ADN plasmidique non coupé, nous avons observé une bande de très faible intensité un peu au-dessus de 3 000 pb et une bande plus intense un peu au-dessus de 1 500 pb indiquées par des cercles en pointillés sur la figure (les bandes étaient bien visibles sur le gel et l'écran d'ordinateur). Le plasmide a donc bien été extrait et était sous deux conformations plasmidiques : une première sous forme d'ADN circulaire (bande supérieure) et une seconde sous forme d'ADN super-enroulé (bande inférieure). Une seule bande était visible en-dessous de 3 000 pb en clivant le plasmide par l'enzyme *HincII* ce qui correspondait à la taille complète du plasmide qui est de 2 253 pb. Cette bande unique indiquait qu'un seul site de restriction *HincII* était bien présent au sein du plasmide pZE21-MCS. Nous avons cloné les

fragments d'ADN génomique dans ce plasmide après avoir déphosphorylé les extrémités 5' de l'ADN plasmidique linéarisé. Ensuite, ces plasmides recombinés ont été transformés dans la souche hôte *E. coli* en comparant la méthode de transformation bactérienne par choc thermique et celle par électroporation.

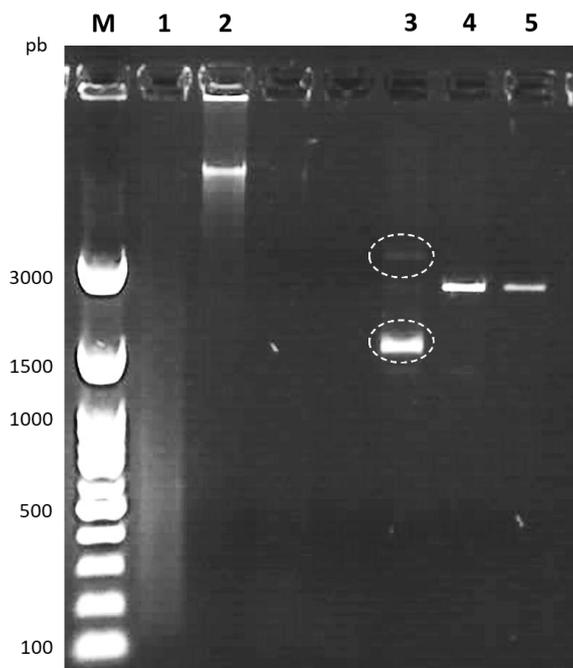


Figure 44 : Révélation sur gel d'agarose à 1 % de la linéarisation du plasmide pZE21-MCS par l'enzyme de restriction *HincII*. M : marqueur de taille 100 pb ; puit 1 : ADN génomique de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 fragmenté ; puit 2 : ADN génomique de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 ; puit 3 : ADN plasmidique non coupé ; puit 4 : ADN plasmidique coupé par l'enzyme *HincII* ; puit 5 : ADN plasmidique coupé par l'enzyme *HincII* et dilué au 1/10. Les cercles en pointillés représentent l'ADN sous forme circulaire (cercle du haut) et super-enroulé (cercle inférieur).

III.4. Comparaison de l'efficacité des méthodes de transformation bactérienne par choc thermique et par électroporation

Pour transformer les plasmides recombinants dans la souche bactérienne hôte et ainsi générer les bibliothèques métagénomiques, nous avons comparé deux méthodes : la transformation par électroporation et la transformation par choc thermique. A l'issue de ces transformations, les bibliothèques métagénomiques ont étéensemencées sur une gélose LB sans antibiotique pour vérifier la présence des bactéries et sur une gélose LB avec la kanamycine pour les plasmides recombinants ou l'ampicilline pour le pUC19 afin d'estimer le nombre de transformants, c'est-à-dire le nombre de clones ayant intégré le plasmide (Tableau 33). Les bactéries étaient non dénombrables lorsque le nombre de

colonies sur gélose était inférieur à 30 ou supérieur à 300. Pour le plasmide pUC19 qui était le témoin de transformation, un tapis bactérien a été observé sur les géloses sans antibiotique pour les deux méthodes de transformation. Le nombre de transformants possédant le plasmide pUC19 était similaire lorsqu'on intégrait le plasmide par électroporation (4,9 log UFC/ml) et par choc thermique (4,1 log UFC/ml). Concernant les bibliothèques métagénomiques des souches 12-B3PA-1629 et 16-B3PA-0006, des tapis bactériens ont été observés pour l'ensemble des dilutions sur les géloses sans antibiotique quelle que soit la méthode de transformation utilisée. En utilisant la méthode de choc thermique, les transformants n'étaient pas dénombrables sur la gélose avec antibiotique. En effet, nous avons observé un tapis bactérien pour la bibliothèque métagénomique non diluée de la souche 12-B3PA-1629 et un nombre de transformants inférieur à 30 pour la bibliothèque métagénomique non diluée de la souche 16-B3PA-0006 et pour les trois dilutions des deux bibliothèques métagénomiques. Mais en utilisant la méthode d'électroporation, un nombre de transformants 2 fois plus élevé qu'en utilisant la méthode de choc thermique a été observé.

Tableau 33 : Dénombrements bactériens des bibliothèques métagénomiques des souches de *V. parahaemolyticus* pour les deux méthodes de transformation bactérienne testées (en log UFC/ml). ATB : antibiotique ; (+) : nombre de colonies > 300 ; (-) : nombre de colonies < 30.

Plasmide	Dilution	Dénombrement des bactéries par méthode (log UFC/ml)			
		Electroporation		Choc thermique	
		Avec ATB	Sans ATB	Avec ATB	Sans ATB
pUC19 (témoin)	10 ⁰	+	+	+	+
	10 ⁻¹	+	+	4,1	+
	10 ⁻²	4,9	+	-	+
	10 ⁻³	-	+	-	+
pZE21 + 12-B3PA-1629	10 ⁰	+	+	+	+
	10 ⁻¹	+	+	-	+
	10 ⁻²	+	+	-	+
	10 ⁻³	5,9	+	-	+
pZE21 + 13-B3PA-2931	10 ⁰	+	+	2,6	+
	10 ⁻¹	+	+	-	+
	10 ⁻²	+	+	-	+
	10 ⁻³	6,1	+	-	+
pZE21 + 16-B3PA-0006	10 ⁰	+	+	-	+
	10 ⁻¹	+	+	-	+
	10 ⁻²	+	+	-	+
	10 ⁻³	5,8	+	-	+

Afin de comparer les deux méthodes de transformation, l'efficacité moyenne de transformation a été calculée pour chaque librairie métagénomique en fonction de la méthode utilisée. La quantité de plasmide utilisée pour la transformation estimée par spectrophotométrie ainsi que le volume total de transformants ont été pris en compte (Tableau 34). Une meilleure efficacité de transformation du témoin a été observée avec la méthode d'électroporation par rapport à la méthode de choc thermique avec une différence de 1,4 log UFC/ μ g de plasmide. En revanche, une différence d'efficacité de transformation allant jusqu'à 3,6 log UFC/ μ g de plasmide a été observée entre l'électroporation et le choc thermique pour les bibliothèques métagénomiques des trois souches de *Vibrio*.

Tableau 34 : Efficacité moyenne de transformation bactérienne du plasmide témoin et des plasmides recombinés avec les deux méthodes de transformation. *nd* : non dénombrable.

Plasmide	Efficacité moyenne de transformation par méthode (log UFC/ μ g de plasmide)	
	Electroporation	Choc thermique
pUC19 (témoin)	9,8	8,4
pZE21 + 12-B3PA-1629	7,5	<i>nd</i>
pZE21 + 13-B3PA-2931	7,7	4,1
pZE21 + 16-B3PA-0006	7,4	<i>nd</i>

Les bibliothèques métagénomiques des souches de *Vibrio* obtenues par électroporation ont donc été choisies pour réaliser la suite des analyses.

III.5. Taille des bibliothèques métagénomiques de *V. parahaemolyticus*

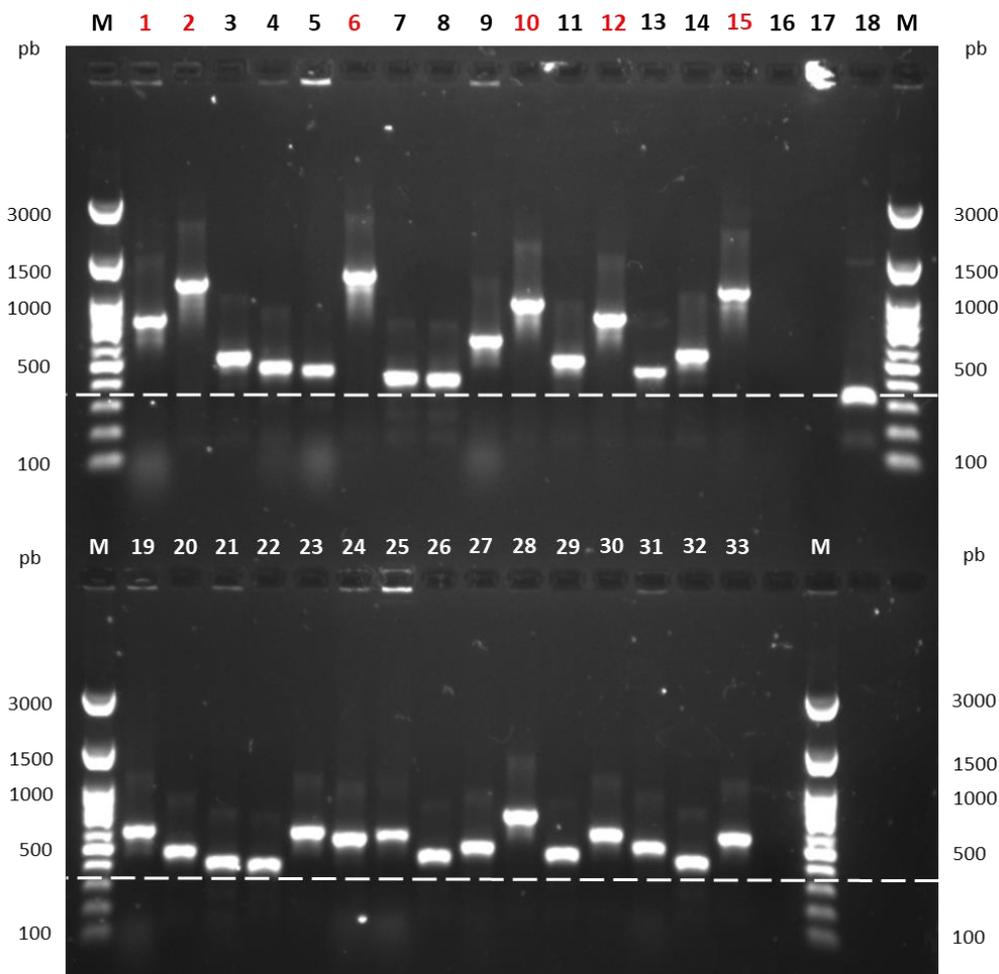
Etant donné le faible nombre de clones ayant poussé sur les géloses LB supplémentées de kanamycine avec la méthode de choc thermique, la PCR sur colonies amplifiant le site multiple de clonage avec les amorces pZE21-colF et pZE21-colR a été réalisée uniquement sur la bibliothèque métagénomique de la souche 13-B3PA-2931. Les résultats sont présentés en Annexe XXV. Nous avons ainsi pu observer que l'ensemble des plasmides intégrés dans les souches d'*E. coli* par cette méthode étaient vides.

La taille des bibliothèques métagénomiques des trois souches de *V. parahaemolyticus* générées par électroporation a été caractérisée par la même réaction de PCR sur 30 colonies. Les résultats des électrophorèses sur gel d'agarose sont présentés dans les Figure 45, Figure 46 et Figure 47.

Pour la bibliothèque métagénomique de la souche de *Vibrio* 12-B3PA-1629, une bande a été observée pour chaque clone analysé confirmant l'intégration du plasmide pZE21-MCS dans les cellules d'*E. coli* (Figure 45). Les clones possédaient tous un plasmide avec un ADN inséré dans le site multiple de clonage. Les inserts avaient une taille comprise entre 300 et 900 pb (en retirant 300 pb à la taille des bandes correspondant à la taille du plasmide vide) avec une moyenne d'environ 323 pb. Nous avons identifié 6 clones avec une taille d'insert supérieure à 500 pb (clones 1, 2, 6, 10, 12 et 15). Ainsi, la taille totale de la bibliothèque métagénomique pour cette souche a été estimée à $5,57.10^{-2}$ Gb.

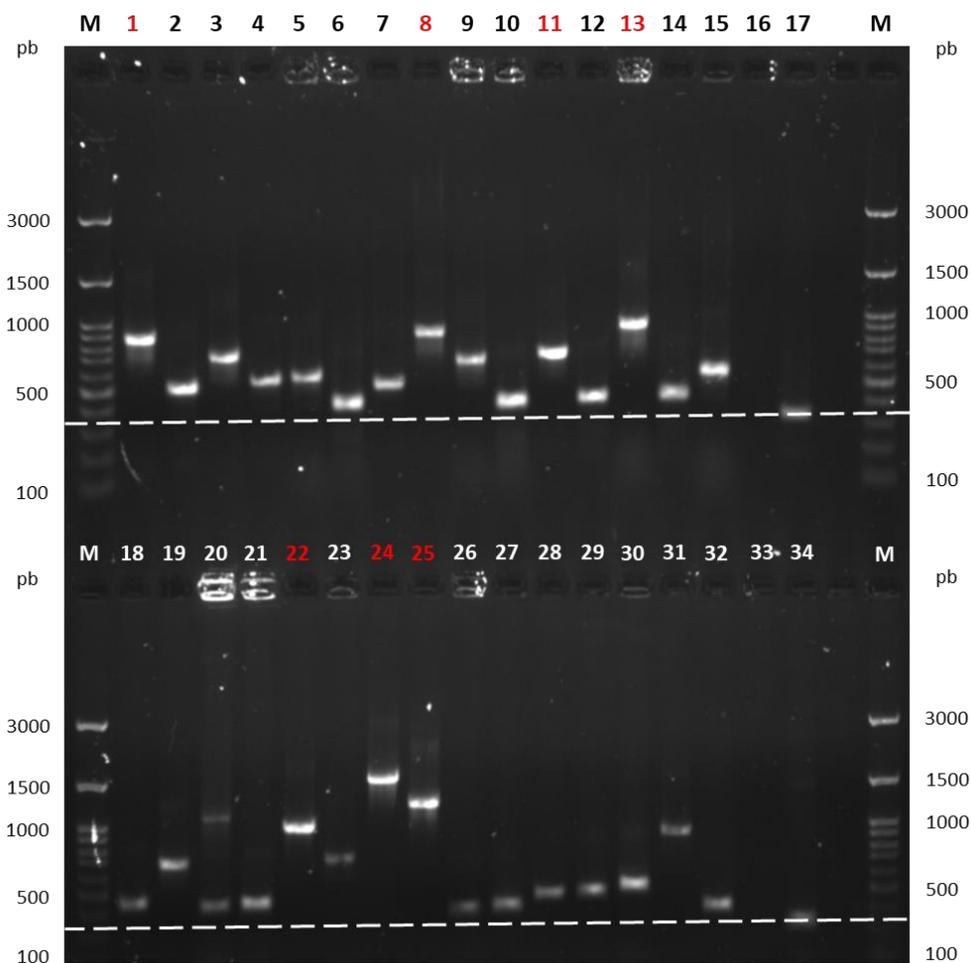
Concernant la bibliothèque métagénomique de la souche de *Vibrio* 13-B3PA-2931, l'ensemble des clones analysés par PCR possédaient également un plasmide avec un insert (Figure 46). Les fragments d'ADN insérés au niveau du site multiple de clonage avaient une taille similaire à ceux de la bibliothèque métagénomique de la souche 12-B3PA-1629, comprise entre 150 et 1 200 pb avec une moyenne de 378 pb. En soustrayant 300 pb à la taille des bandes observées, nous avons pu voir que 7 clones parmi les 30 analysés avaient un plasmide avec un insert d'une taille supérieure à 500 pb (clones 1, 8, 11, 13, 22, 24 et 2). La taille totale de la bibliothèque métagénomique de cette souche a été estimée à $1,19.10^{-1}$ Gb, soit deux fois plus élevée que celle de la bibliothèque métagénomique de la souche 12-B3PA-1629.

Pour la bibliothèque métagénomique de la souche 16-B3PA-0006, tous les plasmides intégrés dans les 30 clones d'*E. coli* analysés par PCR contenaient aussi un fragment d'ADN exogène. La taille des fragments d'ADN insérés allait de 100 à 1 900 pb sauf pour le clone 8 qui avait un plasmide avec un insert d'une taille supérieure à 3 000 pb (Figure 47). La moyenne des tailles des inserts était donc supérieure aux autres bibliothèques métagénomiques (595 pb) et 13 clones sur 30 avaient un plasmide avec un insert d'une taille supérieure à 500 pb (clones 1, 3, 6, 8, 11, 14, 15, 17, 20, 21, 23, 25, 26). La taille totale de cette bibliothèque métagénomique était donc supérieure aux autres ($1,74.10^{-1}$ Gb).



FR	NI	LS	AI (pb)	TC (UFC/ml)	TR	Taille (Gb)
0	0	24	323	$8,60 \cdot 10^5$	30	$5,57 \cdot 10^{-2}$

Figure 45 : Révélation sur gel d'agarose à 1 % des amplicons de la PCR sur les transformants de la librairie métagénomique de la souche de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629. M : marqueur de taille 100 pb ; puits 1 à 15 : clones ; puit 16 : mélange réactionnel seul (témoin négatif) ; puit 17 : eau nuclease-free (témoin négatif) ; puit 18 : ADN du plasmide pZE21-MCS sans insert ; puits 19 à 33 : clones. Les puits en rouge indiquent un insert de taille > 500 pb. La ligne blanche indique la taille des amplicons quand le plasmide est vide. FR : nombre de réactions ratées ; NI : nombre de clones avec un plasmide vide ; LS : nombre de clones possédant un plasmide avec un insert < 500 pb ; AI : moyenne de la taille des inserts (pb) ; TC : nombre total de clones (UFC/ml) ; TR : nombre total de réactions PCR ; Taille : taille totale de la librairie métagénomique (Gb).



FR	NI	LS	AI (pb)	TC (UFC/ml)	TR	Taille (Gb)
0	0	23	378	$1,35 \cdot 10^6$	30	$1,19 \cdot 10^{-1}$

Figure 46 : Révélation sur gel d'agarose à 1 % des amplicons de la PCR sur les transformants de la librairie métagénomique de la souche de *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931. M : marqueur de taille 100 pb ; puits 1 à 15 : clones ; puit 16 : eau nuclease-free (témoin négatif) ; puit 17 : ADN du plasmide pZE21-MCS sans insert ; puits 18 à 32 : clones ; puit 33 : mélange réactionnel seul (témoin négatif) ; puit 34 : ADN du plasmide pZE21-MCS sans insert. Les puits en rouge indiquent un insert de taille > 500 pb. La ligne blanche indique la taille des amplicons quand le plasmide est vide. FR : nombre de réactions ratées ; NI : nombre de clones avec un plasmide vide ; LS : nombre de clones possédant un plasmide avec un insert < 500 pb ; AI : moyenne de la taille des inserts (pb) ; TC : nombre total de clones (UFC/ml) ; TR : nombre total de réactions PCR ; Taille : taille totale de la librairie métagénomique (Gb).

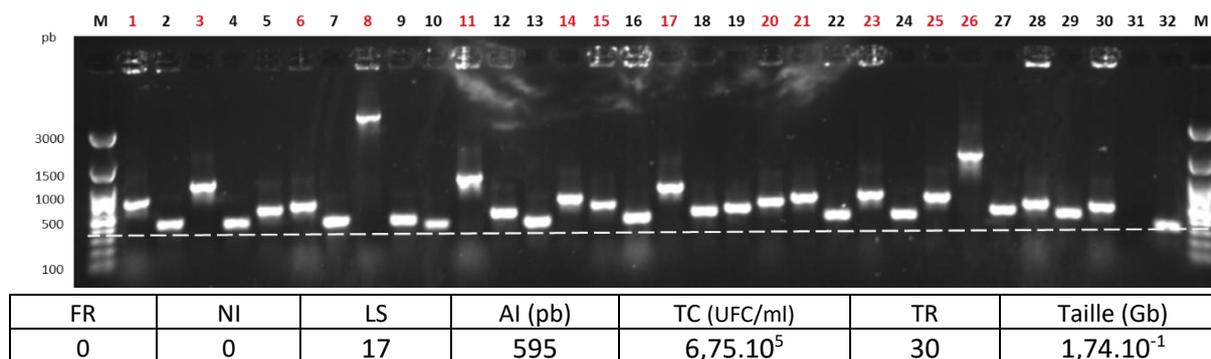


Figure 47 : Révélation sur gel d'agarose à 1 % des amplicons de la PCR sur les transformants de la bibliothèque métagénomique de la souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006. M : marqueur de taille 100 pb ; puits 1 à 30 : clones ; puit 31 : eau nuclease-free (témoin négatif). Les puits en rouge indiquent un insert de taille > 500 pb. La ligne blanche indique la taille des amplicons quand le plasmide est vide. FR : nombre de réactions ratées ; NI : nombre de clones avec un plasmide vide ; LS : nombre de clones possédant un plasmide avec un insert < 500 pb ; AI : moyenne de la taille des inserts (pb) ; TC : nombre total de clones (UFC/ml) ; TR : nombre total de réactions PCR ; Taille : taille totale de la bibliothèque métagénomique (Gb).

Ces trois bibliothèques métagénomiques générées par électroporation ont été soumises au criblage sur antibiotiques et à l'analyse des séquences des inserts plasmidiques des clones résistants.

III.6. Criblage des bibliothèques métagénomiques sur antibiotiques

Les bibliothèques métagénomiques des trois souches de *V. parahaemolyticus* ont été criblées sur des géloses LB (ou Mueller-Hinton pour le sulfaméthoxazole) en présence de kanamycine pour la sélection du plasmide couplée à un des antibiotiques suivants : sulfaméthoxazole, céfotaxime, ciprofloxacine, colistine, doripénème, érythromycine ou tétracycline. En criblant la bibliothèque métagénomique de la souche 12-B3PA-1629 en présence d'érythromycine et de kanamycine, nous avons observé plus de 300 clones pour toutes les dilutions (Tableau 35). Ces colonies étaient de petites tailles comparées à celles qui ont été observées en présence de kanamycine seule. Pour les autres antibiotiques testés, aucune colonie n'a été détectée sur les géloses.

Plus de 300 colonies ont également été observées pour la bibliothèque métagénomique de la souche 13-B3PA-2931 en présence d'érythromycine et de kanamycine avec une morphologie similaire aux clones de la bibliothèque de la souche 12-B3PA-1629 (Tableau 36). Deux clones se sont développés en présence de tétracycline et de kanamycine sans dilution de la librairie métagénomique. Pour les autres antibiotiques, nous n'avons observé aucune colonie sur les géloses.

Similairement aux deux autres librairies métagénomiques, nous avons observé plus de 300 colonies de petites tailles sur les géloses avec l'érythromycine et la kanamycine pour la librairie métagénomique de la souche 16-B3PA-0006 (Tableau 37). De plus, six colonies étaient visibles sur la gélose avec du sulfaméthoxazole et de la kanamycine.

Nous avons réalisé par la suite des PCR sur les colonies s'étant développées en présence de kanamycine et de tétracycline (n = 2 pour la librairie de la souche 13-B3PA-2931) et de sulfaméthoxazole (n = 6 pour la librairie de la souche 16-B3PA-0006) avec les amorces pZE21-seqF et pZE21-seqR. En faisant migrer les différents amplicons sur un gel d'agarose à 1 %, nous avons estimé leur taille entre 1 500 et 3 000 pb (Annexe XXVI). Ces amplicons ont ensuite été envoyés à séquencer.

Au vu des résultats concernant l'érythromycine pour les trois souches, nous avons réalisé une PCR sur 10 colonies isolées pour chaque librairie métagénomique avant de faire migrer les amplicons sur un gel d'agarose à 1 % (Annexe XXVII). Nous avons observé la présence de plusieurs bandes pour 5/30 pistes du gel. La présence de ces amplicons peut être expliquée par un repiquage de plusieurs colonies dans les tubes de PCR en raison de leur petite taille. Nous avons également observé la présence de plasmides vides pour 2/30 clones (bande à environ 130 pb) et des inserts d'une taille inférieure à 500 pb pour 23/30 clones. Nous avons envoyé à séquencer les amplicons des clones 3, 6, 7, 8 et 10 (souche 12-B3PA-1629), 14, 15, 17, 19 et 20 (souche 13-B3PA-2931), 22, 25, 27, 28 et 30 (souche 16-B3PA-0006) afin de confirmer une absence de pression de sélection avec l'érythromycine.

Tableau 35 : Criblage de la librairie métagénomique de la souche 12-B3PA-1629 en présence de kanamycine (KAN), sulfaméthoxazole (SUL), céfotaxime (CEF), ciprofloxacine (CIP), colistine (COL), doripénème (DOR), érythromycine (ERY) et tétracycline (TET).

Librairie métagénomique	Antibiotique	Dilution de la librairie	Nombre de colonies
pZE21 + 12-B3PA-1629	KAN	10^{-3}	> 300
		10^{-4}	285
		10^{-5}	33
	SUL + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	CEF + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	CIP + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	COL + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	DOR + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	ERY + KAN	10^0	> 300
		10^{-1}	> 300
		10^{-2}	> 300
TET + KAN	10^0	0	
	10^{-1}	0	
	10^{-2}	0	

Tableau 36 : Criblage de la librairie métagénomique de la souche 13-B3PA-2931 en présence de kanamycine (KAN), sulfaméthoxazole (SUL), céfotaxime (CEF), ciprofloxacine (CIP), colistine (COL), doripénème (DOR), érythromycine (ERY) et tétracycline (TET).

Librairie métagénomique	Antibiotique	Dilution de la librairie	Nombre de colonies
pZE21 + 13-B3PA-2931	KAN	10^{-3}	> 300
		10^{-4}	271
		10^{-5}	26
	SUL + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	CEF + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	CIP + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	COL + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	DOR + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	ERY + KAN	10^0	> 300
		10^{-1}	> 300
		10^{-2}	> 300
	TET + KAN	10^0	2
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0

Tableau 37 : Criblage de la librairie métagénomique de la souche 16-B3PA-0006 en présence de kanamycine (KAN), sulfaméthoxazole (SUL), céfotaxime (CEF), ciprofloxacine (CIP), colistine (COL), doripénème (DOR), érythromycine (ERY) et tétracycline (TET).

Librairie métagénomique	Antibiotique	Dilution de la librairie	Nombre de colonies
pZE21 + 16-B3PA-0006	KAN	10^{-3}	> 300
		10^{-4}	202
		10^{-5}	29
	SUL + KAN	10^0	6
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	CEF + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	CIP + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	COL + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	DOR + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0
	ERY + KAN	10^0	> 300
		10^{-1}	> 300
		10^{-2}	> 300
	TET + KAN	10^0	0
		10^{-1}	0
		10^{-2}	0

III.7. Analyse des séquences des inserts plasmidiques des clones résistants aux antibiotiques

Une fois les séquences obtenues, nous les avons confrontées à plusieurs bases de données spécifiques aux GRA ainsi qu'à la base de données plus généraliste du NCBI (National Center for Biotechnology Information). La base de données CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) est active, mise à jour tous les mois, contient actuellement plus de 5 010 séquences de référence sur les GRA et donne des informations sur les espèces bactériennes dans lesquelles le gène a été identifié. ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) est également spécialisée dans les GRA et contient environ 2 038 séquences génétiques depuis son archivage en mai 2018. La base de données ResFinder permet non seulement de détecter les GRA mais aussi de leur associer un

phénotype de résistance. Cette base de données est régulièrement mise à jour et contient plus de 2 774 séquences génétiques. ResFinderFG est spécialisée dans l'identification des déterminants de la résistance aux antimicrobiens obtenus par métagénomique fonctionnelle. Cette base de données est fondée sur 50 études de métagénomique fonctionnelle et sa dernière mise à jour date de juin 2022. Les bases de données ResFinder et ResFinderFG ne donnent pas d'informations sur les espèces bactériennes porteuses des gènes de résistance mais indiquent les antibiotiques pour lesquels les gènes confèrent une résistance phénotypique. Pour l'analyse des séquences, les clones ont été codifiés de la manière suivante :

[bibliothèque métagénomique]-[antibiotique]-[numéro du clone]

[bibliothèque métagénomique] : 12 (12-B3PA-1629), 13 (13-B3PA-2931), 16 (16-B3PA-0006)

[antibiotique] : ERY (érythromycine), TET (tétracycline), SUL (sulfaméthoxazole)

[numéro du clone] : le numéro s'incrémentait

III.7.A. Clones des trois souches de *Vibrio* résistants à l'érythromycine

L'analyse des inserts plasmidiques des 15 clones des souches 12-B3PA-1629, 13-B3PA-2931 et 16-B3PA-0006 s'étant développés en présence d'érythromycine et de kanamycine a dans un premier temps été réalisée avec les bases de données ARG-ANNOT, CARD, ResFinder et ResFinderFG.

Aucune homologie de séquence avec les GRA disponibles dans ces bases de données n'a été observée. Nous avons donc par la suite réalisé un blast nucléotidique (NCBI). Les résultats sont présentés en Annexe XXVIII. Concernant les clones de la souche 12-B3PA-1629, nous avons observé une homologie de séquence entre 95 et 100 % avec des protéines connues. Nous avons noté que 26 % de l'insert du clone 12-ERY-3 était homologue aux gènes *pstS* et *tonB* qui codent pour une protéine de liaison au substrat d'un transporteur de type ABC et un récepteur tonB-dépendant, respectivement. Entre 70 et 75 % des inserts des clones 12-ERY-6 et 12-ERY-7 avaient une homologie avec le gène *dsbA* codant pour une protéine de formation de liaisons disulfures, une amidohydrolase et une protéine

hypothétique. Entre 45 et 55 % des inserts des clones 12-ERY-8 et 12-ERY-10 correspondaient aux gènes *flgM* (protéine de biosynthèse flagellaire), *astD* (déshydrogénase), *icmF* (protéine de sécrétion de type VI) ainsi qu'à une urocanate hydratase et une protéine hypothétique. L'ensemble de ces homologies ont été observées pour l'espèce *Shewanella algae*.

Des homologies de séquence entre 98 et 100 % ont été observées pour les inserts des clones de la souche 13-B3PA-2931. Entre 20 et 29 % des inserts des clones 13-ERY14 et 13-ERY-15 étaient homologues à un régulateur transcriptionnel de la famille LysR et à une protéine à domaine Hpt. Nous avons noté qu'entre 39 et 44 % des inserts des clones 13-ERY-17 et 13-ERY-20 correspondaient au gène *yejH* codant pour une hélicase à ARN ATP-dépendante et à 2 protéines hypothétiques. Enfin, nous avons observé une homologie de l'insert du clone 13-ERY-19 avec les gènes *crcB* (codant pour un transporteur d'efflux de fluorure) et *yejH*. L'ensemble de ces gènes avaient été mis en évidence pour l'espèce *V. parahaemolyticus*.

Concernant les clones de la souche 16-B3PA-0006, nous avons observé entre 97 et 100 % d'homologie avec des gènes connus de la base de données de NCBI. Nous avons noté que 20 % de l'insert du clone 16-ERY-22 était homologue au gène *pdxH* qui code pour une pyridoxamine 5'-phosphate oxydase. Entre 38 et 43 % des séquences des inserts des clones 16-ERY-28 et 16-ERY-25 étaient homologues à une D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase et une sulfatase-like hydrolase/transférase. Entre 55 et 60 % des séquences des inserts des clones 16-ERY-27 et 16-ERY-30 correspondaient à une fumarate hydratase de classe II et des perméases de types FtsX et NCS2. Similairement aux séquences des clones de la souche 13-B3PA-2931, ces gènes ont été mis en évidence dans *V. parahaemolyticus* mais également dans *Proteus vulgaris* (pour le gène *pdxH*).

Nous en avons conclu que la sélection de gènes de résistance à l'érythromycine à partir des bibliothèques métagénomiques en utilisant 100 µg/ml de cet antibiotique n'avait pas fonctionné.

III.7.B. Clones de la souche 13-B3PA-2931 résistants à la tétracycline

Les séquences d'ADN insérées dans le plasmide des deux clones de la souche de *Vibrio* 13-B3PA-2931 résistants à la tétracycline étaient de 1 210 et 1 211 pb. Un blast a d'abord été effectué dans la base de données CARD (Tableau 38). Pour ces deux séquences, nous avons observé une homologie avec le gène *tetA* de 98 % et 87 %, respectivement, qui a été mis en évidence par un séquençage complet du génome de *Shigella sonnei*.

Tableau 38 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 résistants à la tétracycline avec la base de données CARD. % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible ; bactérie : espèce bactérienne dans laquelle le gène a été identifié.

Clone	Gène identifié	% d'identité	Bactérie
13-TET-1	<i>tetA</i> (ARO:3000165)	98 %	<i>Shigella sonnei</i>
13-TET-2		87 %	

Une recherche dans la base de données ARG-ANNOT avec les deux mêmes séquences a été faite (Tableau 39). Une homologie similaire à la base de données CARD a été observée pour le gène *tetA* pour ces deux séquences (99 % et 87 %, respectivement) mais aucune information sur l'espèce bactérienne dans laquelle le gène a été identifié n'a été donnée. De plus, ces deux séquences présentaient une homologie de 100 % avec le gène *tetR* qui code pour un régulateur de transcription du gène *tetA*.

Tableau 39 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 résistants à la tétracycline avec la base de données ARG-ANNOT. % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible.

Clone	Gène identifié	% d'identité
13-TET-1	<i>tetA</i> (JX424423:94438-95712:1275)	99 %
	<i>tetR</i> (HF545434:53576-54226:651)	100 %
13-TET-2	<i>tetA</i> (JX424423:94438-95712:1275)	87 %
	<i>tetR</i> (HF545434:53576-54226:651)	100 %

Ensuite, nous avons effectué un blast de ces séquences dans la base de données ResFinderFG (Tableau 40). Aucune homologie n'a été obtenue pour la séquence de l'insert du clone 13-TET-2. En revanche, la séquence du clone 13-TET-1 présentait une homologie de 99,85 % avec une pompe à efflux de la tétracycline donnant une résistance phénotypique à la minocycline.

Tableau 40 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 résistants à la tétracycline avec la base de données ResFinderFG. Nom du hit : correspond au gène, à la protéine ou à la fonction du gène/de la protéine identifié par le blast ; % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible ; antibiotique ciblé : antibiotique contre lequel le gène identifié confère une résistance.

Clone	Nom du hit	% d'identité	Antibiotique ciblé
13-TET-1	tet_efflux (GQ343144.1)	99,85 %	minocycline
13-TET-2			

Une analyse de ces séquences avec la base de données de NCBI nous a permis d'obtenir plus d'informations (Tableau 41). Environ 97 % de la séquence du clone 13-TET-1 présentait une homologie de 99,66 % avec 3 gènes : *tetA* (codant pour la pompe à efflux de la tétracycline), *tetR* (codant pour le régulateur transcriptionnel) mais également le gène *merR* qui code pour un régulateur de l'opéron impliqué dans la résistance au mercure. Ces gènes ont été mis en évidence dans la souche de *V. cholerae* FORC_073, un isolat clinique. Une homologie plus faible a été observée entre la séquence du clone 13-TET-2 et les gènes *tetA*, *tetR* et *merR* (97,71 %) qui ont été mis en évidence dans la souche de *V. parahaemolyticus* VPS92 isolée d'une crevette. Dans cette souche, les trois gènes étaient portés par le plasmide pVPS92-VEB.

Tableau 41 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 résistants à la tétracycline avec la base de données du NCBI. Produit : protéine ou fonction de la protéine codée par le gène identifié ; query cover : pourcentage correspondant à la longueur de la séquence blastée couvrant la séquence cible ; % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible ; bactérie : espèce bactérienne dans laquelle le gène a été identifié.

Clone	Gène identifié	Produit	Query Cover	% d'identité	Bactérie
13-TET-1	tetA	pompe à efflux	97 %	99,66 %	<i>V. cholerae</i> FORC_073 (CP024082.1)
	tetR	régulateur transcriptionnel			
	merR	régulateur de l'opéron de résistance au mercure			
13-TET-2	tetA	pompe à efflux	89 %	97,71 %	<i>V. parahaemolyticus</i> VPS92 (KU356480.1)
	tetR	régulateur transcriptionnel			
	merR	régulateur de l'opéron de résistance au mercure			

Finalement, aucune homologie de ces deux séquences avec des GRA n'a été observée en interrogeant la base de données ResFinder.

III.7.C. Clones de la souche 16-B3PA-0006 résistants au sulfaméthoxazole

Les séquences d'ADN insérées dans les plasmides des six clones qui se sont développés en présence de sulfaméthoxazole ont été analysées en utilisant les mêmes bases de données. Ces séquences avaient une taille d'environ 1 840 pb pour les clones 16-SUL-1/4/5/6 et d'environ 1 140 pb pour les clones 16-SUL-2/3. Les résultats pour la base de données CARD sont présentés dans le Tableau 42. Les séquences des 2 clones 16-SUL-2 et 16-SUL-3 étaient homologues à 99 % avec le gène *sul2* codant pour la résistance aux sulfonamides et mis en évidence dans l'espèce *V. cholerae*. La même homologie de séquences a été observée pour les 4 autres clones en plus d'une homologie entre 99 et 100 % avec le gène *aph(3'')-Ib* (ou *strA*) codant pour la résistance aux aminoglycosides et mis en évidence dans *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 42 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 résistants au sulfaméthoxazole avec la base de données CARD. % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible ; bactérie : espèce bactérienne dans laquelle le gène a été identifié.

Clone	Gène identifié	% d'identité	Bactérie
16-SUL-1	<i>sul2</i> (ARO:3000412)	99 %	<i>V. cholerae</i>
	<i>aph(3'')-Ib</i> ou " <i>strA</i> " (ARO:3002639)	100 %	<i>P. aeruginosa</i>
16-SUL-2	<i>sul2</i> (ARO:3000412)	99 %	<i>V. cholerae</i>
16-SUL-3	<i>sul2</i> (ARO:3000412)	99 %	<i>V. cholerae</i>
16-SUL-4	<i>sul2</i> (ARO:3000412)	99 %	<i>V. cholerae</i>
	<i>aph(3'')-Ib</i> ou " <i>strA</i> " (ARO:3002639)	100 %	<i>P. aeruginosa</i>
16-SUL-5	<i>sul2</i> (ARO:3000412)	99 %	<i>V. cholerae</i>
	<i>aph(3'')-Ib</i> ou " <i>strA</i> " (ARO:3002639)	99 %	<i>P. aeruginosa</i>
16-SUL-6	<i>sul2</i> (ARO:3000412)	99 %	<i>V. cholerae</i>
	<i>aph(3'')-Ib</i> ou " <i>strA</i> " (ARO:3002639)	100 %	<i>P. aeruginosa</i>

Des résultats similaires ont été observés en interrogeant la base de données ARG-ANNOT (Tableau 43). Les séquences des clones 16-SUL-2 et 16-SUL-3 présentaient de nouveau une homologie de 99 % avec le gène *sul2* et la séquence des 4 autres clones une homologie entre 99 % et 100 % avec les gènes *sul2* et *strA*.

Tableau 43 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 résistants au sulfaméthoxazole avec la base de données ARG-ANNOT. % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible.

Clone	Gène identifié	% d'identité
16-SUL-1	<i>sul2</i> (EU360945:1617-2432:816)	99 %
	<i>strA</i> (AB366441:22458-23261:804)	100 %
16-SUL-2	<i>sul2</i> (EU360945:1617-2432:816)	99 %
16-SUL-3	<i>sul2</i> (EU360945:1617-2432:816)	99 %
16-SUL-4	<i>sul2</i> (EU360945:1617-2432:816)	99 %
	<i>strA</i> (AB366441:22458-23261:804)	100 %
16-SUL-5	<i>sul2</i> (EU360945:1617-2432:816)	99 %
	<i>strA</i> (AB366441:22458-23261:804)	99 %
16-SUL-6	<i>sul2</i> (EU360945:1617-2432:816)	99 %
	<i>strA</i> (AB366441:22458-23261:804)	100 %

En revanche, aucune homologie entre les séquences des clones 16-SUL-2 et 16-SUL-3 et le gène *sul2* n'a été obtenue en utilisant la base de données ResFinder (Tableau 44). Seules les séquences des clones 16-SUL-1, 16-SUL-4, 16-SUL-5 et 16-SUL-6 ont montré une homologie allant de 99,51 à 100 % avec le gène *sul2* qui est lié à une résistance phénotypique au sulfaméthoxazole.

Tableau 44 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 résistants au sulfaméthoxazole avec la base de données ResFinder. % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible ; phénotype de résistance : antibiotique contre lequel le gène identifié confère une résistance.

Clone	Gène identifié	% d'identité	Phénotype de résistance
16-SUL-1	<i>sul2</i> (FJ968160)	99,88 %	sulfaméthoxazole
16-SUL-2			
16-SUL-3			
16-SUL-4	<i>sul2</i> (FJ968160)	100 %	sulfaméthoxazole
16-SUL-5	<i>sul2</i> (FJ968160)	99,51 %	sulfaméthoxazole
16-SUL-6	<i>sul2</i> (FJ968160)	99,63 %	sulfaméthoxazole

Similairement aux bases de données CARD et ARG-ANNOT, les séquences des clones 16-SUL-2 et 16-SUL-3 ont montré une homologie de 99,86 % avec le gène *sul2* en réalisant un Blast nucléotidique dans la base de données du NCBI (Tableau 45). De même, environ 74 % des séquences des autres clones présentaient une homologie supérieure à 99 % avec les gènes *strA* et *sul2* mis en évidence au sein du plasmide pC1579 associé à la souche de *V. alginolyticus* C1579 isolée d'une crevette.

Tableau 45 : Analyse des séquences insérées dans les plasmides des clones de la souche *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 résistants au sulfaméthoxazole avec la base de données du NCBI. Produit : protéine ou fonction de la protéine codée par le gène identifié ; query cover : pourcentage correspondant à la longueur de la séquence blastée couvrant la séquence cible ; % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible ; bactérie : espèce bactérienne dans laquelle le gène a été identifié.

Clone	Gène identifié	Produit	Query Cover	% d'identité	Bactérie	Plasmide
16-SUL-1	<i>strA</i>	aminoglycoside phosphotransférase	74 %	99,56 %	<i>V. alginolyticus</i> C1579 (MN865127.1)	pC1579
	<i>sul2</i>	dihydroptéroate synthase				
16-SUL-2	<i>sul2</i>	dihydroptéroate synthase	62 %	99,86 %		
16-SUL-3	<i>sul2</i>	dihydroptéroate synthase	62 %	99,86 %		
16-SUL-4	<i>strA</i>	aminoglycoside phosphotransférase	73 %	99,85 %		
	<i>sul2</i>	dihydroptéroate synthase				
16-SUL-5	<i>strA</i>	aminoglycoside phosphotransférase	74 %	99,27 %		
	<i>sul2</i>	dihydroptéroate synthase				
16-SUL-6	<i>strA</i>	aminoglycoside phosphotransférase	74 %	99,49 %		
	<i>sul2</i>	dihydroptéroate synthase				

Concernant la base de données ResFinderFG, aucune homologie de séquence n'a été observée.

IV. Discussion

Dans ces travaux, nous avons mis au point une méthode de métagénomique fonctionnelle par criblage haut-débit permettant d'identifier des GRA décrits et/ou de nouveaux gènes à partir de souches bactériennes. Pour cela, des souches de *V. parahaemolyticus* résistantes aux antibiotiques préalablement caractérisées d'un point de vue phénotypique ont été étudiées afin de valider les différentes étapes critiques du protocole et de l'utiliser ultérieurement sur des échantillons complexes environnementaux.

Nous avons dans un premier temps identifié les GRA connus par un séquençage complet du génome des souches étudiées. Comme indiqué dans la publication de Briet *et al.* (2018), la souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 était phénotypiquement résistante à l'amoxicilline/acide clavulanique, à la céfoxitine, à la céfotaxime, à la ceftazidime, à la céfuroxime, au céfépime, au triméthoprim/sulfaméthoxazole et était productrice d'une carbapénémase. Les auteurs ont identifié les gènes *bla*_{NDM-1}, *floR*, *tetA*, *sul1*, *sul2*, *aadA2b*, *strA*, *strB* et *dfrA16* codant pour les résistances à ces antibiotiques. En réalisant un nouveau blast dans la base de données ResFinder avec la séquence du génome de cette souche (numéro d'accès GenBank PETB00000000), nous avons également identifié la présence des gènes *bla*_{CARB-35/43/44} avec une homologie de séquence de 99,1 %. Ces trois gènes codent pour une carbapénémase appartenant aux β -lactamases de classe D et sont principalement portés par le chromosome bactérien et diffèrent dans leur séquence génétique par quelques substitutions nucléotidiques. Les gènes *bla*_{CARB-35} et *bla*_{CARB-43} ont auparavant été décrits dans des souches de *V. parahaemolyticus* isolées de fruits de mer en Chine par un séquençage complet de leur génome (Chiou *et al.*, 2015). Le gène *bla*_{CARB-44} a également été décrit dans une souche de *V. parahaemolyticus* C2_8 isolée de poisson en Chine (Yang *et al.*, 2019). Similairement à la souche 16-B3PA-0006, nous avons identifié les gènes de résistance *floR*, *tetA*, *sul2*, *strA* et *strB* dans la souche 13-B3PA-2931 qui correspondaient à sa résistance phénotypique au chloramphénicol, à la tétracycline, au cotrimoxazole et à la streptomycine. Nous avons également identifié le gène de résistance à la tétracycline *tet(59)* et le gène codant pour la carbapénémase CARB-26. Ces gènes de résistance ont déjà été identifiés dans des souches de *V. parahaemolyticus* ST122 dans des étangs à crevettes en Chine (Fu *et al.*, 2021). En 2015, les gènes *bla*_{CARB-17}, *bla*_{CARB-20} et *sul2* ont été identifiés dans une de ces souches ST122. Puis en 2016, une autre souche ST122 a été détectée avec un îlot génomique flanqué de séquences d'insertions IS*Val1* qui contenait les gènes *floR*, *sul2*, *strA* et *strB*. Enfin, nous avons identifié le gène de résistance aux quinolones *qnrA5* et le gène *bla*_{OXA-SHE} codant pour une β -lactamase de classe D (oxacillinase) dans la souche de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629. Cependant, aucune résistance phénotypique à l'acide nalidixique ni à la ciprofloxacine (deux quinolones de 1^{ère} et de 2^{ème} génération,

respectivement) n'a été observée pour cette souche de *Vibrio*. Similairement, Poirel *et al.* (2005) ont observé que la présence du gène *qnrA* ne donnait pas une résistance phénotypique aux quinolones comme la ciprofloxacine, l'ofloxacine, la sparfloxacine et la norfloxacine pour des souches de *S. algae*. Le gène *bla_{OXA-SHE}* est similaire à 99 % avec le gène *bla_{OXA-55}* et a été mis en évidence dans plusieurs souches cliniques de *Shewanella algae* mais également dans des souches environnementales isolées d'algues rouges ainsi que d'invertébrés et poissons sauvages de la Mer Baltique et du Japon (Ohama *et al.*, 2021). Similairement à la souche de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629, les auteurs ont identifié des gènes de types *qnrA* (A1, A2, A3, A5 et A7) associés au gène *bla_{OXA-SHE}*. Cependant, le gène *bla_{OXA-SHE}* n'a à notre connaissance jamais été mis en évidence dans l'espèce *V. parahaemolyticus*.

Ensuite, nous avons construit une librairie métagénomique pour chaque souche de *V. parahaemolyticus*. Cela consistait dans un premier temps à fragmenter l'ADN génomique des souches de *V. parahaemolyticus* de manière enzymatique. En fragmentant l'ADN génomique pendant 5 min avec la fragmentase, la taille des fragments était plus grande (entre 100 et 3 000 pb) qu'en fragmentant l'ADN pendant 10 min comme recommandé par le fabricant. En clonant ces fragments d'ADN au sein du plasmide pZE21-MCS et en réalisant la transformation bactérienne, nous avons remarqué qu'une majorité des plasmides avaient intégré des fragments de taille inférieure à 500 pb. Des fragments d'ADN supérieurs à 500 pb sont à privilégier dans la mesure où les GRA peuvent avoir une taille comprise entre 200 pb (le gène *dfrB* codant pour la résistance au triméthoprimé fait 237 pb par exemple) et plus de 1 900 pb (les gènes de résistance aux tétracyclines *tetM*, *tetW* et *tetO* font plus de 1 920 pb) (van Hoek *et al.*, 2011). Nous avons de plus fortes chances d'identifier plusieurs GRA associés à des EGM si les fragments d'ADN clonés dans les plasmides sont d'une taille supérieure à 2 000 pb. Afin de générer des bibliothèques métagénomiques possédant des plasmides avec des plus grands inserts génétiques, trois solutions ont été proposées. En diminuant le temps d'incubation de l'ADN avec la fragmentase, des fragments d'ADN de plus grande taille pourraient être générés. Une plus grande quantité d'ADN pourrait également être utilisée. En effet, Marathe *et al.* (2018) ont fragmenté 5 µg d'ADN extraits de sédiments de rivière pendant 5 min en utilisant la même enzyme et ont ainsi

obtenu des bibliothèques métagénomiques avec une taille moyenne d'insert de 1,2 kb. Pour un meilleur contrôle des tailles des fragments d'ADN à cloner, une purification des bandes de la taille voulue à partir du gel d'agarose pouvait être effectuée comme cela a été fait dans la publication de Sommer *et al.* (2009).

Afin de construire les bibliothèques métagénomiques, nous avons également comparé deux méthodes de transformation bactérienne. La méthode de transformation par choc thermique s'est avérée être efficace pour le plasmide témoin pUC19 avec une efficacité de transformation conforme aux indications du fabricant des cellules compétentes d'*E. coli*. En revanche, cette méthode de choc thermique avait une efficacité diminuée de plus de 4 log UFC/ μ g de plasmide pour la transformation des plasmides recombinants. De plus, nous avons observé la présence de plasmides en majorité vides dans les cellules transformées. Cette différence d'efficacité entre le plasmide pUC19 et les plasmides recombinants pourrait s'expliquer par une taille plus importante de plasmides pZE21-MCS possédant des grands fragments d'ADN. Le passage de ces plasmides de grande taille par les pores de la membrane plasmique générés lors du choc thermique serait alors difficile contrairement aux plus petits plasmides. La méthode de transformation la plus répandue dans la littérature étant l'électroporation, nous avons décidé d'essayer cette technique pour transformer les plasmides recombinants. Comme la méthode de choc thermique, l'électroporation s'est avérée être très efficace pour transformer le plasmide pUC19 dans les cellules d'*E. coli* (9,8 log UFC/ μ g de plasmide). Cette technique était également très efficace pour les plasmides recombinants avec des efficacités de transformations similaires au plasmide témoin (entre 7,4 et 7,7 log UFC/ μ g d'ADN). Les tailles des bibliothèques métagénomiques générées par électroporation à partir des souches de *Vibrio* étaient de $5,6 \cdot 10^{-2}$ à $1,7 \cdot 10^{-1}$ Gb correspondant à environ 10 à 30 fois la taille du génome total de *Vibrio parahaemolyticus* qui peut avoir une taille allant de 4,95 à 6,05 Mb (Pang *et al.*, 2020). En réalisant des bibliothèques métagénomiques à partir d'ADN d'échantillons complexes comme des effluents industriels et des sols agricoles, Zhang *et al.* (2019) et Su *et al.* (2014) ont obtenus des bibliothèques de tailles comprises entre 0,4 et 3,6 Gb. Cette différence entre leurs bibliothèques métagénomiques et les nôtres peut

s'expliquer par un clonage de fragments d'ADN de plus grandes tailles (entre 2 et 9 kb) par rapport à notre étude (entre 0,1 et 1,9 kb). Cependant, l'analyse des séquences des inserts après le criblage des bibliothèques métagénomiques de *Vibrio* sur antibiotiques a été concluante.

Nous avons obtenu deux clones résistants à la tétracycline à partir de la bibliothèque 13-B3PA-2931 et six clones résistants au sulfaméthoxazole à partir de la bibliothèque 16-B3PA-0006. Plusieurs bases de données ont été utilisées pour analyser les séquences obtenues, notamment des bases de données de référence sur les GRA. Avec la base de données ResFinderFG qui est spécialisée dans l'identification des déterminants de la résistance aux antimicrobiens obtenus par métagénomique fonctionnelle, nous avons observé une homologie de séquence avec une séquence codant pour une pompe à efflux de la tétracycline seulement pour le clone 13-TET-1 qui était résistant à la tétracycline. Cependant, aucun nom de gène de résistance n'est ressorti et le nom du hit « tet_efflux » peut correspondre au gène *tetA* mais également à ses variants. Cette base de données est fondée sur 50 études de métagénomique fonctionnelle réalisées sur des échantillons humains, animaux et environnementaux et a été mise à jour en juin 2022. Enrichir cette base de données avec plus de résultats provenant de l'analyse d'échantillons d'environnements divers permettra à l'avenir de rendre les études de métagénomique fonctionnelle plus robustes. Les résultats d'identification des gènes dans les clones résistants au sulfaméthoxazole étaient également peu concluants en utilisant la base de données ResFinder. Nous avons identifié le gène *sul2* pour 4 des 6 séquences des clones résistants au sulfaméthoxazole dont la longueur de séquence était en moyenne de 1 840 pb. Cette identification du gène *sul2* concordait avec les résultats du séquençage complet de la souche de *Vibrio parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 mis en évidence par Briet *et al.* (2018). Pour les deux autres séquences d'environ 1 140 pb, aucune homologie n'a été observée avec cette base de données. Pour les mêmes séquences analysées, les bases de données CARD et ARG-ANNOT ont permis d'obtenir plus d'informations sur les gènes présents. Pour les séquences des 2 clones résistants à la tétracycline, le gène *tetA* a pu être identifié avec la base de données CARD. Nous avons également pu déceler la présence du gène régulateur *tetR* associé à *tetA* en utilisant la base de données ARG-ANNOT. Ce gène

tetR n'a en revanche pas été identifié en réalisant un blast de la séquence complète du génome de *V. parahaemolyticus* 13-B3PA2931 dans la base de données ResFinder étant donné que le gène *tetR* code pour un régulateur transcriptionnel et n'est pas un GRA (Zankari, 2014). Pour les séquences des 6 clones résistants au sulfaméthoxazole, ces deux bases de données ont permis l'identification du gène de résistance *sul2* associé au gène de résistance aux aminoglycosides *strA* dans les inserts de plus grande taille ce qui était cohérent au vu des résultats de séquençage du génome complet de la souche de *Vibrio* 16-B3PA-0006 (Briet *et al.*, 2018). En utilisant la base de données ARG-ANNOT, Gupta *et al.* (2014) ont analysé le génome de plusieurs souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus* et ont détecté un nombre plus élevé de GRA qu'en utilisant la base de données ResFinder. Alors que la base de données ARG-ANNOT est archivée depuis mai 2018, CARD est active et mise à jour chaque mois permettant une comparaison de séquences avec des gènes de résistance nouvellement découverts. Enfin, la base de données nucléotidiques de NCBI nous a permis d'obtenir des résultats assez similaires à CARD et ARG-ANNOT mais également des informations supplémentaires sur les gènes environnants. En effet, nous avons pu identifier le gène *merR* impliqué dans la régulation de la résistance au mercure dans l'environnement génétique des gènes *tetA* et *tetR* identifiés dans la souche *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006. Ce gène *merR* est principalement localisé dans les bactéries à Gram négatif dans les transposons Tn 21 et Tn 501 et réagit aux stimuli environnementaux tels que le stress oxydatif, les métaux lourds et même les antibiotiques (Brown *et al.*, 2003). De plus, le transposon Tn 21 a été décrit comme inséré dans un autre transposon de résistance au chloramphénicol (Tn 9) porté par le plasmide R100 qui porte à son tour un autre transposon de résistance à la tétracycline médiée par les gènes *tetA*, *tetR*, *tetC* et *tetD* (Gillings and Stokes, 2012).

La sélection des clones sur érythromycine n'a pas été concluante. L'analyse des inserts plasmidiques des clones qui se sont développés en présence de cet antibiotique n'a révélée que des gènes non impliqués dans la résistance aux antimicrobiens tels que des gènes codant pour la biosynthèse flagellaire ou pour des ARN à hélicase. Deux hypothèses peuvent être avancées quant à ces résultats. Premièrement, le milieu LB utilisé pour le criblage pourrait contenir des inhibiteurs

agissant sur l'érythromycine et entraîner son inactivation comme cela a été démontré pour des antibiotiques récents tels que le triméthoprim (Willms *et al.*, 2021). L'utilisation du milieu Mueller-Hinton est à favoriser pour le criblage des bibliothèques métagénomiques car il contient moins d'inhibiteurs affectant la sensibilité aux antibiotiques et est utilisé pour la réalisation des antibiogrammes. Deuxièmement, la concentration en érythromycine utilisée pour le criblage n'était peut-être pas optimale. Cette concentration de 100 µg/ml a été choisie en nous basant sur les CMI utilisées dans les études de González-Plaza *et al.* (2018) et Su *et al.* (2014) qui ont employé les plasmides pCF430 et pUC19, respectivement, pour la réalisation des bibliothèques métagénomiques. Nous devrions tester plusieurs concentrations en érythromycine sur les souches d'*E. coli* DH5α possédant le plasmide pZE21-MCS vide pour déterminer la CMI de cet antibiotique pour le plasmide pZE21-MCS. Finalement, certains gènes de résistance présents dans les souches de *Vibrio* analysées n'ont pas été identifiés par la méthode de métagénomique fonctionnelle malgré un criblage sur les antibiotiques cibles. Notamment, les gènes *bla*_{NDM-1} et *sul1* n'ont pas été identifiés dans *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006, les gènes *tet(59)* et *sul2* dans *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 ainsi que le gène *qnrA5* dans *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 malgré leur identification par le séquençage complet de leur génome et leurs résistances phénotypiques aux antibiotiques correspondant (Briet, 2018). L'absence de croissance des bibliothèques métagénomiques en présence des antibiotiques correspondant aux résistances de ces gènes peut être attribuée à des fragments d'ADN insérés de trop petite taille qui ont entraîné une perte de l'information génétique. A l'inverse, l'identification d'un gène de résistance dans une souche bactérienne malgré une absence de phénotype de résistance à l'antibiotique peut être liée à un gène non exprimé dit « silencieux ». La plupart des études génétiques sur la résistance aux antimicrobiens portant sur des bactéries avec une résistance phénotypique, la présence de gènes silencieux est peu étudiée. Les travaux menés par Wu *et al.* (2001) et Rowe-Magnus *et al.* (2002) ont permis de mettre en évidence le gène *mecA* (impliqué dans la synthèse de peptidoglycane en présence de β-lactamines) dans *Staphylococcus sciuri* et *catB9* (codant pour la résistance au chloramphénicol) dans l'espèce *Vibrio cholerae* qui n'étaient pas exprimés. De même, la présence de

GRA silencieux comme *bla*_{OXA-2}, *aadA1*, *sul1* et *tetA* dans le plasmide pVE46 dans *E. coli* a été observée (Enne *et al.*, 2006). Cette absence d'expression du gène peut notamment provenir d'une absence de promoteur ou de l'absence d'ARNm malgré des séquences de promoteurs et de GRA intactes. Afin de mettre en évidence des GRA silencieux, une approche de métatranscriptomique peut être envisagée. Cette technique permet d'étudier la régulation des gènes de résistance et est basée sur le séquençage direct des ADNc synthétisés à partir des ARNm extraits d'échantillons complexes.

Toutes les étapes liées à la préparation des bibliothèques métagénomiques sont critiques et doivent être contrôlées afin de veiller au bon déroulement de la méthode, notamment la production de fragments d'ADN de taille optimale et l'intégration des plasmides recombinants dans les cellules bactériennes hôtes. L'optimisation de ces étapes permettrait de générer des bibliothèques métagénomiques de tailles conséquentes et ainsi de retrouver un maximum d'informations génétiques pour caractériser l'ensemble des GRA présents dans les échantillons. De plus, le clonage de fragments d'ADN de grande taille au sein du vecteur plasmidique donnerait des informations supplémentaires sur les EGM associés aux GRA et impliqués dans leur propagation. D'autres optimisations de cette méthode de métagénomique fonctionnelle devront être faites sur les souches de *Vibrio* pour intégrer de plus grands fragments d'ADN avant de l'appliquer à des échantillons complexes comme les différentes matrices représentatives du réseau trophique benthique que nous avons étudié. Nous avons vu dans les Chapitres II et III qu'il y avait une forte prévalence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla*_{TEM} et *sul1* dans les échantillons d'eau de mer, de plancton, de mollusques bivalves et de poissons plats dans la Manche et la Mer du Nord. Le gène indicateur de résistance aux antimicrobiens *int11* était également abondant dans ces échantillons et reflétait la présence d'intégrons de classe 1 dans lesquels plusieurs GRA sous forme de cassettes peuvent être intégrés. L'utilisation de la méthode de métagénomique fonctionnelle sur ces échantillons permettra de mieux caractériser le résistome/mobilome et d'identifier potentiellement de nouveaux GRA. Parmi ces nouveaux GRA identifiés, certains pourraient même constituer de nouveaux gènes indicateurs potentiels pour le suivi de la contamination de l'environnement marin par

la résistance aux antimicrobiens en complément des gènes proposés par Berendonk *et al.* (2015). Cette méthode de métagénomique fonctionnelle a notamment permis d'identifier de nouveaux gènes codant pour des β -lactamases à partir d'échantillons de sédiments de rivière en Inde (Marathe *et al.*, 2018) ainsi que d'effluents industriels et de boues d'épuration en Angleterre (Zhang *et al.*, 2019). De plus, une utilisation combinée de différentes bases de données spécialisées dans les GRA et les EGM ainsi que de bases de données plus générales permettra de mieux caractériser le résistome et le mobilome associés aux échantillons.

V. Conclusion

- L'analyse de la **séquence du génome** total de la souche de *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 a permis d'identifier les gènes de résistance *bla*_{CARB-35/43/44} (β -lactamines) en plus des gènes *bla*_{NDM-1}, *floR*, *tetA*, *sul1*, *sul2*, *aadA2b*, *strA*, *strB* et *dfrA16* déjà identifiés dans la souche par Briet *et al.* (2018).
- Les gènes *bla*_{CARB-26}, *floR*, *tetA*, *tet(59)*, *sul2*, *strA* et *strB* ont été identifiés dans la souche 13-B3PA-2931.
- La présence du gène *bla*_{OXA-SHE} associé au gène *qnrA5* dans la souche 12-B3PA-1629 a été décrite pour la première fois dans cette espèce bactérienne.
- La méthode de **transformation** bactérienne par **électroporation** était plus efficace que par **choc thermique** pour introduire les **plasmides recombinants** dans les cellules d'*E. coli*.
- La méthode de **métagénomique fonctionnelle** a permis d'identifier les **GRA** *tetA*, *sul2* et *strA* mais également les gènes *tetR* et *merR* impliqués dans la régulation de la résistance aux tétracyclines et au mercure, respectivement.
- Certains **GRA** présents dans les souches de *V. parahaemolyticus* n'ont pas été détectés malgré un **criblage** en présence des **antibiotiques cibles** probablement en raison d'une **taille d'insert** insuffisante.
- Des **optimisations** sur l'élaboration des **bibliothèques métagénomiques** des souches de *Vibrio* sont nécessaires notamment pour générer de **plus grands fragments d'ADN** avant d'être appliquée à des échantillons environnementaux. Cela permettra de **valider** le protocole pour **maximiser** le **rendement** de l'information génétique obtenu à partir des **échantillons environnementaux**.
- La **métagénomique fonctionnelle** est une méthode prometteuse pour caractériser le **résistome** et le **mobilome** de matrices environnementales indépendamment de la culture des microorganismes et permettra d'identifier de **nouveaux gènes de résistance** à des antibiotiques cibles.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse a été de faire un état des lieux de la contamination par la résistance aux antimicrobiens de la Manche et de la Mer du Nord en suivant quatre gènes indicateurs (*tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11*). Pour cela, des échantillons d'eau douce, d'eau de mer, de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats (représentatifs d'un réseau trophique benthique) ont été analysés.

Dans un premier temps, il était nécessaire de disposer de protocole optimal d'extraction d'ADN bactérien total pour ensuite réaliser l'analyse moléculaire d'échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de chair de mollusques bivalves, de peau, de branchies et de viscères de poissons plats. Parmi les sept méthodes d'extraction d'ADN testées, nous avons sélectionné le kit PowerBiofilm® (Qiagen) qui a permis d'obtenir des concentrations plus élevées en ADN en comparaison des autres méthodes avec une meilleure pureté. De plus, l'efficacité d'amplification du gène bactérien *tuf* de ces extraits d'ADN avec ce kit était optimale. En effet, nous avons ajouté dans la moitié des échantillons la souche de *L. monocytogenes* B3PA-Lm1 comme contrôle positif de processus ce qui a permis de montrer que ce kit d'extraction était efficace pour éliminer les inhibiteurs de PCR pouvant être présents dans les différents échantillons. Nous avons ainsi obtenu un taux de faux-négatifs de 6 % toutes matrices confondues. Ce contrôle positif de processus a également permis de mettre en évidence une présence importante d'inhibiteurs de la PCR dans les extraits d'ADN de chair de mollusques bivalves et de viscères de poissons plats avec des taux de faux-négatifs supérieurs à 20 % toutes méthodes d'extraction d'ADN confondues. La seconde étape importante pour l'étude moléculaire de la résistance aux antimicrobiens était l'optimisation des réactions de qPCR ciblant les gènes indicateurs de la résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11*. Cette optimisation était nécessaire dans la mesure où des réactifs de biologie moléculaire, des fournisseurs d'amorces et des thermocycleurs différents étaient utilisés dans les publications sur lesquelles nous nous sommes basés. Après une étude comparative, nous avons ainsi sélectionné le pré-mix de Roche et une concentration finale en amorces de 0,4 µM pour les réactions de qPCR utilisant la coloration SYBR Green et ciblant les gènes *tetA* et *bla_{TEM}*. Des concentrations finales en amorces et en sonde de 0,4 et 0,2 µM,

respectivement, ont été validées pour les qPCR utilisant la technologie de sonde TaqMan et ciblant les gènes *sul1* et *int11*. Ces conditions ont été validées dans la mesure où elles ont permis d'obtenir une bonne sensibilité des réactions de qPCR tout en limitant les réactions non spécifiques dues à la formation de dimères d'amorces par exemple. Nous avons validé l'ensemble de ces protocoles d'extraction d'ADN et de qPCR sur la base de normes françaises et européennes (NF EN ISO 20837:2006, NF EN ISO 22174:2005, NF EN ISO 22118:2011, NF U47-600-1:2015 et NF U47-600-2:2015) pour une application sur les échantillons marins.

Dans la continuité de ces travaux, il serait dans un premier temps intéressant de modifier les protocoles de préparation des échantillons marins. Nous avons vu dans le Chapitre III que combiner les résultats d'abondance des gènes dans les différents niveaux trophiques était compliquée en raison d'unités différentes. Il faudrait alors rapporter l'ensemble des mesures à la masse de l'échantillon pour intégrer tous les niveaux trophiques dans les modèles de contamination des échantillons par la résistance aux antimicrobiens que nous avons réalisé. Par exemple, il est possible de lyophiliser les échantillons de phytoplancton et de zooplancton et de prélever une quantité définie de peau de poisson plat plutôt que de passer une éponge imbibée d'EPT sur leur surface. Concernant la préparation des échantillons d'eau de surface, l'analyse du filtre de 1,2 μm ayant servi à la préfiltration des échantillons d'eau pourrait donner des informations génétiques supplémentaires. Il se peut que certaines bactéries sous forme d'agrégats ou de biofilms se soient accumulées à cette taille de porosité. Il serait intéressant de prendre en compte ces bactéries étant donné que les biofilms sont connus pour favoriser le transfert des gènes de résistance aux antimicrobiens (Bowler *et al.*, 2020). De plus, le filtrat résultant des trois filtrations successives des échantillons d'eau pourrait également contenir des informations relatives aux gènes de résistance associés aux bactériophages car ceux-ci ont une taille comprise entre 24 et 200 nm environ (Mayer and Camberlein, 2013). L'utilisation d'un filtre de porosité inférieure à 0,22 μm et/ou l'analyse du filtrat seraient alors à envisager. De plus, afin de diminuer le seuil de sensibilité des qPCR ciblant les gènes indicateurs dans les échantillons d'eau, il serait intéressant de filtrer un plus grand volume d'eau pour concentrer plus de matériel génétique

sur les filtres. Cependant, filtrer de grands volumes d'eau peut être laborieux au vu des nombreux contaminants qui peuvent colmater les filtres. Pour pallier ce problème, il existe le kit LVC (Large Volume Concentration, InnovaPrep, Drexel, Etats-Unis) qui permet de concentrer les bactéries, les bactériophages et l'ADN libre contenus dans 100 L d'eau en un volume final d'environ 50 ml. Il est également possible de concentrer ce volume en un volume de 250 μ l en utilisant une pipette de concentration d'InnovaPrep puis de procéder directement à l'extraction d'ADN total qui sera utiliser pour quantifier les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens.

Il serait intéressant sur le long terme de standardiser les protocoles de préparation des échantillons d'origine marine et d'extraction d'ADN bactérien total étant donné qu'il n'existe aucune norme ni aucun standard sur ces procédures. Il faudrait également développer un kit d'extraction d'ADN spécifique de ces matrices qui prendrait en compte la nature des échantillons pour l'étape de lyse cellulaire et la nature des contaminants environnementaux pour l'étape de purification de l'ADN. L'incorporation d'un contrôle positif de processus dans ces protocoles devrait aussi être envisagé. La souche de *L. monocytogenes* B3PA-Lm1 a été utilisée comme contrôle positif de processus dans nos échantillons marins dans le Chapitre I et a permis d'identifier les résultats faux négatifs à cause de la présence d'inhibiteurs de PCR qui n'ont pas été éliminés lors des étapes d'extraction d'ADN. Ce contrôle de processus n'a pas pu être appliqué lors de l'étude de l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens et du gène bactérien *tuf* dans les échantillons d'eau et les échantillons représentatifs du réseau trophique benthique dans les Chapitres II et III. En effet, l'ajout de cette souche bactérienne dans les échantillons marins aurait donné lieu à une surestimation de la quantité de la biomasse microbienne dans la mesure où *L. monocytogenes* possède une copie du gène *tuf*. Il faudrait donc développer un autre contrôle positif de processus qui serait ajouté aux échantillons marins. Le choix de ce contrôle est cependant complexe car il faudrait une souche bactérienne ne possédant pas le gène *tuf* ni de gènes de résistance aux antimicrobiens qui seraient ciblés par les qPCR utilisées ou fabriquer un plasmide sans gène de résistance aux antimicrobiens. Ce dernier point est envisageable mais assez long à réaliser.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons appliqué les protocoles d'extraction d'ADN et de qPCR à des échantillons d'eau de mer, de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats prélevés dans la Manche et la Mer du Nord lors de la campagne océanographique IBTS 2020 ainsi qu'à des échantillons d'eaux fluviales et côtières prélevés près de Boulogne-sur-Mer. Pour cela, nous avons préalablement validé un protocole de filtration d'eau et d'extraction d'ADN à partir des filtres sur les échantillons d'eaux fluviales et côtières. La préfiltration de l'eau sur une membrane filtrante de 1,2 μm pour éliminer différents contaminants tels que la matière organique puis une filtration successive sur des filtres de 0,45 et 0,22 μm a permis de récupérer entre 10^6 et 10^8 copies du gène *tuf* par litre d'eau pour chacun des filtres. De plus, les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens ont pu être quantifiés à partir de l'ADN extrait de ces deux tailles de filtres avec un phénomène de décroissance de l'abondance des gènes entre les eaux fluviales et les eaux côtières. Cela a montré qu'une seule filtration sur un filtre de 0,45 μm ne retenait pas toute l'information génétique. Une analyse combinée des deux filtres a alors été validée pour les échantillons d'eau de mer prélevés dans la Manche et la Mer du Nord. De plus, des enrichissements non sélectifs en EPT et en EPSA ont été faits afin de revivifier et de multiplier les bactéries présentes dans les échantillons d'eau et les échantillons représentatifs du réseau trophique benthique pour avoir un nombre de copies des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens au-dessus de la limite de quantification des qPCR.

La contamination plus importante de la Liane par les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens par rapport aux autres échantillons d'eaux de surface pouvait être expliquée par l'impact potentiel des différents rejets des stations de traitement des eaux usées en amont du point de prélèvement. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en réalisant des prélèvements le long du fleuve, en aval et en amont de différentes stations de traitement des eaux usées dans le Pas-de-Calais. Cela permettra de déterminer la quantité de gènes de résistance aux antimicrobiens déversée dans le fleuve et d'observer s'il y a vraiment un effet de dilution de la station de traitement des eaux usées jusqu'au milieu marin comme expliqué par Gao *et al.* (2018). Cet échantillonnage pourrait également

être réalisé à des périodes définies sur plusieurs années pour prendre en compte l'effet d'une augmentation de la température de l'eau et des activités récréatives durant l'été sur l'occurrence des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. La mesure des paramètres environnementaux pourrait être faite dans ces eaux avec un multiparamètre avec sonde autonome qui a été récemment acquis au laboratoire et qui permet de mesurer le pH, la salinité, la turbidité, la saturation en oxygène, la température et la pression de l'eau. L'analyse de ces différentes mesures environnementales en lien avec les gènes indicateurs serait alors comparée à celle réalisée sur le milieu marin pour déterminer quels facteurs influencent l'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans les eaux de surface. A long terme, la mise en place d'un système de surveillance de la résistance aux antimicrobiens dans les eaux de surface en France et en Europe permettrait une meilleure gestion de la contamination biologique de ces eaux et du risque sanitaire que cela encourt.

L'analyse des échantillons d'eau de mer et du réseau trophique benthique enrichis et non enrichis a révélée une prévalence totale de 81,4 % des quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord avec une prévalence de 39,5 % du gène *tetA*, 36,7 % du gène *bla_{TEM}*, 57,1 % du gène *sul1* et 61,0 % du gène *int11*. Les gènes *sul1/int11* ont été les indicateurs les plus quantifiés dans les échantillons d'eau de mer, de phytoplancton, de zooplancton, de mollusques bivalves et de poissons plats. Les gènes *tetA/bla_{TEM}* ont été peu quantifiés dans les échantillons mais avaient une prévalence élevée dans les enrichissements des échantillons notamment des branchies et des viscères de poissons plats.

La prévalence et l'abondance de ces gènes variaient selon la nature de l'échantillon mais également selon la zone d'échantillonnage en raison d'impacts anthropiques différents associés à une forte dissémination des gènes. Une contamination plus importante des échantillons a été constatée dans la Manche Est, une zone considérée comme une véritable autoroute de la mer en raison d'un trafic maritime intense et impliquant différents rejets dans l'environnement marin ainsi qu'à l'Embouchure de la Tamise qui est soumise aux effluents du fleuve. Les échantillons d'eau de mer

avaient une contamination par les gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens plus importante près de la Côte Ouest des Pays-Bas, une zone caractérisée par la présence de plateformes éoliennes et pétrolières offshore. Certains gènes ont été détectés dans les ADN extraits après les enrichissements en EPT et en EPSA mais pas dans l'ADN total extrait sans étape d'enrichissement en raison d'un nombre de copies des gènes insuffisant pour être quantifiés par qPCR. A l'inverse, une quantification des gènes indicateurs dans les ADN extraits des échantillons non enrichis mais une absence de détection dans les ADN des échantillons enrichis a été constatée témoignant de la présence de bactéries non cultivables dans les échantillons ou d'un portage des gènes indicateurs par d'autres hôtes comme les bactériophages ou sous forme d'ADN libre. Cette hypothèse était corroborée avec les résultats d'abondance relative des gènes indicateurs par rapport au gène bactérien *tuf* qui a été quantifié dans les échantillons pour estimer la quantité de biomasse microbienne. Cette abondance relative avait une tendance similaire à l'abondance absolue des gènes indicateurs montrant que ces gènes étaient potentiellement portés par les bactéries quantifiées avec le gène *tuf*. De plus, l'analyse des corrélations a montré que l'abondance absolue du gène *tuf* était partiellement corrélée à celle des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens associés aux échantillons d'eau de mer et de phytoplancton. Une approche avec et sans enrichissement des échantillons est donc préférable pour optimiser l'étude de l'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin. Nous avons également mis en évidence l'impact de certains facteurs environnementaux tels que la turbidité et la saturation en oxygène sur l'abondance des gènes indicateurs associés à l'eau de mer et aux communautés phytoplanctoniques. De plus, nous avons pu observer un phénomène d'accumulation des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens le long du réseau trophique benthique grâce à une modélisation de l'abondance relative des gènes indicateurs en fonction du niveau trophique.

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur le suivi de quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* dans l'environnement marin. Ces gènes et d'autres ont été proposés comme indicateurs pour évaluer la contamination de l'environnement par

la résistance aux antimicrobiens par Berendonk *et al.* (2015). Cependant, il est difficile de pouvoir choisir des gènes indicateurs pour le suivi de la résistance aux antimicrobiens dans le milieu marin étant donné le peu de données disponibles sur l'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans ce milieu en comparaison avec le milieu terrestre. De plus, contrairement aux bactéries indicatrices de contamination fécale, il n'existe aucune définition pour ces gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens. Dans un premier temps, il serait intéressant de cibler par qPCR dans nos échantillons marins les autres gènes proposés comme indicateurs de résistance aux antimicrobiens comme les gènes *sul2* (codant pour la résistance aux sulfonamides), *bla_{CTX-M}*, *bla_{NDM-1}* et *mecA* (résistance aux β -lactamines), *bla_{VIM}* et *bla_{KPC}* (résistance aux carbapénèmes), *qnrS* (résistance aux quinolones), *aac-(6')-Ib-cr* (résistance aux aminosides et fluoroquinolones), *vanA* (résistance aux glycopeptides), *ermB* et *ermF* (résistance aux macrolides), *tetM* (résistance aux tétracyclines) et *aph* (résistance aux aminosides). La plupart de ces gènes ont déjà été identifiés dans des échantillons d'eaux côtières, de sédiments marins et de moules (Sacramento *et al.*, 2019) (Li *et al.*, 2020) (Su *et al.*, 2020) (Tan *et al.*, 2018).

Le choix d'un ou deux gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens adaptés au milieu marin se ferait avec les données de prévalence et d'abondance de l'ensemble des gènes ciblés dans nos échantillons marins et en définissant certains critères pour être validés comme indicateurs. D'abord, les gènes devraient être facilement détectés d'une grande majorité des échantillons marins. Nous avons vu que les gènes *sul1* et *int11* seraient de bons indicateurs pour le milieu marin car ils avaient une prévalence de 57,1 % et 61,0 % dans la Manche et la Mer du Nord, respectivement. Ensuite, les gènes indicateurs devraient valider les critères définis par Berendonk *et al.* (2015) comme leur pertinence clinique et leur association avec des éléments génétiques ou tout autre vecteur de transmission de la résistance. A long terme, le ou les gènes validés comme indicateurs de contamination de l'environnement marin par la résistance aux antimicrobiens pourraient être suivis à grande échelle dans les mers et les océans à travers le monde.

Dans les Chapitres II et III, nous avons émis des hypothèses sur les apports anthropiques pouvant expliquer l'abondance des gènes indicateurs *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11* observée dans la Manche et la Mer du Nord. Ces apports anthropiques étaient notamment les effluents des bateaux, des activités portuaires, des plateformes pétrolières, des fleuves et les eaux de lestage. Afin d'identifier les sources de contamination de l'environnement marin par la résistance aux antimicrobiens, il est possible de faire un suivi des sources microbiennes (ou Microbial Source Tracking). Cette technique permet de déterminer si les gènes de résistance quantifiés dans les échantillons sont issus d'une contamination mais également de distinguer si cette contamination est d'origine humaine ou animale. Pour cela, il existe différents marqueurs génétiques comme le gène mitochondrial humain *hmt*. Ce gène a notamment été utilisé pour déterminer le degré de contamination potentielle de sédiments marins en Arctique par les activités d'origine humaine et son abondance était corrélée à celle de gènes de résistance aux antimicrobiens tels que *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetM* et *bla_{TEM}* (Tan *et al.*, 2018). Il existe également le marqueur HF183 qui cible les Bacteroidales spécifiques à l'Homme (Reynolds *et al.*, 2020). Le suivi de ces marqueurs spécifiques à l'Homme pourrait donner des informations supplémentaires sur une contamination de l'environnement marin par les effluents des bateaux ou les rejets liés aux stations offshore. D'autres marqueurs génétiques de contamination d'origine animale existent comme un marqueur ciblant la bactérie *Catellibacterium marimammalium* qui est spécifique des fèces de goélands. Ce marqueur a été utilisé dans des eaux de baignade en Irlande et était corrélé à l'abondance du gène *bla_{TEM}* ce qui démontre le rôle des goélands dans la dissémination des gènes de résistance aux antimicrobiens (Reynolds *et al.*, 2020).

A long terme, ces marqueurs de suivi des sources microbiennes ainsi que les gènes sélectionnés et validés comme indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans le milieu marin feraient alors l'objet d'une mise au point de qPCR. L'utilisation de la qPCR est une bonne approche qui est spécifique et qui permet d'avoir des données quantitatives sur les gènes que l'on veut cibler. Cependant, elle peut prendre du temps à être mise en place si beaucoup de gènes sont recherchés dans un grand nombre d'échantillons. Une alternative serait de développer une PCR en temps réel à

haut-débit qui permettrait de détecter l'ensemble de ces gènes dans les échantillons marins. Cette méthode est sensible, spécifique, rapide et a déjà été appliquée à l'étude de la résistance aux antimicrobiens comme dans l'étude de Delannoy *et al.* (2022) pour détecter des marqueurs de résistance aux antimicrobiens dans les bactéries à Gram négatif isolées de produits de la mer. L'utilisation de la PCR en temps réel à haut-débit permettrait donc de cribler de manière rapide et spécifique les marqueurs génétiques avant d'employer la qPCR TaqMan pour déterminer leur abondance absolue au sein des échantillons.

Après avoir défini les gènes indicateurs et la méthode à utiliser pour leur suivi dans l'environnement marin, nous pourrions étudier plus finement d'autres réseaux trophiques benthiques mais aussi pélagiques. Par exemple, des espèces de poissons pélagiques comme le hareng, l'anchois, le maquereau, la sardine et le sprat ainsi que des espèces démersales comme le merlan, le tacaud, le cabillaud et le bar ont pour la plupart été pêchées lors de la campagne océanographique IBTS 2020 (Lazard *et al.*, 2021) et sont consommées par les français (EUMOFA, 2021). Afin de compléter le réseau trophique, il faudrait également analyser d'autres espèces de mollusques bivalves filtreurs comme la moule sauvage ou la coquille Saint-Jacques qui vivent également dans la Manche et la Mer du Nord et sont consommées par les français. Ces espèces sont intéressantes dans la mesure où elles ont été proposées comme espèces sentinelles de l'environnement en raison de leur capacité à filtrer de grands volumes d'eau et à concentrer les différents contaminants. Nous avons analysé quelques spécimens de mollusques bivalves dans cette étude mais une analyse à plus grande échelle permettra de mieux appréhender leur rôle comme réservoir de gènes de résistance aux antimicrobiens. Concernant les poissons, nous avons analysé les prélèvements de peau, de branchies et de viscères. La présence des gènes de résistance aux antimicrobiens au niveau de ces organes représente un danger pouvant donner lieu à des contaminations croisées avec l'environnement industriel lors de leur transformation. Le filet des poissons peut également être un danger pour le consommateur s'il est contaminé par des bactéries ou des gènes de résistance aux antimicrobiens dans la mesure où c'est la partie consommée du poisson. L'étude réalisée par Helsens *et al.* (2020) sur des truites arc-en-ciel issues d'un élevage

piscicole en eau douce a révélé la présence de gènes de résistance aux β -lactamines, aux tétracyclines, aux macrolides et à la vancomycine dans les filets. L'analyse des filets des poissons serait donc pertinente pour mieux évaluer le danger que représente la résistance aux antimicrobiens associée aux poissons. Tout cela permettra à long terme de mieux comprendre la dynamique de transmission de la résistance aux antimicrobiens au sein des réseaux trophiques marins tout en caractérisant au mieux le danger qu'ils représentent en santé humaine.

Ce plan d'échantillonnage plus conséquent pourrait être mis en pratique lors d'autres campagnes océanographiques de type IBTS. Les informations acquises dans ces campagnes seraient alors confrontées à celles déjà obtenues pour étudier la variation temporelle de l'occurrence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans la Manche et la Mer du Nord. Des échantillonnages dans plusieurs mers et océans près d'autres continents et durant plusieurs années permettraient d'étudier les variations spatio-temporelles de l'occurrence des gènes pour voir si ce qu'on observe dans la Manche et la Mer du Nord est retrouvé ailleurs et constitue un résistome propre à l'environnement marin. Par exemple, il existe la campagne SuchiMed pour la surveillance du littoral méditerranéen. Lors de cette campagne, un état des lieux de la contamination chimique dans la Mer Méditerranée est réalisé en plaçant des stations artificielles de moules à différents points de la Mer Méditerranée afin d'étudier leur capacité à accumuler les contaminants chimiques présents dans l'eau. Etant donné que nous avons mis en évidence une accumulation des gènes indicateurs de contamination de l'environnement par la résistance aux antimicrobiens dans les pétoncles blancs, il serait intéressant d'étudier l'occurrence de ces gènes indicateurs dans ces individus de moules.

Après avoir détecté et quantifié les quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons marins par qPCR dans nos travaux, nous avons développé une méthode de métagénomique fonctionnelle qui permet d'identifier les gènes de résistance associés à un antibiotique cible. Des souches de *V. parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche et possédant des résistances phénotypiques à des antibiotiques ont été utilisées pour faire cette mise au point. Afin

d'identifier les gènes connus responsables de ces résistances phénotypiques, un séquençage complet du génome de ces souches a été réalisé. Ainsi, nous avons identifié les gènes *bla*_{CARB-35/43/44}, *bla*_{NDM-1}, *floR*, *tetA*, *sul1*, *sul2*, *aadA2b*, *strA*, *strB* et *dfrA16* dans la souche 16-B3PA-0006 et les gènes *bla*_{CARB-26}, *floR*, *tetA*, *tet(59)*, *sul2*, *strA* et *strB* dans la souche 13-B3PA-2931. De plus, nous avons identifié pour la première fois la présence du gène *bla*_{OXA-SHE} associé au gène *qnrA5* dans la souche de *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 et qui n'avait alors été détecté que dans des souches de *S. algae*. En utilisant la méthode de métagénomique fonctionnelle sur les mêmes souches de *Vibrio*, nous avons réussi à identifier les gènes *tetA*, *sul2* et *strA* mais également les gènes *tetR* et *merR* impliqués dans la régulation de la résistance aux tétracyclines et au mercure, respectivement. L'absence de détection des autres gènes de résistance aux antimicrobiens par métagénomique fonctionnelle pouvait être associée à la fragmentation de l'ADN qui a générée des fragments de trop petite taille et/ou à la transformation bactérienne des plasmides recombinants qui n'était pas optimale. Ces deux étapes critiques de la méthode devront être optimisées avant d'être appliquée à des échantillons complexes du milieu marin afin de caractériser leur résistome et leur mobilome, et de décrire de nouveaux gènes de résistance aux antimicrobiens qui pourraient constituer de potentiels gènes indicateurs pour l'environnement marin.

Concernant la mise en place de cette méthode de métagénomique fonctionnelle par criblage haut-débit, il faut dans un premier temps finaliser l'optimisation de la méthode sur les souches de *V. parahaemolyticus*. Nous avons mis au point un premier protocole qui nous a permis d'identifier une partie des gènes de résistance aux antimicrobiens préalablement identifiés dans ces souches par un séquençage complet du génome. Cependant, il est nécessaire de continuer cette mise au point de la méthode notamment sur l'étape de fragmentation de l'ADN comme nous avons pu le voir afin d'identifier un maximum de gènes de résistance. Une fois le protocole bien défini et validé, il serait appliqué à un panel d'échantillons complexes prélevés dans le milieu marin afin d'identifier le résistome lié à un antibiotique précis et également d'identifier des nouveaux gènes de résistance qui n'auraient jamais été décrits auparavant. Parmi ces nouveaux gènes découverts, certains pourraient

constituer de potentiels gènes indicateurs de contamination de l'environnement marin par la résistance aux antimicrobiens. Cette méthode de métagénomique fonctionnelle a par exemple été utilisée sur des échantillons d'eau de mer par Hatosy *et al.* (2015) qui ont identifié des gènes de résistance à la tétracycline, à l'ampicilline, à la nitrofurantoïne et à la sulfadiméthoxine non caractérisés jusqu'ici. Le choix des antibiotiques sur lesquels cribler les bibliothèques métagénomiques pourrait être fait en prenant en compte la liste de l'OMS sur les antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine pour déterminer dans quelle mesure leur utilisation impacte la contamination de l'environnement marin par les gènes de résistance qui leur sont associés. La métagénomique fonctionnelle pourrait à terme être appliquée à grande échelle sur des extraits d'ADN d'échantillons marins provenant de mers et d'océans à travers le monde afin de caractériser leur résistome et d'établir une cartographie mondiale de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement marin. Similairement, Zhang *et al.* (2022) ont réalisé une carte du risque lié aux gènes de résistance aux antimicrobiens dans les habitats marins en utilisant des résultats provenant de 712 échantillons de différents milieux marins.

Toutes ces perspectives permettraient à long terme de surveiller la contamination environnementale antimicrobienne du milieu marin en suivant des gènes indicateurs validés. La continuité liée à la surveillance de ces indicateurs de contamination serait d'évaluer les risques pour la santé du consommateur des produits de la pêche. L'évaluation du risque serait basée sur quatre indicateurs, à savoir l'accessibilité humaine, la mobilité, la pathogénicité humaine et la disponibilité clinique qui permettent de calculer un indice de risque comme expliqué dans la publication de Zhang *et al.* (2022).

Valorisation des travaux de thèse

Article scientifique publié dans un journal international

BOURDONNAIS, E., COLCANAP, D., LE BRIS, C., BRAUGE, T. & MIDELET, G. 2022. Occurrence of indicator genes of antimicrobial resistance contamination in the English Channel and North Sea sectors and interactions with environmental variables. *Frontiers in Microbiology*, 13.10.3389/fmicb.2022.883081.

BOURDONNAIS, E., BRAUGE, T., LE BRIS, C., DEBUICHE, S. & MIDELET, G. 2022. Evaluation of bacterial DNA extraction methods on marine samples integrating a process control. *Molecular Biology: Open Access*, 10.37421/2168-9547.2022.11.346

Article scientifique en cours de rédaction pour une soumission dans un journal international

BOURDONNAIS, E., BRAUGE, T., LE BRIS, C. & MIDELET, G. *En cours de rédaction.* Assessment of the contamination of benthic food webs by antimicrobial resistance genes and mobile genetic elements in the English Channel and the North Sea. *Science of The Total Environment*.

Communications orales

BOURDONNAIS, E., COLCANAP, D., LE BRIS, C., BRAUGE, T. & MIDELET, G. (03/2022). Distribution géographique et abondance de quatre indicateurs de contamination de l'environnement par la résistance aux antibiotiques en Manche et Mer du Nord. *8^e rencontres de l'ichtyologie en France (Paris, France)*.

BOURDONNAIS, E., COLCANAP, D., LE BRIS, C., BRAUGE, T. & MIDELET, G. (04/2022). Occurrence of indicator genes of antimicrobial resistance contamination in the North Sea and English Channel seawaters. *One Health European Joint Programme (Orvieto, Italie)*.

BOURDONNAIS, E., COLCANAP, D., LE BRIS, C., BRAUGE, T. & MIDELET, G. (06/2022). Occurrence of indicator genes of antimicrobial resistance contamination in the North Sea and English Channel seawaters. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Conference on Microbiology (Belgrade, Serbie)*.

Communications affichées

BOURDONNAIS, E., BRAUGE, T., LE BRIS, C., DEBUICHE, S. & MIDELET, G. (06/2021). Comparative study of bacterial DNA extraction methods for marine samples. *One Health European Joint Programme, en ligne (Copenhague, Danemark)*.

BOURDONNAIS, E., BRAUGE, T., LE BRIS, C., DEBUICHE, S. & MIDELET, G. (09/2021). Comparative study of bacterial DNA extraction methods for marine samples. *Journées scientifiques et doctorales de l'ANSES, en ligne (Maisons-Alfort, France)*.

BOURDONNAIS, E., BRAUGE, T., LE BRIS, C., DEBUICHE, S. & MIDELET, G. (09/2021). Étude comparative de méthodes d'extraction d'ADN bactérien à partir d'échantillons du milieu marin. *16^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM) (Nantes, France)*.

BOURDONNAIS, E., BRAUGE, T., LE BRIS, C., DEBUICHE, S. & MIDELET, G. (04/2022). Evaluation of bacterial DNA extraction methods by integrating a process control in complex marine samples. *One Health European Joint Programme (Orvieto, Italie)*.

BOURDONNAIS, E., COLCANAP, D., LE BRIS, C., BRAUGE, T. & MIDELET, G. (10/2022). Occurrence of indicator genes of antimicrobial resistance contamination in the North Sea and English Channel seawaters. *17e Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM) (Montpellier, France)*.

Étude comparative de méthodes d'extraction d'ADN bactérien à partir d'échantillons du milieu marin

Bourdonnais Erwan^{1,2}, Brauge Thomas¹, Le Bris Cédric², Debuiche Sabine¹, Midelet Graziella¹

1 : ANSES-Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulogne-sur-Mer, France
 2 : Université du Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, USC ANSES, INRAE, Boulogne-sur-Mer, France



Introduction

L'extraction d'ADN de haute qualité est une étape critique pour une analyse moléculaire réussie, comme la PCR quantitative (qPCR) ou une approche de métagénomique. Néanmoins, l'extraction d'ADN bactérien à partir d'échantillons complexes issus de l'environnement marin peut être un défi en raison de la présence d'inhibiteurs et de contaminants, principale cause d'échecs des réactions de PCR. L'objectif de cette étude était de comparer 7 méthodes d'extraction d'ADN à partir d'échantillons marins (phytoplancton, zooplancton, mollusques bivalves et poissons plats) afin d'obtenir de l'ADN bactérien de bonne qualité et en quantité suffisante pour être amplifié par qPCR.

Matériel et méthodes

Echantillons prélevés en Manche Campagne CGFS 2019 – Ifremer

- Phyto- / Zooplancton
- Mollusques bivalves (chair)
- Plies (peau, branchies, viscères)

→ n = 3

+ contrôle interne d'extraction : *Listeria monocytogenes* (10⁸ UFC/mL)

Extraction d'ADN total (7 méthodes)

- BT : kit Blood and Tissue (Qiagen)
- PB : kit PowerBiofilm (Qiagen)
- PS : kit PowerSoil (Qiagen)
- PM : kit PureLink Microbiome (Invitrogen)
- WG : kit Wizard Genomic (Promega)
- GS : kit GenElute Stool (Sigma)
- TS : lyse par choc thermique (10 min -80 °C/10 min 100 °C)

Estimation de la quantité et pureté (A260_{nm}/280_{nm}) de l'ADN par spectrophotométrie

Quantification de la flore bactérienne totale (gène *tuf*)
 Quantification du contrôle interne (gène *hlyA*) par qPCR

Résultats

Concentrations d'ADN (ng/μL)

	Phytoplancton	Zooplancton	Chair de bivalves	Peau de plie	Branchies de plie	Viscères de plie
BT	2,07	0,91	2,69	5,04	8,08	8,82
PB	5,18	4,36	3,61	10,74	79,33	5,84
PS	3,81	2,45	1,11	7,83	64,88	5,19
PM	3,34	3,02	4,14	10,69	32,99	3,87
WG	9,03	0,78	88,37	5,48	264,74	65,59
GS	4,18	4,71	13,62	12,88	54,67	25,43
TS	17,20	22,07	446,22	8,79	110,39	244,13

Méthodes PB, WG, GS, et TS

Concentrations en ADN élevées pour la majorité des échantillons et de pureté satisfaisante selon le rapport d'absorbance A260nm/280nm (données non montrées)

Valeurs de Cq (qPCR gène *tuf*)

	Phytoplancton	Zooplancton	Chair de bivalves	Peau de plie	Branchies de plie	Viscères de plie
BT	25,36	28,45	31,50	30,96	30,43	33,33
PB	24,47	30,63	27,12	29,98	29,74	31,36
PS	26,47	29,23	28,67	33,60	32,50	34,47
PM	25,15	28,78	27,55	32,08	31,71	33,89
WG	26,17	31,04	27,94	32,42	30,07	34,00
GS	27,88	28,36	28,22	31,76	31,95	34,59
TS	27,49	31,28	33,95	35,00	35,00	34,05

Méthodes BT, PB et PM

Meilleures efficacités d'amplification de l'ADN bactérien (valeurs de Cq basses)

Valeurs de Cq (qPCR gène *hlyA*)

	Phytoplancton	Zooplancton	Chair de bivalves	Peau de plie	Branchies de plie	Viscères de plie
BT	19,50	17,89	20,81	20,04	20,68	30,85
PB	16,35	16,44	17,62	16,65	18,54	16,70
PS	21,07	21,04	21,98	21,33	21,99	21,89
PM	16,39	15,90	16,52	17,15	17,30	17,55
WG	22,65	24,21	24,14	24,75	22,52	22,17
GS	21,41	22,17	23,99	21,65	24,20	23,52
TS	23,51	23,12	29,36	26,51	31,65	27,24

Méthodes PB et PM

Meilleures efficacités d'amplification de l'ADN du contrôle (valeurs de Cq basses)
 Gamme étalon : taux de récupération des bactéries = 90% (10⁷ UFC/mL)

Conclusion



Concentration d'ADN élevée ≠ bonne amplification de l'ADN. Exemple : la lyse par choc thermique a permis d'extraire beaucoup d'ADN mais l'ADN bactérien n'a pu être amplifié par qPCR.



Le kit PowerBiofilm (Qiagen) = bonnes quantité et qualité d'ADN. De plus, l'intégrité de l'ADN bactérien extrait a été préservé, permettant son amplification par qPCR.



Le kit PowerBiofilm est adapté à l'analyse de nos échantillons marins, afin d'étudier les différents niveaux d'un réseau trophique marin avec des approches de biologie moléculaire ou de métagénomique.



Distribution géographique et abondance de quatre indicateurs de contamination de l'environnement par la résistance aux antibiotiques en Manche et Mer du Nord

Bourdonnais E.^{1,2}, Colcanap D.¹, Brauge T.¹, Le Bris C.², Midelet G.¹

¹ : ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments, Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulogne-sur-Mer, France

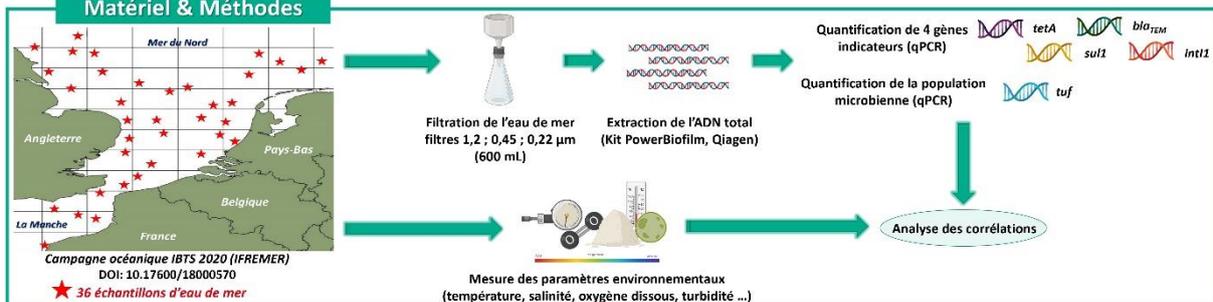
² : Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, USC Anses, INRAe, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. Picardie Jules Verne, Univ. Liège, Junia, Boulogne-sur-Mer, France



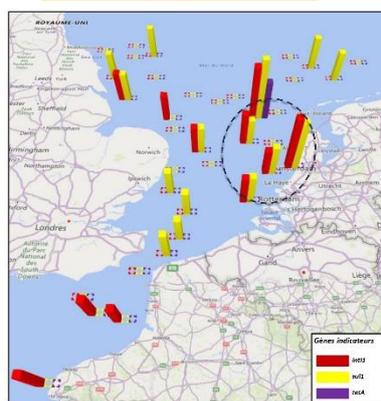
Introduction

L'environnement marin est un réservoir naturel de **gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs)**, sujet à de nombreux rejets d'origine anthropique (rivières contaminées par les eaux usées, activités maritimes, ...). Les gènes *bla_{TEM}* (résistance aux β-lactamines), *sul1* (résistance aux sulfonamides) et *int11* (impliqué dans la dissémination des ARGs) ont été proposés comme **indicateurs de contamination** pour évaluer le statut de résistance aux antibiotiques dans l'environnement (ANSES, 2020). L'objectif de cette étude était de caractériser l'abondance et la distribution géographique de ces trois gènes ainsi que du gène *tetA* (résistance aux tétracyclines), et du gène *tuf* (indicateur de la population microbienne) dans la Manche et la Mer du Nord, en relation avec les paramètres environnementaux et les différents apports anthropiques.

Matériel & Méthodes



Résultats



Abondance des gènes indicateurs de l'antibiorésistance
(log copies du gène.mL⁻¹)

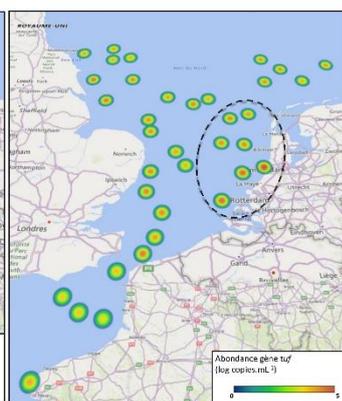
bla_{TEM} : aucune quantification

tetA : 2,8% d'échantillons (2,24 log)

sul1 : 41,7% d'échantillons (1,5 – 3,5 log)

int11 : 30,6% d'échantillons (1,5 – 3,3 log)

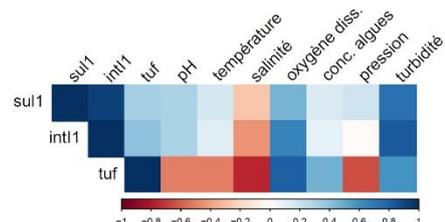
Co-occurrence *sul1* + *int11* : 36,84 % des échantillons



Abondance population bactérienne
(log copies du gène tuf.mL⁻¹)

tuf : population bactérienne comprise entre 3,4 et 5 log copies gène.mL⁻¹

Zone à l'Ouest des Pays-Bas
Abondance plus élevée de tous les gènes



Matrice de corrélation entre l'abondance des gènes et les paramètres environnementaux

L'abondance des gènes *sul1* et *int11* était corrélée :

- ❖ Entre elles
- ❖ Avec l'oxygène dissous, la turbidité, le pH et l'abondance du gène *tuf*
- ❖ Avec la salinité

L'abondance de la population bactérienne était corrélée :

- ❖ Avec l'oxygène dissous, la turbidité et la concentration en algues
- ❖ Avec le pH, la température, la salinité et la pression

Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la **contamination** des eaux de la Manche et de la Mer du Nord par les **gènes indicateurs *sul1* et *int11***, impliqués dans la **résistance** aux antibiotiques et leur **dissémination**. L'occurrence de ces gènes près des côtes mais aussi en pleine mer peut être expliquée par les nombreuses **sources** potentielles de contamination telles que les différents effluents, le trafic maritime intense et les structures offshore. Certains **paramètres environnementaux** pourraient également favoriser le maintien de ces résistances comme la turbidité et l'oxygène dissous. Peu d'études ont été menées sur l'environnement marin, alors que la consommation de produits de la pêche contaminés par des bactéries porteuses de ces résistances constitue un **risque en santé humaine**.

Remerciements :

Ce travail a été soutenu par une bourse de doctorat de la Région Hauts-de-France et du Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale, et a été rendu possible grâce à l'IFREMER par la participation à la campagne océanographique IBTS 2020.

Référence : ANSES (2020). Antibiorésistance et environnement : état et causes possibles de la contamination des milieux en France. Rapport d'expertise collective.

Contact : erwan.bourdonnais@anses.fr

Article soumis dans *Frontiers in Microbiology*
"Occurrence of indicator genes of antimicrobial resistance contamination in the English Channel and North Sea sectors and interactions with environmental variables"
Erwan Bourdonnais, Dorian Colcanap, Céline Le Bris, Thomas Brauge, Grazia Midelet



Références bibliographiques

- ABE, K., NOMURA, N. & SUZUKI, S. 2020. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol Ecol*, 96.
- AKINBOWALE, O. L., PENG, H. & BARTON, M. D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol*, 100, 1103-13.
- ALEKSHUN, M. N. & LEVY, S. B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128, 1037-50.
- ALVES, M. S., PEREIRA, A., ARAÚJO, S. M., CASTRO, B. B., CORREIA, A. C. M. & HENRIQUES, I. 2014. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- AMARA, R. 2010. Impact de l'anthropisation sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes marins. Exemple de la Manche-mer du nord. *VertigO*, 8.
- ANSES 2016. Actualisation des repères du PNNS: Étude des relations entre consommation de groupes d'aliments et risque de maladies chroniques non transmissibles.
- ANSES 2020a. Antibiorésistance et environnement : état et causes possibles de la contamination des milieux en France. Rapport d'expertise collective
- ANSES 2020b. Résapath - Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2019, Lyon et Ploufragan-Plouzané-Niort, France, novembre 2020, rapport, 155 pp.
- AYAT, M., EL-MELLAH, M. & MISHRICKY, A. G. 1989. The clam bivalve, *Mytilus* sp., as an indicator of coliform pollution in some western beaches of Algeria. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 5, 383-385.
- BABAKHANI, S. & OLOOMI, M. 2018. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58, 905-917.
- BÁEZ, J., HERNÁNDEZ-GARCÍA, M., GUAMPARITO, C., DÍAZ, S., OLAVE, A., GUERRERO, K., CANTÓN, R., BAQUERO, F., GAHONA, J., VALENZUELA, N., DEL CAMPO, R. & SILVA, J. 2015. Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* colonizing the migratory Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. *Microb Drug Resist*, 21, 111-6.
- BAILEY, J. K., PINYON, J. L., ANANTHAM, S. & HALL, R. M. 2011. Distribution of the *bla*TEM gene and *bla*TEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 745-751.
- BANERJEE, S. K. & FARBER, J. M. 2018. Trend and pattern of antimicrobial resistance in molluscan *Vibrio* species sourced to canadian estuaries. *Antimicrob Agents Chemother*, 62.
- BARBU, I., CHIFIRIUC, M. & POPA, L. 2018. Mobile genetic elements involved in the horizontal transfer of antibiotic resistance genes. *Roumanian archives of microbiology and immunology*, 263-276.
- BARRAUD, O., BACLET, M. C., DENIS, F. & PLOY, M. C. 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother*, 65, 1642-5.
- BERENDONK, T. U., MANAIA, C. M., MERLIN, C., FATTA-KASSINOS, D., CYTRYN, E., WALSH, F., BÜRGMANN, H., SØRUM, H., NORSTRÖM, M., PONS, M.-N., KREUZINGER, N., HUOVINEN, P., STEFANI, S., SCHWARTZ, T., KISAND, V., BAQUERO, F. & MARTINEZ, J. L. 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 310-317.
- BIBBAL, D., DUPOUY, V., FERRÉ, J. P., TOUTAIN, P. L., FAYET, O., PRÈRE, M. F. & BOUSQUET-MÉLOU, A. 2007. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in *Enterobacteriaceae* and excretion of *bla*TEM genes in swine feces. *Appl Environ Microbiol*, 73, 4785-90.
- BIELAK, E., BERGENHOLTZ, R. D., JØRGENSEN, M. S., SØRENSEN, S. J., HANSEN, L. H. & HASMAN, H. 2011. Investigation of diversity of plasmids carrying the *bla*TEM-52 gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 2465-2474.

- BLANCO-PICAZO, P., ROSCALES, G., TORIBIO-AVEDILLO, D., GÓMEZ-GÓMEZ, C., AVILA, C., BALLESTÉ, E., MUNIESA, M. & RODRÍGUEZ-RUBIO, L. 2020. Antibiotic resistance genes in phage particles from Antarctic and Mediterranean seawater ecosystems. *Microorganisms*, 8, 1293.
- BLOOMFIELD, S. F., STEWART, G. S. A. B., DODD, C. E. R., BOOTH, I. R. & POWER, E. G. M. 1998. The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology*, 144, 1-3.
- BOOLCHANDANI, M., PATEL, S. & DANTAS, G. 2017. Functional metagenomics to study antibiotic resistance. *Methods Mol Biol*, 1520, 307-329.
- BÖRNER, T., ALEYNIKOVA, A. Y., ZUBO, Y. O. & KUSNETSOV, V. V. 2015. Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847, 761-769.
- BOTELHO, J., ROBERTS, A. P., LEÓN-SAMPEDRO, R., GROSSO, F. & PEIXE, L. 2018. Carbapenemases on the move: it's good to be on ICEs. *Mobile DNA*, 9, 37.
- BOURDONNAIS, E., COLCANAP, D., LE BRIS, C., BRAUGE, T. & MIDELET, G. 2022. Occurrence of indicator genes of antimicrobial resistance contamination in the English Channel and North Sea sectors and interactions with environmental variables. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- BOWLER, P., MURPHY, C. & WOLCOTT, R. 2020. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9, 162.
- BRAHMI, S., TOUATI, A., DUNYACH-REMY, C., SOTTO, A., PANTEL, A. & LAVIGNE, J. P. 2018. High prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in wild fish from the Mediterranean Sea in Algeria. *Microb Drug Resist*, 24, 290-298.
- BRANDT, P., GERDTS, G., BOERSMA, M., WILTSHIRE, K. H. & WICHELS, A. 2010. Comparison of different DNA-extraction techniques to investigate the bacterial community of marine copepods. *Helgoland marine research*, 64, 331-342.
- BRIET, A. 2018. *Étude de la flore bactérienne et de sa résistance aux antibiotiques des produits de la pêche et de l'aquaculture*. Université du Littoral Côte d'Opale.
- BRIET, A., HELSENS, N., DELANNOY, S., DEBUICHE, S., BRISABOIS, A., MIDELET, G. & GRANIER, S. A. 2018. NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, 2578-2579.
- BRINKMEYER, R. 2016. Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing. *Marine Pollution Bulletin*, 107.
- BROWN, N. L., STOYANOV, J. V., KIDD, S. P. & HOBMAN, J. L. 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 145-163.
- BUELOW, E., RICO, A., GASCHET, M., LOURENCO, J., KENNEDY, S., WIEST, L., PLOY, M.-C. & DAGOT, C. 2019. *Classification of hospital and urban wastewater resistome and microbiota over time and their relationship to the eco-exposome*.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W. & SHIPLEY, G. L. 2009a. MIQE--Media & Press Review... Updated! *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITTEWER, C. T. 2009b. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- CACACE, D., FATTA-KASSINOS, D., MANAIA, C. M., CYTRYN, E., KREUZINGER, N., RIZZO, L., KARAOLIA, P., SCHWARTZ, T., ALEXANDER, J., MERLIN, C., GARELICK, H., SCHMITT, H., DE VRIES, D., SCHWERMER, C. U., MERIC, S., OZKAL, C. B., PONS, M.-N., KNEIS, D. & BERENDONK, T. U. 2019. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*, 162, 320-330.
- CALERO-CÁCERES, W., MÉNDEZ, J., MARTÍN-DÍAZ, J. & MUNIESA, M. 2017. The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384-394.

- CALERO-CÁCERES, W. & MUNIESA, M. 2016. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*, 95, 11-18.
- CHAIX, G., ROGER, F., BERTHE, T., LAMY, B., JUMAS-BILAK, E., LAFITE, R., FORGET-LERAY, J. & PETIT, F. 2017. Distinct *Aeromonas* populations in water column and associated with copepods from estuarine environment (Seine, France). *Front Microbiol*, 8, 1259.
- CHATURVEDI, P., SINGH, A., CHOWDHARY, P., PANDEY, A. & GUPTA, P. 2021. Occurrence of emerging sulfonamide resistance (*sul1* and *sul2*) associated with mobile integrons-integrase (*intI1* and *intI2*) in riverine systems. *Science of The Total Environment*, 751, 142217.
- CHEN, Y.-R., GUO, X.-P., NIU, Z.-S., LU, D.-P., SUN, X.-L., ZHAO, S., HOU, L.-J., LIU, M. & YANG, Y. 2020. Antibiotic resistance genes (ARGs) and their associated environmental factors in the Yangtze Estuary, China: From inlet to outlet. *Marine Pollution Bulletin*, 158, 111360.
- CHENG, X., LU, Y., SONG, Y., ZHANG, R., SHANGGUAN, X., XU, H., LIU, C. & LIU, H. 2021. Analysis of antibiotic resistance genes, environmental factors, and microbial community from aquaculture farms in five provinces, China. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- CHIOU, J., LI, R. & CHEN, S. 2015. CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 3593-5.
- CIMMINO, T., OLAITAN, A. O. & ROLAIN, J. M. 2016. Whole genome sequence to decipher the resistome of *Shewanella algae*, a multidrug-resistant bacterium responsible for pneumonia, Marseille, France. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 14, 269-75.
- CLARK, S. E., JUDE, B. A., DANNER, G. R. & FEKETE, F. A. 2009. Identification of a multidrug efflux pump in *Flavobacterium johnsoniae*. *Vet Res*, 40, 55.
- COCCONCELLI, P. S., CATTIVELLI, D. & GAZZOLA, S. 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 315-323.
- COMITÉ NATIONAL DES PÊCHES 2019. Les chaluts. <https://www.comite-peches.fr/la-peche-francaise/techniques-de-peches/les-chaluts/>.
- COPPIN, F., GOASCOZ, N., LE ROY, D. & GIRALDO, C. 2019. Compte-rendu provisoire de la campagne CGFS 2019 sur le N/O Thalassa / CGFS 2019 - Survey Report.
- CORDERO, O. X., WILDSCHUTTE, H., KIRKUP, B., PROEHL, S., NGO, L., HUSSAIN, F., ROUX, F. L., MINCER, T. & POLZ, M. F. 2012. Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science*, 337, 1228-1231.
- DA COSTA, W. F., GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. & LAPORT, M. S. 2020. *Shewanella* harboring antimicrobial and copper resistance genes in sea urchins (*Paracentrotus lividus*) from the Crozon peninsula (Brittany, France). *Infect Genet Evol*, 85, 104437.
- DALSGAARD, A., FORSLUND, A., SANDVANG, D., ARNTZEN, L. & KEDDY, K. 2001. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene located on class 1 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 827-838.
- DANG, H. & LOVELL, C. R. 2015. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80, 91-138.
- DARAMOLA, B. A., WILLIAMS, R. & DIXON, R. A. 2009. In vitro antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources in northern England. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 499-500.
- DAVISON, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42, 73-91.
- DELANNOY, S., HOFFER, C., YOUF, R., DAUVERGNE, E., WEBB, H. E., BRAUGE, T., TRAN, M.-L., MIDELET, G., GRANIER, S. A., HAENNI, M., FACH, P. & BRISABOIS, A. 2022. High throughput screening of antimicrobial resistance genes in Gram-negative seafood bacteria. *Microorganisms*, 10, 1225.
- DENG, Y., BAO, X., JI, L., CHEN, L., LIU, J., MIAO, J., CHEN, D., BIAN, H., LI, Y. & YU, G. 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 45-45.
- DENMAN, S. & MCSWEENEY, C. 2005. Quantitative (real-time) PCR.

- DI CESARE, A., ECKERT, E. M., D'URSO, S., BERTONI, R., GILLAN, D. C., WATTIEZ, R. & CORNO, G. 2016. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 94, 208-214.
- DI CESARE, A., PETRIN, S., FONTANETO, D., LOSASSO, C., ECKERT, E. M., TASSISTRO, G., BORELLO, A., RICCI, A., WILSON, W. H., PRUZZO, C. & VEZZULLI, L. 2018. ddPCR applied on archived Continuous Plankton Recorder samples reveals long-term occurrence of class 1 integrons and a sulphonamide resistance gene in marine plankton communities. *Environmental Microbiology Reports*, 10, 458-464.
- DJURHUUS, A., PORT, J., CLOSEK, C. J., YAMAHARA, K. M., ROMERO-MARACCINI, O., WALZ, K. R., GOLDSMITH, D. B., MICHISAKI, R., BREITBART, M. & BOEHM, A. B. 2017. Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Frontiers in Marine Science*, 4, 314.
- DOS SANTOS, D. F. K., ISTVAN, P., QUIRINO, B. F. & KRUGER, R. H. 2017. Functional metagenomics as a tool for identification of new antibiotic resistance genes from natural environments. *Microbial Ecology*, 73, 479-491.
- DUDA, V. I., SUZINA, N. E., POLIVTSEVA, V. N. & BORONIN, A. M. 2012. Ultramicrobacteria: Formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology. *Microbiology*, 81, 379-390.
- DUMITRESCU, O., DAUWALDER, O., BOISSET, S., REVERDY, M.-É., TRISTAN, A. & VANDENESCH, F. 2010. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. *Med Sci (Paris)*, 26, 943-949.
- ECDC 2020. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—annual epidemiological report 2019. *ECDC, Stockholm*.
- EFSA 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19, e06971.
- EGERTON, S., CULLOTY, S., WHOOLEY, J., STANTON, C. & ROSS, R. P. 2018. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- EICHMILLER, J. J., MILLER, L. M. & SORENSEN, P. W. 2016. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Mol Ecol Resour*, 16, 56-68.
- ELLINGTON, M. J., KISTLER, J., LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 321-322.
- ENNE, V. I., DELSOL, A. A., ROE, J. M. & BENNETT, P. M. 2006. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3003-3010.
- EUMOFA 2018. European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products - Le marché européen du poisson, édition 2018.
- EUMOFA 2021. European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products - Le marché européen du poisson, édition 2021.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY 2022. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal*, 20, e07209.
- FAKANKUN, O. A., BABAYEMI, J. & AKOSILE, S. O. 2012. Evaluation of fish gills as potential target organ for accumulation of heavy metals. *Africa Journal of Animal and Biomedical Sciences*, 7, 15-18.
- FAO 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action*, FAO.
- FAZHAN, H., WAIHO, K. & SHAHREZA, M. S. 2016. A simple and efficient total genomic DNA extraction method for individual zooplankton. *SpringerPlus*, 5, 2049.
- FRAZAO, B. & D. SILVA, A. 2018. *Molecular tools for phytoplankton monitoring samples*.
- FU, S., YANG, Q., WANG, Q., PANG, B., LAN, R., WEI, D., QU, B. & LIU, Y. 2021. Continuous genomic surveillance monitored the *in vivo* evolutionary trajectories of *Vibrio parahaemolyticus* and identified a new virulent genotype. *mSystems*, 6.
- FUJII, T. 2015. Temporal variation in environmental conditions and the structure of fish assemblages around an offshore oil platform in the North Sea. *Marine Environmental Research*, 108, 69-82.
- GAO, H., ZHANG, L., LU, Z., HE, C., LI, Q. & NA, G. 2018. Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments. *Environmental Pollution*, 232, 1-9.

- GILLINGS, M., BOUCHER, Y., LABBATE, M., HOLMES, A., KRISHNAN, S., HOLLEY, M. & STOKES, H. W. 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190, 5095-5100.
- GILLINGS, M. R. & STOKES, H. W. 2012. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 346-352.
- GIRALDO, C., ERNANDE, B., CRESSON, P., KOPP, D., CACHERA, M., TRAVERS-TROLET, M. & LEFEBVRE, S. 2017. Depth gradient in the resource use of a fish community from a semi-enclosed sea. *Limnology and Oceanography*, 62, 2213-2226.
- GONZÁLEZ-PLAZA, J. J., BLAU, K., MILAKOVIĆ, M., JURINA, T., SMALLA, K. & UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. 2019. Antibiotic-manufacturing sites are hot-spots for the release and spread of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in receiving aquatic environments. *Environment International*, 130, 104735.
- GONZÁLEZ-PLAZA, J. J., ŠIMATOVIĆ, A., MILAKOVIĆ, M., BIELEN, A., WICHMANN, F. & UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. 2018. Functional repertoire of antibiotic resistance genes in antibiotic manufacturing effluents and receiving freshwater sediments. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. 2018. Optimizing primer and probe concentrations for use in real-time polymerase chain reaction (PCR) assays. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, pdb. prot095018.
- GREVSKOTT, D. H., SVANEVIK, C. S., SUNDE, M., WESTER, A. L. & LUNESTAD, B. T. 2017. Marine bivalve mollusks as possible indicators of multidrug-resistant *Escherichia coli* and other species of the *Enterobacteriaceae* family. *Front Microbiol*, 8, 24.
- GROSSMAN, T. H. 2016. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 6, a025387-a025387.
- GUO, X.-P., YANG, Y., LU, D.-P., NIU, Z.-S., FENG, J.-N., CHEN, Y.-R., TOU, F.-Y., GARNER, E., XU, J., LIU, M. & HOCELLA, M. F. 2018. Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary. *Water Research*, 129, 277-286.
- GUPTA, S. K., PADMANABHAN, B. R., DIENE, S. M., LOPEZ-ROJAS, R., KEMPF, M., LANDRAUD, L. & ROLAIN, J. M. 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 212-20.
- HABIBI, N., UDDIN, S., LYONS, B., AL-SARAWI, H. A., BEHBEHANI, M., SHAJAN, A., RAZZACK, N. A., ZAKIR, F. & ALAM, F. 2022. Antibiotic resistance genes associated with marine surface sediments: A baseline from the shores of Kuwait. *Sustainability*, 14, 8029.
- HÅKONSHOLM, F., HETLAND, M. A. K., SVANEVIK, C. S., LUNESTAD, B. T., LÖHR, I. H. & MARATHE, N. P. 2022. Insights into the genetic diversity, antibiotic resistance and pathogenic potential of *Klebsiella pneumoniae* from the Norwegian marine environment using whole-genome analysis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 242, 113967.
- HÅKONSHOLM, F., LUNESTAD, B. T., AGUIRRE SÁNCHEZ, J. R., MARTINEZ-URTAZA, J., MARATHE, N. P. & SVANEVIK, C. S. 2020. Vibrios from the Norwegian marine environment: characterization of associated antibiotic resistance and virulence genes. *MicrobiologyOpen*, 9, e1093.
- HALL, R. M. & COLLIS, C. M. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15, 593-600.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 1999. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 95-98.
- HAMMERL, J. A., JÄCKEL, C., BORTOLAIA, V., SCHWARTZ, K., BIER, N., HENDRIKSEN, R. S., GUERRA, B. & STRAUCH, E. 2017. Carbapenemase VCC-1-producing *Vibrio cholerae* in coastal waters of Germany. *Emerg Infect Dis*. 23(10):1735-1737., 23.
- HATOSY, S. M., MARTINY, A. C. & NOJIRI, H. 2015. The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7593-7599.
- HELSENS, N., CALVEZ, S., PREVOST, H., BOUJU-ALBERT, A., MAILLET, A., ROSSERO, A., HURTAUD-PESSEL, D., ZAGOREC, M. & MAGRAS, C. 2020. Antibiotic resistance genes and bacterial communities of farmed rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*). *Front Microbiol*, 11, 590902.

- HEUER, H. & SMALLA, K. 2007. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, 9, 657-666.
- HOOPER, D. C. & JACOBY, G. A. 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 12-31.
- ICES 2012. Manual for the international bottom trawl surveys. *Series of ICES Survey Protocols. SISP 1-IBTS VIII*.
- JANG, J., KIM, M., BAEK, S., SHIN, J., SHIN, J., SHIN, S. G., KIM, Y. M. & CHO, K. H. 2021. Hydrometeorological influence on antibiotic-resistance genes (ARGs) and bacterial community at a recreational beach in Korea. *J Hazard Mater*, 403, 123599.
- JIA, L., LIU, H., ZHAO, N., DENG, Q., ZHU, C. & ZHANG, B. 2022. Distribution and transfer of antibiotic resistance genes in coastal aquatic ecosystems of Bohai Bay. *Water*, 14, 938.
- JOHNSON, C. M. & GROSSMAN, A. D. 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu Rev Genet*, 49, 577-601.
- KAPLAN, J. B., IZANO, E. A., GOPAL, P., KARWACKI, M. T., KIM, S., BOSE, J. L., BAYLES, K. W., HORSWILL, A. R., DUNMAN, P. & PIER, G. 2012. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 3, e00198-12.
- KARUNANATHIE, H., KEE, P. S., NG, S. F., KENNEDY, M. A. & CHUA, E. W. 2022. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*, 197, 130-143.
- KOCZURA, R., MOKRACKA, J., TARASZEWSKA, A. & ŁOPACINSKA, N. 2016. Abundance of class 1 integron-integrase and sulfonamide resistance genes in river water and sediment is affected by anthropogenic pressure and environmental factors. *Microbial ecology*, 72, 909-916.
- KUNHIKANNAN, S., THOMAS, C. J., FRANKS, A. E., MAHADEVAIAH, S., KUMAR, S. & PETROVSKI, S. 2021. Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *Microbiologyopen*, 10, e1197.
- LAL GUPTA, C., KUMAR TIWARI, R. & CYTRYN, E. 2020. Platforms for elucidating antibiotic resistance in single genomes and complex metagenomes. *Environment International*, 138, 105667.
- LAROCHE, E., PAWLAK, B., BERTHE, T., SKURNIK, D. & PETIT, F. 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology*, 68, 118-130.
- LARSEN, A. M., MOHAMMED, H. H. & ARIAS, C. R. 2014. Comparison of DNA extraction protocols for the analysis of gut microbiota in fishes. *FEMS Microbiology Letters*, 362.
- LATHE, W. C. & BORK, P. 2001. Evolution of *tuf* genes: Ancient duplication, differential loss and gene conversion. *FEBS Letters*, 502, 113-116.
- LAVILLA LERMA, L., BENOMAR, N., KNAPP, C. W., CORREA GALEOTE, D., GÁLVEZ, A. & ABRIQUEL, H. 2014. Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PloS one*, 9, e114252-e114252.
- LAZARD, C., VERIN, Y. & AUBER, A. 2021. International Bottom Trawl Survey (IBTS2021-Q1)-French cruise report.
- LEE, J., BECK, K. & BÜRGMANN, H. 2022. Wastewater bypass is a major temporary point-source of antibiotic resistance genes and multi-resistance risk factors in a Swiss river. *Water Research*, 208, 117827.
- LEENHEER, J. A. & CROUÉ, J.-P. 2003. Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental science & technology*, 37, 18A-26A.
- LEFF, L. G., DANA, J., MCARTHUR, J. V. & SHIMKETS, L. 1993. Detection of Tn5-like sequences in kanamycin-resistant stream bacteria and environmental DNA. *Applied and environmental microbiology*, 59, 417-21.
- LEONARD, A. F. C., ZHANG, L., BALFOUR, A. J., GARSIDE, R., HAWKEY, P. M., MURRAY, A. K., UKOUMUNNE, O. C. & GAZE, W. H. 2018. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environment International*, 114, 326-333.
- LI, W., SU, H., CAO, Y., WANG, L., HU, X., XU, W., XU, Y., LI, Z. & WEN, G. 2020. Antibiotic resistance genes and bacterial community dynamics in the seawater environment of Dapeng Cove, South China. *Science of The Total Environment*, 723, 138027.

- LI, W. & WANG, A. 2021. Genomic islands mediate environmental adaptation and the spread of antibiotic resistance in multiresistant Enterococci - evidence from genomic sequences. *BMC Microbiology*, 21, 55.
- LI, X., XING, J., LI, B., WANG, P. & LIU, J. 2012. Use of *tuf* as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11, 31.
- LIU, S., ZHAO, H., LEHMLER, H.-J., CAI, X. & CHEN, J. 2017. Antibiotic pollution in marine food webs in Laizhou Bay, North China: Trophodynamics and human exposure implication. *Environmental science & technology*, 51, 2392-2400.
- LIU, Y., LIU, W., YANG, X., WANG, J., LIN, H. & YANG, Y. 2021. Microplastics are a hotspot for antibiotic resistance genes: Progress and perspective. *Science of The Total Environment*, 773, 145643.
- LÓPEZ CABO, M., L ROMALDE, J., SIMAL-GANDARA, J., GAGO MARTÍNEZ, A., GIRÁLDEZ FERNÁNDEZ, J., BERNÁRDEZ COSTAS, M., PASCUAL DEL HIERRO, S., POUSA ORTEGA, Á., MANAIA, C. M., ABREU SILVA, J. & RODRÍGUEZ HERRERA, J. 2020. Identification of emerging hazards in mussels by the Galician Emerging Food Safety Risks Network (RISEGAL). A first approach. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9, 1641.
- LU, J., ZHANG, Y., WU, J., WANG, J., ZHANG, C. & LIN, Y. 2019. Occurrence and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the Bohai Sea and Yellow Sea areas, China. *Environmental Pollution*, 252, 450-460.
- LU, L., LIU, J., LI, Z., LIU, Z., GUO, J., XIAO, Y. & YANG, J. 2018. Occurrence and distribution of tetracycline antibiotics and resistance genes in longshore sediments of the three gorges reservoir, China. *Front Microbiol*, 9, 1911.
- LUO, Y., MAO, D., RYSZ, M., ZHANG, H., XU, L. & J. J. ALVAREZ, P. 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science & Technology*, 44, 7220-7225.
- LUTZ, R. & BUJARD, H. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 25, 1203-1210.
- LV, B., CUI, Y., TIAN, W., WEI, H., CHEN, Q., LIU, B., ZHANG, D. & XIE, B. 2020. Vessel transport of antibiotic resistance genes across oceans and its implications for ballast water management. *Chemosphere*, 253, 126697.
- MAHON, B. M., BREHONY, C., CAHILL, N., MCGRATH, E., O'CONNOR, L., VARLEY, A., CORMICAN, M., RYAN, S., HICKEY, P., KEANE, S., MULLIGAN, M., RUANE, B., JOLLEY, K. A., MAIDEN, M. C., BRISSE, S. & MORRIS, D. 2019. Detection of OXA-48-like-producing Enterobacterales in Irish recreational water. *Science of The Total Environment*, 690, 1-6.
- MAK, S., XU, Y. & NODWELL, J. R. 2014. The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Molecular Microbiology*, 93, 391-402.
- MARATHE, N. P., JANZON, A., KOTSAKIS, S. D., FLACH, C. F., RAZAVI, M., BERGLUND, F., KRISTIANSSON, E. & LARSSON, D. G. J. 2018. Functional metagenomics reveals a novel carbapenem-hydrolyzing mobile beta-lactamase from Indian river sediments contaminated with antibiotic production waste. *Environ Int*, 112, 279-286.
- MARTI, E., HUERTA, B., RODRÍGUEZ-MOZAZ, S., BARCELÓ, D., MARCÉ, R. & BALCÁZAR, J. L. 2018. Abundance of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wild freshwater fish species. *Chemosphere*, 196, 115-119.
- MARTINY, A., MARTINY, J., WEIHE, C., FIELD, A. & ELLIS, J. 2011. Functional metagenomics reveals previously unrecognized diversity of antibiotic resistance genes in gulls. *Frontiers in Microbiology*, 2.
- MASSON, D., COURTOIS, O., MASSON, N., GUESDON, S. & ROCHER, G. 2000. Ballast water research in France: Current status.
- MAUGERI, T. L., CARBONE, M., FERA, M. T., IRRERA, G. P. & GUGLIANDOLO, C. 2004. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *J Appl Microbiol*, 97, 354-61.

- MAYER, G. & CAMBERLEIN, E. 2013. Bactériologie - Chapitre 8 : Echange d'information génétique. <https://www.microbiologybook.org/>.
- MINICH, J., PETRUS, S., MICHAEL, J., MICHAEL, T., KNIGHT, R. & ALLEN, E. 2020. Temporal, environmental, and biological drivers of the mucosal microbiome in a wild marine fish, *Scomber japonicus*. *mSphere*, 5.
- MINNITI, G., HAGEN, L. H., PORCELLATO, D., JØRGENSEN, S. M., POPE, P. B. & VAAJE-KOLSTAD, G. 2017. The skin-mucus microbial community of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Front Microbiol*, 8, 2043.
- MORRISSEY, K. L., IVEŠA, L., DELVA, S., D'HONDT, S., WILLEMS, A. & DE CLERCK, O. 2021. Impacts of environmental stress on resistance and resilience of algal-associated bacterial communities. *Ecology and Evolution*, 11, 15004-15019.
- MOULIN, G., CHEVANCE, A., MÉHEUST, D., JOUY, E., JARRIGE, N., LUPO, A., HAENNI, M., GAY, E. & MADEC, J.-Y. 2017. Ecoantibio 2017 : bilan, évolution des consommations et des résistances, pourquoi un Ecoantibio 2? *Bulletin des GTV*, 15-25.
- MURRAY, C. J. L., IKUTA, K. S., SHARARA, F., SWETSCHINSKI, L., ROBLES AGUILAR, G., GRAY, A., HAN, C., BISIGNANO, C., RAO, P., WOOL, E., JOHNSON, S. C., BROWNE, A. J., CHIPETA, M. G., FELL, F., HACKETT, S., HAINES-WOODHOUSE, G., KASHEF HAMADANI, B. H., KUMARAN, E. A. P., MCMANIGAL, B., AGARWAL, R., AKECH, S., ALBERTSON, S., AMUASI, J., ANDREWS, J., ARAVKIN, A., ASHLEY, E., BAILEY, F., BAKER, S., BASNYAT, B., BEKKER, A., BENDER, R., BETHOU, A., BIELICKI, J., BOONKASIDECHA, S., BUKOSIA, J., CARVALHEIRO, C., CASTAÑEDA-ORJUELA, C., CHANSAMOUTH, V., CHAURASIA, S., CHIURCHIÙ, S., CHOWDHURY, F., COOK, A. J., COOPER, B., CRESSEY, T. R., CRIOLLO-MORA, E., CUNNINGHAM, M., DARBOE, S., DAY, N. P. J., DE LUCA, M., DOKOVA, K., DRAMOWSKI, A., DUNACHIE, S. J., ECKMANN, T., EIBACH, D., EMAMI, A., FEASEY, N., FISHER-PEARSON, N., FORREST, K., GARRETT, D., GASTMEIER, P., GIREF, A. Z., GREER, R. C., GUPTA, V., HALLER, S., HASELBECK, A., HAY, S. I., HOLM, M., HOPKINS, S., IREGBU, K. C., JACOBS, J., JAROVSKY, D., JAVANMARDI, F., KHORANA, M., KISSOON, N., KOBEISSI, E., KOSTYANEV, T., KRAPP, F., KRUMKAMP, R., KUMAR, A., KYU, H. H., LIM, C., LIMMATHUROTSAKUL, D., LOFTUS, M. J., LUNN, M., MA, J., MTURI, N., MUNERA-HUERTAS, T., MUSICHA, P., MUSSI-PINHATA, M. M., NAKAMURA, T., NANAVATI, R., NANGIA, S., NEWTON, P., NGOUN, C., NOVOTNEY, A., NWAKANMA, D., OBIERO, C. W., OLIVAS-MARTINEZ, A., OLLIARO, P., OOKO, E., et al. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399, 629-655.
- MUZIASARI, W. I., PITKÄNEN, L. K., SØRUM, H., STEDTFELD, R. D., TIEDJE, J. M. & VIRTA, M. 2017. The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below Baltic Sea fish farms. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- NA, G., ZHANG, W., ZHOU, S., GAO, H., LU, Z., WU, X., LI, R., QIU, L., CAI, Y. & YAO, Z. 2014. Sulfonamide antibiotics in the Northern Yellow Sea are related to resistant bacteria: implications for antibiotic resistance genes. *Mar Pollut Bull*, 84, 70-5.
- NACHTIGALL, J., SCHNEIDER, K., BRUNTNER, C., BULL, A. T., GOODFELLOW, M., ZINECKER, H., IMHOFF, J. F., NICHOLSON, G., IRRAN, E., SÜSSMUTH, R. D. & FIEDLER, H.-P. 2011. Benzoxacystol, a benzoxazine-type enzyme inhibitor from the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 935. *The Journal of Antibiotics*, 64, 453-457.
- NAKANO, M. 2018. 16S rRNA gene primer validation for bacterial diversity analysis of vegetable products. *Journal of food protection*, 81, 848-859.
- NG, L. K., MARTIN, I., ALFA, M. & MULVEY, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes*, 15, 209-15.
- NIELSEN, K. M., JOHNSEN, P. J., BENSASSON, D. & DAFFONCHIO, D. 2007. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res*, 6, 37-53.
- NOGVA, H. K., RUDI, K., NATERSTAD, K., HOLCK, A. & LILLEHAUG, D. 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4266-4271.
- OFIMER 2006. Guide pratique de l'hygiène à bord des navires de pêche.

- OHAMA, Y., AOKI, K., HARADA, S., NAGASAWA, T., SAWABE, T., NONAKA, L., MORIYA, K., ISHII, Y. & TATEDA, K. 2021. Genetic environment surrounding *bla*(OXA-55-like) in clinical isolates of *Shewanella algae* clade and enhanced expression of *bla*(OXA-55-like) in a carbapenem-resistant isolate. *mSphere*, 6, e0059321.
- OSIŃSKA, A., KORZENIEWSKA, E., HARNISZ, M., FELIS, E., BAJKACZ, S., JACHIMOWICZ, P., NIESTĘPSKI, S. & KONOPKA, I. 2020. Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 381, 121221.
- PANG, R., LI, Y., CHEN, M., ZENG, H., LEI, T., ZHANG, J., DING, Y., WANG, J., WU, S., YE, Q., ZHANG, J. & WU, Q. 2020. A database for risk assessment and comparative genomic analysis of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in China. *Scientific Data*, 7, 321.
- PÄRNÄNEN, K. M. M., NARCISO-DA-ROCHA, C., KNEIS, D., BERENDONK, T. U., CACACE, D., DO, T. T., ELPERS, C., FATTA-KASSINOS, D., HENRIQUES, I., JAEGER, T., KARKMAN, A., MARTINEZ, J. L., MICHAEL, S. G., MICHAEL-KORDATOU, I., O'SULLIVAN, K., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., SCHWARTZ, T., SHENG, H., SØRUM, H., STEDTFELD, R. D., TIEDJE, J. M., GIUSTINA, S. V. D., WALSH, F., VAZ-MOREIRA, I., VIRTÀ, M. & MANAIA, C. M. 2019. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science Advances*, 5, eaau9124.
- PAULUS, G. K., HORNSTRA, L. M. & MEDEMA, G. 2020. International tempo-spatial study of antibiotic resistance genes across the Rhine river using newly developed multiplex qPCR assays. *Science of The Total Environment*, 706, 135733.
- POETA, P., RADHOUANI, H., IGREJAS, G., GONÇALVES, A., CARVALHO, C., RODRIGUES, J., VINUÉ, L., SOMALO, S. & TORRES, C. 2008. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl Environ Microbiol*, 74, 7439-41.
- POIREL, L., CATTOIR, V. & NORDMANN, P. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in microbiology*, 3, 24-24.
- POIREL, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M., MAMMERI, H., LIARD, A. & NORDMANN, P. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3523-5.
- POPA, O. P., MURARIU, D. & POPA, L. O. 2007. Comparison of four DNA extraction methods from invasive freshwater bivalve species (Mollusca: Bivalvia) in Romanian fauna. *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"*, 6, 527-36.
- PROIA, L., ANZIL, A., SUBIRATS, J., BORREGO, C., FARRÈ, M., LLORCA, M., BALCÁZAR, J. L. & SERVAIS, P. 2018. Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. *Science of The Total Environment*, 628-629, 453-466.
- RAISSY, M., SHAHRAKI, M., ANSARI, M. & RAHIMI, E. 2012. Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio* strains isolated from seafood. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11.
- REES, H. C., MADDISON, B. C., MIDDLEDITCH, D. J., PATMORE, J. R. M. & GOUGH, K. C. 2014. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1450-1459.
- REICHERT, G., HILGERT, S., ALEXANDER, J., RODRIGUES DE AZEVEDO, J. C., MORCK, T., FUCHS, S. & SCHWARTZ, T. 2021. Determination of antibiotic resistance genes in a WWTP-impacted river in surface water, sediment, and biofilm: Influence of seasonality and water quality. *Sci Total Environ*, 768, 144526.
- REYNOLDS, L. J., SALA-COMORERA, L., MARTIN, N. A., NOLAN, T. M., STEPHENS, J. H., GITTO, A., O'HARE, G. M. P., O'SULLIVAN, J. J. & MEIJER, W. G. 2020. Correlation between antimicrobial resistance and faecal contamination in small urban streams and bathing waters. *Science of The Total Environment*, 739, 140242.
- RICO, A., PHU, T. M., SATAPORNVANIT, K., MIN, J., SHAHABUDDIN, A. M., HENRIKSSON, P. J. G., MURRAY, F. J., LITTLE, D. C., DALSGAARD, A. & VAN DEN BRINK, P. J. 2013. Use of veterinary

- medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412-413, 231-243.
- ROBERTS, A. P., CHANDLER, M., COURVALIN, P., GUÉDON, G., MULLANY, P., PEMBROKE, T., ROOD, J. I., SMITH, C. J., SUMMERS, A. O., TSUDA, M. & BERG, D. E. 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*, 60, 167-73.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S., CHAMORRO, S., MARTI, E., HUERTA, B., GROS, M., SÀNCHEZ-MELSIÓ, A., BORREGO, C. M., BARCELÓ, D. & BALCÁZAR, J. L. 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234-242.
- ROWE-MAGNUS, D. A., GUEROUT, A.-M. & MAZEL, D. 2002. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Molecular Microbiology*, 43, 1657-1669.
- RYSZ, M., MANSFIELD, W. R., FORTNER, J. D. & ALVAREZ, P. J. J. 2013. Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration. *Environmental Science & Technology*, 47, 6995-7001.
- SACRAMENTO, A. G., FERNANDES, M. R., SELLERA, F. P., DOLABELLA, S. S., ZANELLA, R. C., CERDEIRA, L. & LINCOPAN, N. 2019. VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST1336 isolated from mussels in an anthropogenically impacted ecosystem. *Mar Pollut Bull*, 142, 533-536.
- SANTÉ PUBLIQUE FRANCE 2021. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2020.
- SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L. & JOHNE, R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 113, 1014-26.
- SELLERA, F. P., FERNANDES, M. R., MOURA, Q., CARVALHO, M. P. N. & LINCOPAN, N. 2018. Extended-spectrum- β -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in wild fishes from a polluted area in the Atlantic Coast of South America. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 183-186.
- SINGH, N. & RAI, V. 2012. Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4.
- SINGH, R., SINGH, A. P., KUMAR, S., GIRI, B. S. & KIM, K.-H. 2019. Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *Journal of Cleaner Production*, 234, 1484-1505.
- SIVALINGAM, P., POTÉ, J. & PRABAKAR, K. 2020. Extracellular DNA (eDNA): Neglected and potential sources of antibiotic resistant genes (ARGs) in the aquatic environments. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9, 874.
- SOMMER, M. O. A., DANTAS, G. & CHURCH, G. M. 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, 325, 1128-1131.
- 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. *The ISME journal*, 8, 768-777.
- SU, J. Q., WEI, B., XU, C. Y., QIAO, M. & ZHU, Y. G. 2014. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China. *Environment International*, 65, 9-15.
- SU, S., LI, C., YANG, J., XU, Q., QIU, Z., XUE, B., WANG, S., ZHAO, C., XIAO, Z., WANG, J. & SHEN, Z. 2020. Distribution of antibiotic resistance genes in three different natural water bodies-A lake, river and sea. *International journal of environmental research and public health*, 17, 552.
- SURETTE, M. D. & WRIGHT, G. D. 2017. Lessons from the environmental antibiotic resistome. *Annu Rev Microbiol*, 71, 309-329.
- TAKAHASHI, H., KONUMA, H. & HARA-KUDO, Y. 2006. Development of a quantitative real-time PCR method to enumerate total bacterial counts in ready-to-eat fruits and vegetables. *Journal of food protection*, 69, 2504-2508.

- TAN, L., LI, L., ASHBOLT, N., WANG, X., CUI, Y., ZHU, X., XU, Y., YANG, Y., MAO, D. & LUO, Y. 2018. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Sci Total Environ*, 621, 1176-1184.
- TAN, L., WANG, F., LIANG, M., WANG, X., DAS, R., MAO, D. & LUO, Y. 2019. Antibiotic resistance genes attenuated with salt accumulation in saline soil. *Journal of Hazardous Materials*, 374, 35-42.
- TANAKA, Y., TAKAHASHI, H., SIMIDU, U. & KIMURA, B. 2010. Design of a new universal real-time PCR system targeting the *tuf* gene for the enumeration of bacterial counts in food. *Journal of food protection*, 73, 670-679.
- TAO, W., ZHANG, X.-X., ZHAO, F., HUANG, K., MA, H., WANG, Z., YE, L. & REN, H. 2016. High levels of antibiotic resistance genes and their correlations with bacterial community and mobile genetic elements in pharmaceutical wastewater treatment bioreactors. *PloS one*, 11, e0156854-e0156854.
- THOMASSEN, G. M. B., REICHE, T., TENNFJORD, C. E. & MEHLI, L. 2022. Antibiotic resistance properties among *Pseudomonas* spp. associated with salmon processing environments. *Microorganisms*, 10.
- THOMSEN, P. F., KIELGAST, J., IVERSEN, L. L., MØLLER, P. R., RASMUSSEN, M. & WILLERSLEV, E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLOS ONE*, 7, e41732.
- TIIRIK, K., NÖLVAK, H., OOPKAUP, K., TRUU, M., PREEM, J. K., HEINARU, A. & TRUU, J. 2014. Characterization of the bacterioplankton community and its antibiotic resistance genes in the Baltic Sea. *Biotechnol Appl Biochem*, 61, 23-32.
- TORRES-CORTÉS, G., MILLÁN, V., RAMÍREZ-SAAD, H. C., NISA-MARTÍNEZ, R., TORO, N. & MARTÍNEZ-ABARCA, F. 2011. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. *Environ Microbiol*, 13, 1101-14.
- ULLAH, R., YASIR, M., BIBI, F., ABUJAMEL, T. S., HASHEM, A. M., SOHRAB, S. S., AL-ANSARI, A., AL-SOFYANI, A. A., AL-GHAMDI, A. K., AL-SIENI, A. & AZHAR, E. I. 2019. Taxonomic diversity of antimicrobial-resistant bacteria and genes in the Red Sea coast. *Science of The Total Environment*, 677, 474-483.
- VAN HOEK, A. H., MEVIUS, D., GUERRA, B., MULLANY, P., ROBERTS, A. P. & AARTS, H. J. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol*, 2, 203.
- VANERMEN, N., ONKELINX, T., COURTENS, W., WALLE, M., VERSTRAETE, H. & STIENEN, E. 2014. Seabird avoidance and attraction at an offshore wind farm in the Belgian part of the North Sea. *Hydrobiologia*.
- WALDOR, M. K., TSCHÄPE, H. & MEKALANOS, J. J. 1996. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *Journal of Bacteriology*, 178, 4157-4165.
- WANG, L., SU, H., HU, X., XU, Y., XU, W., HUANG, X., LI, Z., CAO, Y. & WEN, G. 2019. Abundance and removal of antibiotic resistance genes (ARGs) in the rearing environments of intensive shrimp aquaculture in South China. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54, 211-218.
- WANG, Z., CHEN, Q., ZHANG, J., GUAN, T., CHEN, Y. & SHI, W. 2020. Critical roles of cyanobacteria as reservoir and source for antibiotic resistance genes. *Environment International*, 144, 106034.
- WANG, Z., ZHANG, X.-X., HUANG, K., MIAO, Y., SHI, P., LIU, B., LONG, C. & LI, A. 2013. Metagenomic profiling of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in a tannery wastewater treatment plant. *PLOS ONE*, 8, e76079.
- WESTHOF, L., KÖSTER, S. & REICH, M. 2016. Occurrence of micropollutants in the wastewater streams of cruise ships. *Emerging Contaminants*, 2.
- WESTOBY, M., NIELSEN, D. A., GILLINGS, M. R., LITCHMAN, E., MADIN, J. S., PAULSEN, I. T. & TETU, S. G. 2021. Cell size, genome size, and maximum growth rate are near-independent dimensions of ecological variation across bacteria and archaea. *Ecology and Evolution*, 11, 3956-3976.
- WHITE, D., LAPWORTH, D. J., CIVIL, W. & WILLIAMS, P. 2019. Tracking changes in the occurrence and source of pharmaceuticals within the River Thames, UK; from source to sea. *Environmental Pollution*, 249, 257-266.

- WHO 2020. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2020.
- WILLMS, I. M., GROTE, M., KOCATÜRK, M., SINGHOFF, L., KRAFT, A. A., BOLZ, S. H. & NACKE, H. 2021. Novel soil-derived Beta-lactam, chloramphenicol, fosfomycin and trimethoprim resistance genes revealed by functional metagenomics. *Antibiotics (Basel)*, 10.
- WINDEUROPE. 2019. *European offshore wind farms map public* [Online]. Available: <https://windeurope.org/> [Accessed 02/03/2022].
- WOMMACK, K. E. & COLWELL, R. R. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 69-114.
- WONG, M. K.-S., NAKAO, M. & HYODO, S. 2020. Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports*, 10, 21531.
- WU, S. W., DE LENCASTRE, H. & TOMASZ, A. 2001. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 183, 2417-2424.
- XU, K., WANG, J., GONG, H., LI, Y., ZHOU, L. & YAN, M. 2019a. Occurrence of antibiotics and their associations with antibiotic resistance genes and bacterial communities in Guangdong coastal areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 186, 109796.
- XU, L., CHEN, H., CANALES, M. & CIRIC, L. 2019b. Use of synthesized double-stranded gene fragments as qPCR standards for the quantification of antibiotic resistance genes. *Journal of Microbiological Methods*, 164, 105670.
- XUE, X., WANG, L., XING, H., ZHAO, Y., LI, X., WANG, G. & WANG, Z. 2021. Characteristics of phytoplankton-zooplankton communities and the roles in the transmission of antibiotic resistance genes under the pressure of river contamination. *Science of The Total Environment*, 780, 146452.
- YANG, C., PEI, X., WU, Y., YAN, L., YAN, Y., SONG, Y., COYLE, N. M., MARTINEZ-URTAZA, J., QUINCE, C., HU, Q., JIANG, M., FEIL, E., YANG, D., SONG, Y., ZHOU, D., YANG, R., FALUSH, D. & CUI, Y. 2019. Recent mixing of *Vibrio parahaemolyticus* populations. *The ISME Journal*, 13, 2578-2588.
- YIN, X., WU, J., LIU, Y., CHEN, X., XIE, C., LIANG, Y., LI, J. & JIANG, Z. 2022. Accumulation of microplastics in fish guts and gills from a large natural lake: Selective or non-selective? *Environmental Pollution*, 309, 119785.
- YUAN, J., LI, M. & LIN, S. 2015. An improved DNA extraction method for efficient and quantitative recovery of phytoplankton diversity in natural assemblages. *PLoS One*, 10.
- YUSOF, A. N., YANTA, N. & WOOD, A. 2004. The use of bivalves as bio-indicators in the assessment of marine pollution along a coastal area. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry - J RADIOANAL NUCL CHEM*, 259, 119-127.
- ZANKARI, E. 2014. Comparison of the web tools ARG-ANNOT and ResFinder for detection of resistance genes in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 4986.
- ZEIL, C., WIDMANN, M., FADEMRECHT, S., VOGEL, C. & PLEISS, J. 2016. Network Analysis of Sequence-Function Relationships and Exploration of Sequence Space of TEM β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 60, 2709-17.
- ZHANG, L., CALVO-BADO, L., MURRAY, A. K., AMOS, G. C. A., HAWKEY, P. M., WELLINGTON, E. M. & GAZE, W. H. 2019. Novel clinically relevant antibiotic resistance genes associated with sewage sludge and industrial waste streams revealed by functional metagenomic screening. *Environ Int*, 132, 105120.
- ZHANG, S., HUANG, J., ZHAO, Z., CAO, Y. & LI, B. 2020. Hospital wastewater as a reservoir for antibiotic resistance genes: A meta-analysis. *Frontiers in Public Health*, 8.
- ZHANG, X. X., ZHANG, T. & FANG, H. H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 397-414.
- ZHANG, Y., LI, A., DAI, T., LI, F., XIE, H., CHEN, L. & WEN, D. 2018. Cell-free DNA: A neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs. *Environ Sci Technol*, 52, 248-257.

- ZHANG, Z., ZHANG, Q., WANG, T., XU, N., LU, T., HONG, W., PENUELAS, J., GILLINGS, M., WANG, M., GAO, W. & QIAN, H. 2022. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. *Nature Communications*, 13, 1553.
- ZHENG, D., YIN, G., LIU, M., CHEN, C., JIANG, Y., HOU, L. & ZHENG, Y. 2021. A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. *Science of The Total Environment*, 777, 146009.

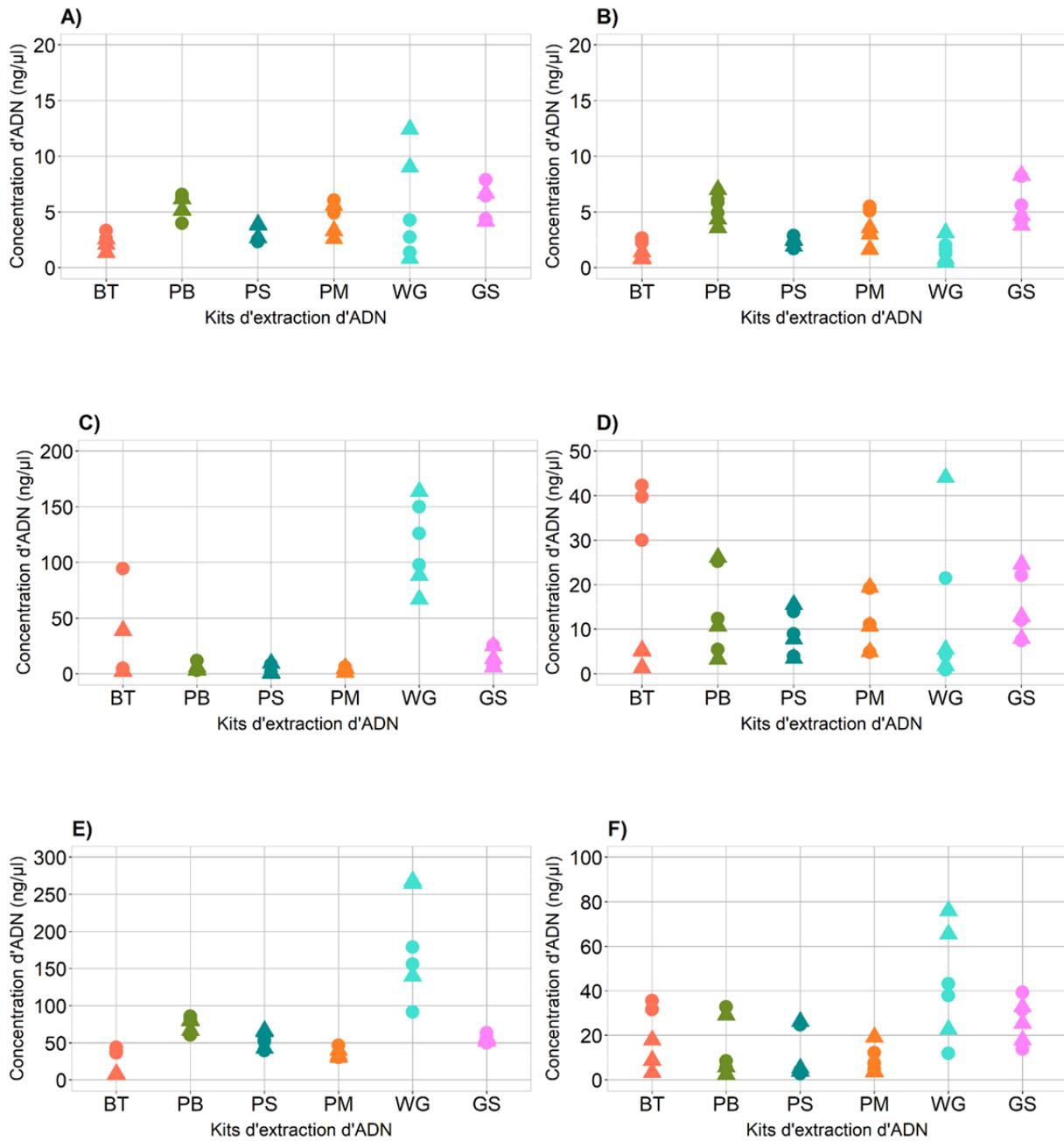
Annexes

Liste des annexes

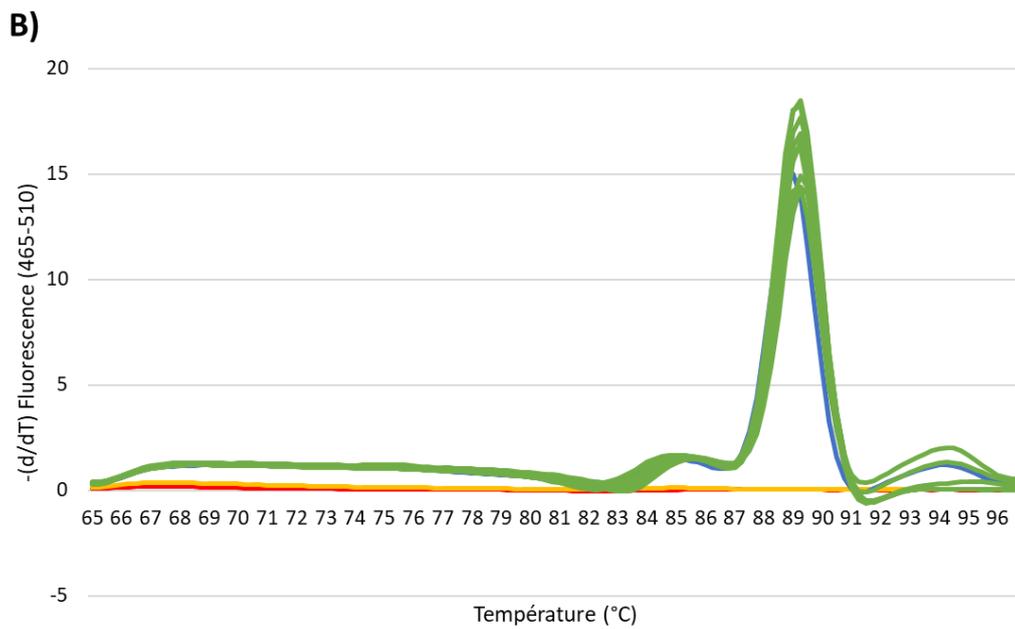
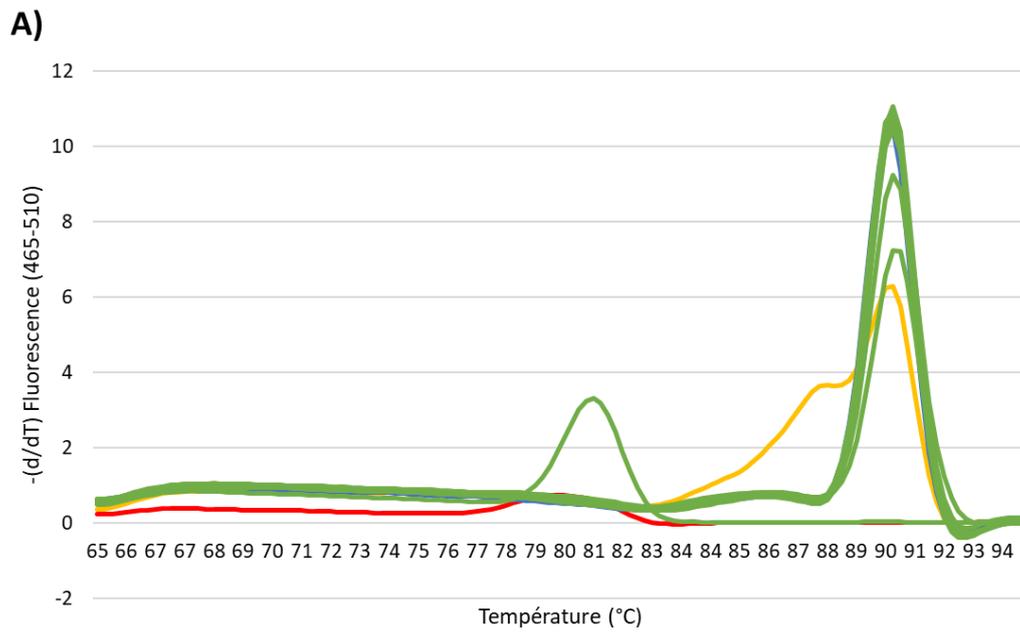
ANNEXE I : CONCENTRATIONS D'ADN EXTRAIT (NG/ μ L) A PARTIR DES ECHANTILLONS MARINS EN UTILISANT LES DIFFERENTS KITS D'EXTRACTION D'ADN. (●) : AVEC CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. (▲) : SANS CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS. A) PHYTOPLANCTON. B) ZOOPLANCTON. C) CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES. D) PEAU DE POISSON PLAT. E) BRANCHIES DE POISSON PLAT. F) VISCERES DE POISSON PLAT. BT : KIT BLOOD & TISSUE ; PB : KIT POWERBIOFILM® ; PS : KIT POWERSOIL® ; PM : KIT PURELINK™ MICROBIOME ; WG : KIT WIZARD GENOMIC ; GS : KIT GENELUTE™ STOOL. N = 6 ECHANTILLONS PAR MATRICE.....	298
ANNEXE II : COURBES DE FUSION OBTENUES A L'ISSUE DES QPCR CIBLANT LE GENE TETA EN UTILISANT A) LE PRE-MIX TAKARA ET B) LE PRE-MIX ROCHE. COURBE ROUGE : TEMOIN EAU (-) ; COURBE JAUNE : TEMOIN V. PARAHAEMOLYTICUS 15-B3PA-0205 (-) ; COURBE BLEUE : TEMOIN V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006 (+) ; COURBES VERTES : PLASMIDE PRP4 ENTRE 10 ³ ET 10 ¹¹ UG/ML (GAMME ETALON).....	299
ANNEXE III : COURBES DE FUSION OBTENUES A L'ISSUE DES QPCR CIBLANT LE GENE TETA EN UTILISANT LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,8 μ M ET B) 1,0 μ M. COURBE ROUGE : TEMOIN EAU (-) ; COURBE JAUNE : TEMOIN V. PARAHAEMOLYTICUS 15-B3PA-0205 (-) ; COURBE BLEUE : TEMOIN V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006 (+) ; COURBES VERTES : PLASMIDE PRP4 ENTRE 10 ³ ET 10 ¹¹ UG/ML (GAMME ETALON).....	300
ANNEXE IV : COURBES DE FUSION OBTENUES A L'ISSUE DES QPCR CIBLANT LE GENE BLA _{TEM} EN UTILISANT LES AMORCES A UNE CONCENTRATION FINALE DE A) 0,4 μ M, B) 0,8 μ M ET C) 1,0 μ M. COURBE ROUGE : TEMOIN EAU (-) ; COURBE JAUNE : TEMOIN V. PARAHAEMOLYTICUS 12-B3PA-1629 (-) ; COURBES VERTES : PLASMIDE PIP69 ENTRE 10 ³ ET 10 ¹⁰ UG/ML (GAMME ETALON).....	301
ANNEXE V : ARTICLE PARU DANS FRONTIERS IN MICROBIOLOGY (BOURDONNAIS ET AL., 2022).....	302
ANNEXE VI : INFORMATIONS SUR LA DATE DE PRELEVEMENT ET LA LOCALISATION DES SITES DE PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS D'EAU DE MER COLLECTES LORS DE LA CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE IBTS 2020. CEA : COTE EST DE L'ANGLETERRE ; CMN : CENTRE DE LA MER DU NORD ; CNP : COTE DU NORD DES PAYS-BAS ; COP : COTE OUEST DES PAYS-BAS ; ET : EMBOUCHURE DE LA TAMISE ; ME : MANCHE EST.....	313
ANNEXE VII : COURBES STANDARD DES REACTIONS DE QPCR REALISEES POUR L'ANALYSE DES ECHANTILLONS D'EAUX FLUVIALES ET COTIERES CIBLANT LES GENES TUF (A), TETA (B), BLA _{TEM} (C), SUL1 (D) ET INT11 (E).....	314
ANNEXE VIII : COURBES STANDARD DES REACTIONS DE QPCR REALISEES POUR L'ANALYSE DES ECHANTILLONS D'EAU DE MER DE LA CAMPAGNE IBTS 2020 CIBLANT LES GENES TUF (A), TETA (B), BLA _{TEM} (C), SUL1 (D) ET INT11 (E).....	315
ANNEXE IX : INFORMATIONS SUR LES PRELEVEMENTS DE PHYTOPLANCTON (PH01 A PH16) ET DE ZOOPLANCTON (ZO01 A ZO16) DE LA CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE IBTS 2020. CEA : COTE EST ANGLETERRE ; CMN : CENTRE MER DU NORD ; CNP : COTE DU NORD DES PAYS-BAS ; COP : COTE OUEST DES PAYS-BAS ; ET : EMBOUCHURE TAMISE ; ME : MANCHE EST.....	316
ANNEXE X : INFORMATIONS SUR LES PRELEVEMENTS DE CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES (CH01 A CH04) DE LA CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE IBTS 2020 DANS LA MANCHE EST (ME).....	317
ANNEXE XI : INFORMATIONS SUR LES PRELEVEMENTS DE POISSONS PLATS (PO01 A PO35) DE LA CAMPAGNE OCEANOGRAPHIQUE IBTS 2020. CHAQUE ECHANTILLON DE POISSON PLAT CORRESPOND A UN PRELEVEMENT DE PEAU, DES BRANCHIES ET DES VISCERES. CEA : COTE EST ANGLETERRE ; CMN : CENTRE MER DU NORD ; CNP : COTE DU NORD DES PAYS-BAS ; COP : COTE OUEST DES PAYS-BAS ; ET : EMBOUCHURE TAMISE ; ME : MANCHE EST.....	318
ANNEXE XII : CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS DE MOLLUSQUES BIVALVES PRELEVES LORS DE LA CAMPAGNE IBTS 2020 ET ANALYSES DANS CETTE ETUDE.....	319
ANNEXE XIII : CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS DE POISSONS PLATS PRELEVES LORS DE LA CAMPAGNE IBTS 2020 ET ANALYSES DANS CETTE ETUDE.....	320
ANNEXE XIV : COURBES STANDARD DES REACTIONS DE QPCR REALISEES POUR L'ANALYSE DES ECHANTILLONS DE PHYTOPLANCTON, DE ZOOPLANCTON, DE CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES, DE PEAU, DE BRANCHIES ET DE VISCERES DE POISSONS PLATS CIBLANT LES GENES TETA (A), BLA _{TEM} (B), SUL1 (C), INT11 (D) ET TUF (E).....	321
ANNEXE XV : ABONDANCE ABSOLUE DU GENE BACTERIEN TUF ET ABONDANCES RELATIVES DES GENES INDICATEURS DANS LES ECHANTILLONS DE PHYTOPLANCTON (PH), ZOOPLANCTON (ZO), PEAU DE POISSONS PLATS (PE), BRANCHIES DE POISSONS PLATS (BR), VISCERES DE POISSONS PLATS (VI) ET CHAIR DE MOLLUSQUES BIVALVES (CH).....	322
ANNEXE XVI : ANALYSE DES CORRELATIONS ENTRE L'ABONDANCE ABSOLUE DES GENES SUL1, INT11, TUF ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES AUX ECHANTILLONS D'EAU DE MER. A) MATRICE DES COEFFICIENTS DE CORRELATION DE PEARSON (R). B) P-VALUES OBTENUES PAR UN TEST DE SIGNIFICATIVITE. LES P-VALUES SIGNIFICATIVES SONT SOULIGNEES ET EN GRAS. PR : PRESSION ; TEMP : TEMPERATURE DE L'EAU ; SAL : SALINITE ; TURB : TURBIDITE ; OXYG : SATURATION EN OXYGENE ; ALG : CONCENTRATION EN ALGUES.....	326

ANNEXE XVII : ANALYSE DES CORRELATIONS ENTRE L'ABONDANCE ABSOLUE DES GENES INDICATEURS, DU GENE TUF ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES AUX ECHANTILLONS DE PHYTOPLANCTON. A) MATRICE DES COEFFICIENTS DE CORRELATION DE PEARSON (R). B) P-VALUES OBTENUES PAR UN TEST DE SIGNIFICATIVITE. LES P-VALUES SIGNIFICATIVES SONT SOULIGNEES ET EN GRAS. PR : PRESSION ; TEMP : TEMPERATURE DE L'EAU ; SAL : SALINITE ; TURB : TURBIDITE ; OXYG : SATURATION EN OXYGENE ; ALG : CONCENTRATION EN ALGUES.....	327
ANNEXE XVIII : ANALYSE DES CORRELATIONS ENTRE L'ABONDANCE ABSOLUE DES GENES SUL1, INT11 ET DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIES AUX ECHANTILLONS DE ZOOPLANCTON. A) MATRICE DES COEFFICIENTS DE CORRELATION DE PEARSON (R). B) P-VALUES OBTENUES PAR UN TEST DE SIGNIFICATIVITE. LES P-VALUES SIGNIFICATIVES SONT SOULIGNEES ET EN GRAS. PR : PRESSION ; TEMP : TEMPERATURE DE L'EAU ; SAL : SALINITE ; TURB : TURBIDITE ; OXYG : SATURATION EN OXYGENE ; ALG : CONCENTRATION EN ALGUES.....	328
ANNEXE XIX : MODELES DE REGRESSION ENTRE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE TETA ET LE NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPONDAIT A (A) LA PEAU DES POISSONS PLATS, (B) AUX BRANCHIES DES POISSONS PLATS OU (C) A LA CHAIR DES MOLLUSQUES BIVALVES. LIGNE BLEUE CONTINUE : REGRESSION LINEAIRE ; COURBE BLEUE EN POINTILLES : REGRESSION LOCALE (DE TYPE LOWESS) ; ZONE BLEUE : INTERVALLE DE CONFIANCE DE 95 % .	329
ANNEXE XX : MODELES DE REGRESSION ENTRE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE BLATEM ET LE NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPONDAIT A (A) LA PEAU DES POISSONS PLATS, (B) AUX BRANCHIES DES POISSONS PLATS OU (C) A LA CHAIR DES MOLLUSQUES BIVALVES. LIGNE BLEUE CONTINUE : REGRESSION LINEAIRE ; COURBE BLEUE EN POINTILLES : REGRESSION LOCALE (DE TYPE LOWESS) ; ZONE BLEUE : INTERVALLE DE CONFIANCE DE 95 %.....	330
ANNEXE XXI : MODELES DE REGRESSION ENTRE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE SUL1 ET LE NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPONDAIT A (A) LA PEAU DES POISSONS PLATS, (B) AUX BRANCHIES DES POISSONS PLATS OU (C) A LA CHAIR DES MOLLUSQUES BIVALVES. LIGNE BLEUE CONTINUE : REGRESSION LINEAIRE ; COURBE BLEUE EN POINTILLES : REGRESSION LOCALE (DE TYPE LOWESS) ; ZONE BLEUE : INTERVALLE DE CONFIANCE DE 95 % .	331
ANNEXE XXII : MODELES DE REGRESSION ENTRE L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE INT11 ET LE NIVEAU TROPHIQUE. LE NIVEAU TROPHIQUE 3 CORRESPONDAIT A (A) LA PEAU DES POISSONS PLATS, (B) AUX BRANCHIES DES POISSONS PLATS OU (C) A LA CHAIR DES MOLLUSQUES BIVALVES. LIGNE BLEUE CONTINUE : REGRESSION LINEAIRE ; COURBE BLEUE EN POINTILLES : REGRESSION LOCALE (DE TYPE LOWESS) ; ZONE BLEUE : INTERVALLE DE CONFIANCE DE 95 %.....	332
ANNEXE XXIII : CARTE ET SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE COMPLETE DU PLASMIDE PZE21-MCS AVEC LA SEQUENCE DES AMORCES PZE21-SEQF/PZE21-SEQR (BLEU), DES AMORCES PZE21-COLF/PZE21-COLR (ROSE) ET DU SITE DE RESTRICTION HINCII (ORANGE).	333
ANNEXE XXIV : COMPOSITION DU BOUILLON LB (LYSOGENY BROTH) ET DU MILIEU LB GELOSE UTILISES POUR LA METAGENOMIQUE FONCTIONNELLE.	334
ANNEXE XXV : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DES AMPLICONS DE LA PCR SUR LES TRANSFORMANTS DE LA LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE DE V. PARAHAEMOLYTICUS 13-B3PA-2931 REALISEE PAR CHOC THERMIQUE. M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB ; PUIIS 1 A 10 : CLONES ; PUIT 11 : EAU NUCLEASE-FREE (TEMOIN NEGATIF) ; PUIT 12 : ADN DU PLASMIDE PZE21-MCS SANS INSERT ; PUIIS 13 A 32 : CLONES. LA LIGNE BLANCHE INDIQUE LA TAILLE DES AMPLICONS QUAND LE PLASMIDE EST VIDE.	335
ANNEXE XXVI : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DES AMPLICONS DE LA PCR REALISEE SUR LES COLONIES RESISTANTES AU SULFAMETHOXAZOLE DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 16-B3PA-0006 (PUIIS 1 A 6 : 16-SUL-1 A 16-SUL-6) ET A LA TETRACYCLINE DE LA SOUCHE V. PARAHAEMOLYTICUS 13-B3PA-2931 (PUIIS 7 ET 8 : 13-TET-1 ET 13-TET-2). PUIT 9 : ADN DU PLASMIDE PZE21-MCS SANS INSERT ; PUIT 10 : EAU NUCLEASE-FREE (TEMOIN NEGATIF) ; M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB. LA LIGNE BLANCHE INDIQUE LA TAILLE DES AMPLICONS QUAND LE PLASMIDE EST VIDE.	335
ANNEXE XXVII : REVELATION SUR GEL D'AGAROSE A 1 % DES AMPLICONS DE LA PCR REALISEE SUR LES COLONIES S'ETANT DEVELOPPEES EN PRESENCE D'ERYTHROMYCINE. M : MARQUEUR DE TAILLE 100 PB ; PUIIS 1 A 10 : LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE 12-B3PA-1629 (CLONES 12-ERY-1 A 12-ERY-10) ; PUIIS 11 A 20 : LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE 13-B3PA-2931 (CLONES 13-ERY-1 A 13-ERY-10) ; PUIIS 21 A 30 : LIBRAIRIE METAGENOMIQUE DE LA SOUCHE 16-B3PA-0006 (CLONES 16-ERY-1 A 16-ERY-10). LA LIGNE BLANCHE INDIQUE LA TAILLE DES AMPLICONS QUAND LE PLASMIDE EST VIDE. .	335
ANNEXE XXVIII : ANALYSE DES SEQUENCES DES INSERTS PLASMIDIQUES DES CLONES S'ETANT DEVELOPPEES EN PRESENCE D'ERYTHROMYCINE (LIBRAIRIES METAGENOMIQUES 12-B3PA-1629, 13-B3PA-2931 ET 16-B3PA-0006) PAR UN BLAST NUCLEOTIDIQUE (NCBI). NA : NON ANNOTE. PRODUIT : PROTEINE OU FONCTION DE LA PROTEINE CODEE PAR LE GENE IDENTIFIE ; QUERY COVER : POURCENTAGE CORRESPONDANT A LA LONGUEUR DE LA SEQUENCE BLASTEE COUVRANT LA SEQUENCE CIBLE ; % D'IDENTITE : POURCENTAGE D'IDENTITE CORRESPONDANT AU DEGRE DE SIMILITUDE ENTRE LA SEQUENCE BLASTEE ET LA SEQUENCE CIBLE ; BACTERIE : ESPECE BACTERIENNE DANS LAQUELLE LE GENE A ETE IDENTIFIE.	336

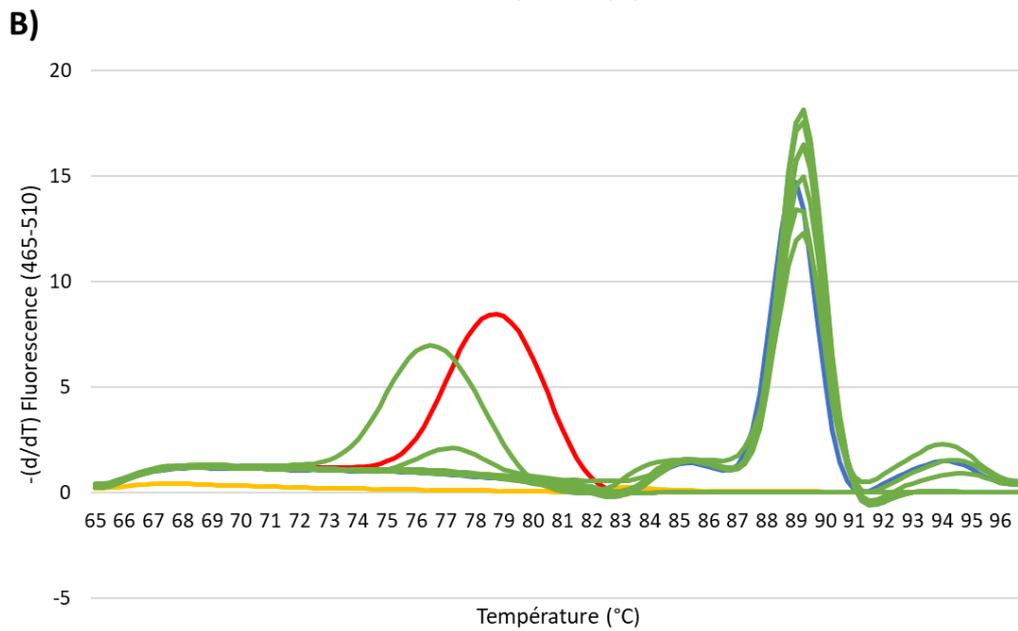
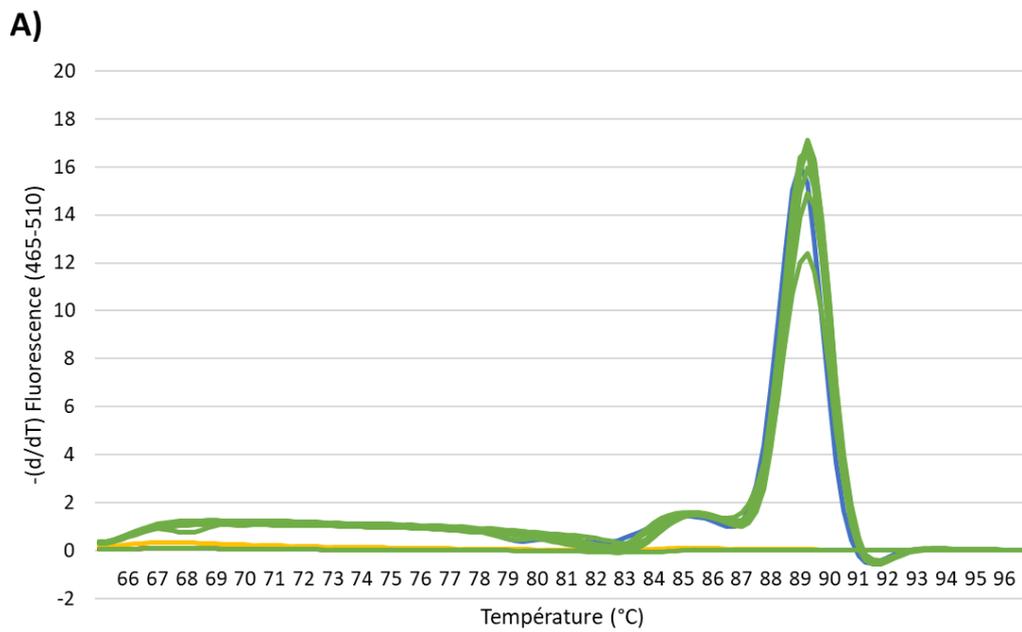
Annexe I : Concentrations d'ADN extrait (ng/μl) à partir des échantillons marins en utilisant les différents kits d'extraction d'ADN. (●) : avec contrôle positif de processus. (▲) : sans contrôle positif de processus. A) Phytoplancton. B) Zooplancton. C) Chair de mollusques bivalves. D) Peau de poisson plat. E) Branchies de poisson plat. F) Viscères de poisson plat. BT : kit Blood & Tissue ; PB : kit PowerBiofilm® ; PS : kit PowerSoil® ; PM : kit PureLink™ Microbiome ; WG : kit Wizard Genomic ; GS : kit GenElute™ Stool. N = 6 échantillons par matrice.



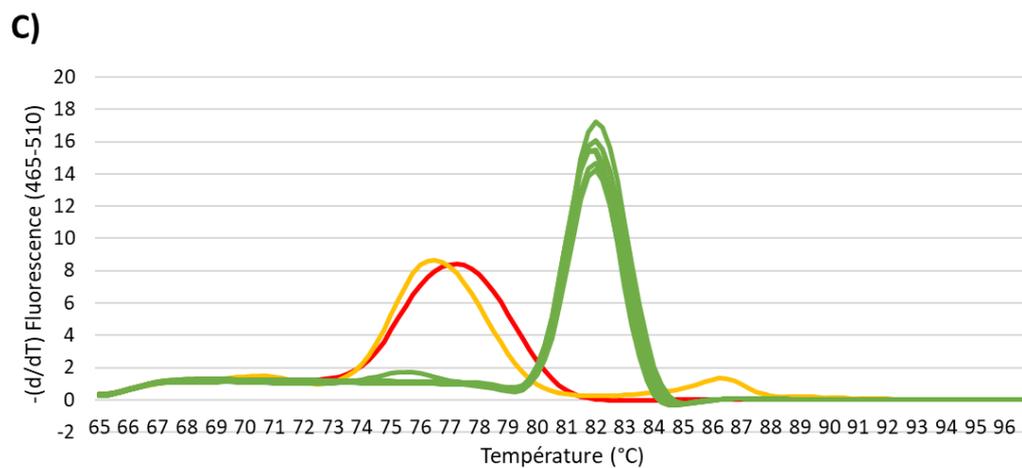
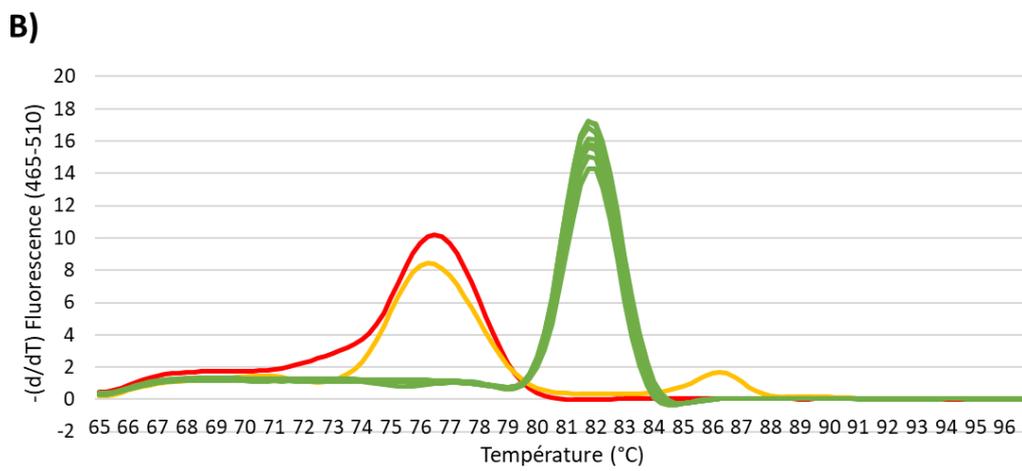
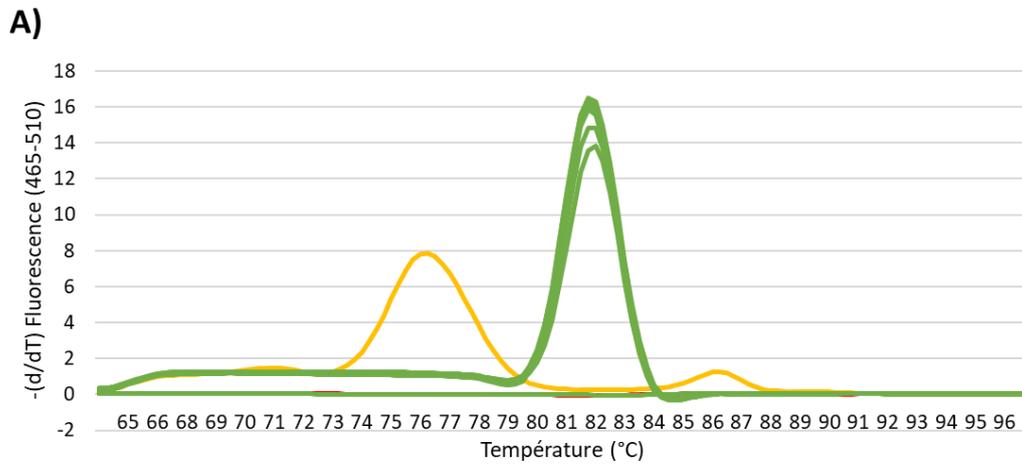
Annexe II : Courbes de fusion obtenues à l'issue des qPCR ciblant le gène *tetA* en utilisant A) le pré-mix Takara et B) le pré-mix Roche. Courbe rouge : témoin eau (-) ; courbe jaune : témoin *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205 (-) ; courbe bleue : témoin *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 (+) ; courbes vertes : plasmide pRP4 entre 10^3 et 10^{11} UG/ml (gamme étalon).



Annexe III : Courbes de fusion obtenues à l'issue des qPCR ciblant le gène *tetA* en utilisant les amorces à une concentration finale de A) 0,8 μM et B) 1,0 μM . Courbe rouge : témoin eau (-) ; courbe jaune : témoin *V. parahaemolyticus* 15-B3PA-0205 (-) ; courbe bleue : témoin *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 (+) ; courbes vertes : plasmide pRP4 entre 10^3 et 10^{11} UG/ml (gamme étalon).



Annexe IV : Courbes de fusion obtenues à l'issue des qPCR ciblant le gène *bla*_{TEM} en utilisant les amorces à une concentration finale de A) 0,4 μ M, B) 0,8 μ M et C) 1,0 μ M. Courbe rouge : témoin eau (-) ; courbe jaune : témoin *V. parahaemolyticus* 12-B3PA-1629 (-) ; courbes vertes : plasmide pIP69 entre 10^3 et 10^{10} UG/ml (gamme étalon).





Occurrence of Indicator Genes of Antimicrobial Resistance Contamination in the English Channel and North Sea Sectors and Interactions With Environmental Variables

Erwan Bourdonnais^{1,2}, Darina Colcanap¹, Cédric Le Bris², Thomas Brauge¹ and Graziella Midelet^{1*}

¹ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulogne-sur-Mer, France, ²Univ. du Littoral Côte d'Opale, UMR 1158 BioEcoAgro, Institut Charles Viollette, Unité Sous Contrat ANSES, INRAe, Univ. Artois, Univ. Lille, Univ. de Picardie Jules Verne, Univ. de Liège, Junia, Boulogne-sur-Mer, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Sonja Oberbeckmann,
Leibniz Institute for Baltic Sea
Research (LG), Germany

Reviewed by:

Qazi Mohd Rizwanul Haq,
Jamia Millia Islamia, India
Eckhard Strauch,
Bundesanstalt für Risikobewertung
(BfR), Germany

*Correspondence:

Graziella Midelet
graziella.midelet@anses.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Aquatic Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 24 February 2022

Accepted: 26 April 2022

Published: 16 May 2022

Citation:

Bourdonnais E, Colcanap D,
Le Bris C, Brauge T and
Midelet G (2022) Occurrence of
Indicator Genes of Antimicrobial
Resistance Contamination in the
English Channel and North Sea
Sectors and Interactions With
Environmental Variables.
Front. Microbiol. 13:883081.
doi: 10.3389/fmicb.2022.883081

The marine environment is a potential natural reservoir of antimicrobial resistance genes (ARGs), subject to anthropogenic effluents (wastewater, industrial, and domestic), and known as a final receiving system. The aim of this study was to investigate the abundance and geographical distribution of the three *bla*_{TEM}, *sul1*, and *int11* genes, proposed as indicators of contamination to assess the state of antimicrobial resistance in environmental settings, added to the *tetA* gene and the microbial population (*tuf* gene) in the English Channel and North Sea areas. Bacterial DNA was extracted from 36 seawater samples. The abundance of these genes was determined by quantitative PCR (qPCR) and was analyzed in association with environmental variables and geographical locations to determine potential correlations. The *bla*_{TEM} and *tetA* genes were quantified in 0% and 2.8% of samples, respectively. The *sul1* and *int11* genes were detected in 42% and 31% of samples, respectively, with an apparent co-occurrence in 19% of the samples confirmed by a correlation analysis. The absolute abundance of these genes was correlated with the microbial population, with results similar to the relative abundance. We showed that the *sul1* and *int11* genes were positively correlated with dissolved oxygen and turbidity, while the microbial population was correlated with pH, temperature and salinity in addition to dissolved oxygen and turbidity. The three *tetA*, *sul1*, and *int11* genes were quantified in the same sample with high abundances, and this sample was collected in the West Netherlands coast (WN) area. For the first time, we have shown the impact of anthropogenic inputs (rivers, man-made offshore structures, and maritime activities) and environmental variables on the occurrence of three indicators of environmental contamination by antimicrobial resistance in the North Sea and English Channel seawaters.

Keywords: antimicrobial resistance genes, contamination indicator genes, seawater, qPCR, environmental factors, mobile genetic element

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is an emerging public health threat of the 21st century worldwide. In fact, an incommensurate increase in antimicrobial resistant bacteria (ARB) and antimicrobial resistance genes (ARGs) dissemination in the environment is influencing by the human (hospital, domestic) and animal infection treatments (domestic, animal husbandry, and aquaculture). Other anthropogenic inputs (mainly industrial and agricultural effluents) also threaten the water quality with the continuous release of antibiotic residues, ARB and ARGs in aquatic environments. Indeed, water environment is known as a natural reservoir of ARB and ARGs. Many studies have determined the occurrence of ARGs in hospital and domestic effluents (Rodríguez-Mozaz et al., 2015), wastewater treatment plant effluents (Pazda et al., 2019) and aquaculture farm effluents (Su et al., 2020a). These types of effluents converge in rivers and streams (Calero-Cáceres et al., 2017) before being discharged into the marine environment, the final receiving system. The occurrence of ARGs in the marine waters is understudied, or concerns mainly the coastal and estuarine waters which are strongly influenced by various effluents and human activities. For instance, the *bla*_{TEM} (β -lactam resistance), *sul1*, *sul2* (sulfonamide resistance), *tetA* and *tetB* (tetracycline resistance) genes have been detected in coastal waters of different countries such as in the coasts of Portugal and England (Alves et al., 2014; Leonard et al., 2018). Once released into the environment, the maintenance and dissemination of ARGs may be influenced by biotic (plants, microbes, and animals) and abiotic factors (amount of oxygen, temperature, pH and salinity; Barkovskii et al., 2012). Only few studies reported the relationships between these factors and the occurrence of ARGs in the aquatic environment. The ARGs can naturally diffuse into aquatic environments *via* water currents, associated with bacteria or as free DNA, then be absorbed by bacteria through transformation or be transferred between bacteria by conjugation and transduction. Therefore, the main mechanisms allowing the dissemination of resistance genes are horizontal gene transfers by mobile genetic elements (MGEs), like the class 1 integrons which are widely found in the environment (Gillings et al., 2015). The *intI1* gene encoding for the class 1 integron-integrase has been detected in coastal waters in China (Su et al., 2020b) and in urban-impacted coastal estuarine in South Carolina, United States (Uyaguari et al., 2013). Because of the diversity of the ARG types within the environment, it is complicated or even infeasible to detect all the genes constituting the resistome of marine environment. Therefore, some genetic determinants of antimicrobial resistance such as the *bla*_{TEM}, *sul1*, and *intI1* genes have been proposed as indicators of contamination to assess the state of antimicrobial resistance in the environment (Berendonk et al., 2015; ANSES, 2020). Furthermore, other genes could be monitored in the marine environment, such as the *tetA* gene encoding tetracycline resistance. Indeed, this gene as well as the indicator genes that have been suggested are clinically relevant, often associated with MGEs and are prevalent in the environment. To our knowledge, no data is available on the occurrence of the *tetA*,

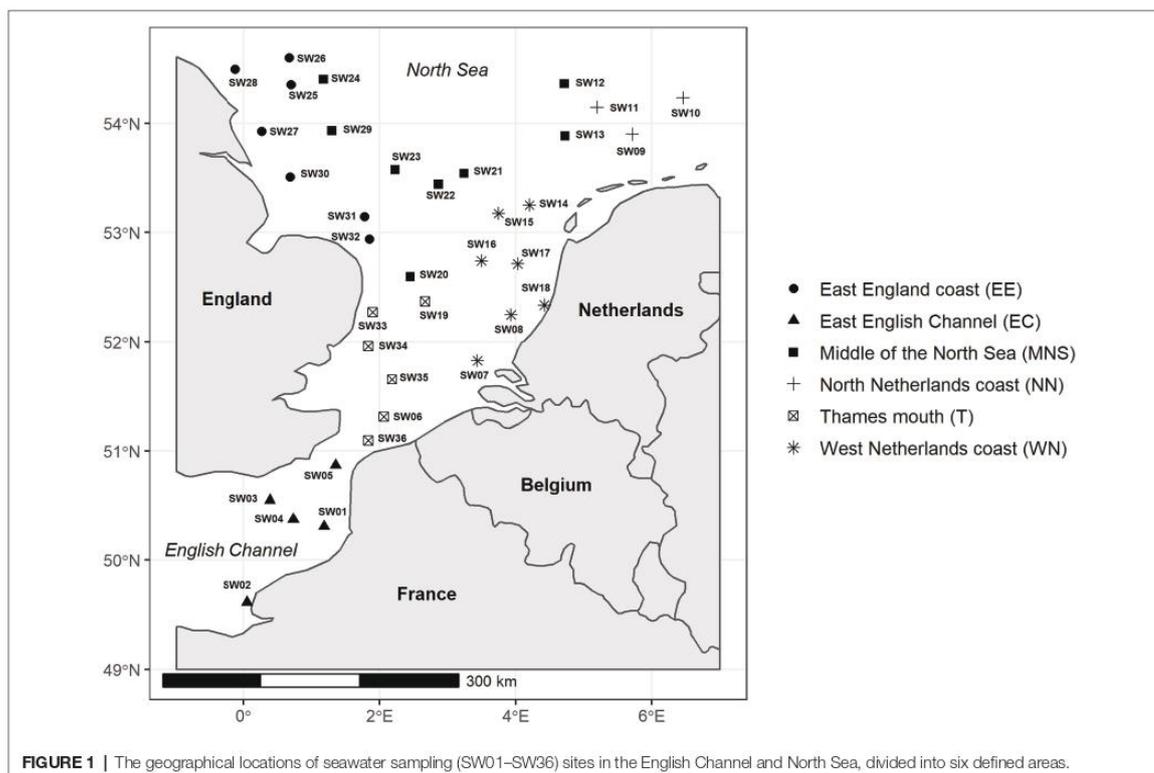
*bla*_{TEM}, *sul1*, and *intI1* genes in the North Sea and the English Channel seawaters, and no information on the possible role of anthropogenic inputs, and biotic and abiotic factors on this occurrence.

The North Sea and the English Channel areas are distinguished from the vast marine and oceanic environments by more pronounced anthropic influences that have been intensively affected by human activities, especially agriculture and the release of untreated domestic sewage, particularly with the proximity of the English, French, Belgian, Dutch, German, and Danish coasts. In addition, the English Channel and the North Sea are subject to the numerous effluents of the large rivers running through all these countries, such as the Seine (France), the Thames (England) and the Rhine (Netherlands) which contain different natures of pollutants. It is also necessary to highlight the anthropic impact from important European port activities such as Le Havre (France), Rotterdam (Netherlands) and Anvers (Belgium). Similarly, different types and sizes of boats (fishing, container, passenger and cargo ships) discharge the sewage after more or less effective decontamination. In this study, we investigated the absolute abundance and the geographical distribution of the four *bla*_{TEM}, *tetA*, *sul1*, and *intI1* indicator genes and the bacterial *tuf* gene to estimate the microbial population in the English Channel and the North Sea seawater samples, using quantitative PCR (qPCR). In order to estimate the proportion of these indicator genes within the microbial population, we also calculated the relative abundance. Finally, we evaluated the influence of environmental variables on the absolute abundance of the indicator genes and the microbial population (Lazard et al., 2021).

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection and Sample Preparation by Filtration

Seawater samples were collected during the International Bottom Trawl Survey (IBTS) oceanographic campaign in January 2020 in the English Channel—North Sea area (Lazard et al., 2021). Thirty-six seawater samples were collected in six areas defined as East English Channel (EE; $n=5$), Thames mouth (T; $n=6$), East England coast (EC; $n=7$), Middle of the North Sea (MNS; $n=8$), North Netherlands coast (NN; $n=3$), and West Netherlands coast (WN; $n=7$; **Figure 1**). At each sampling point, 600 ml of seawater were collected at a depth of about 30 m using Niskin bottles and transferred into sterile containers. The samples were stored at -20°C on the boat, then transported to laboratory and stored at -20°C until filtration. Additionally, environmental variables including water temperature, pH, salinity, turbidity, dissolved oxygen and total algae concentration were measured. A request for access to these environmental data can be made to the following address: <http://data.ifremer.fr/pdmi/portalssearch/main>. Prior to filtration, samples were thawed at room temperature and homogenized. Each seawater sample was successively filtered through 1.2, 0.45, and 0.22 μm pore-size mixed cellulose ester membranes (Millipore, Burlington,



United States) using a Nalgene individual vacuum filtration system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States). Then, the 0.45 and 0.22 μm filter membranes were picked up and sterilely cut into about 1 mm slices. They were transferred in 2 ml tubes and stored at -20°C until DNA extraction.

Total DNA Extraction

Total DNA was extracted from the 0.45 and 0.22 μm filter membranes using the DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen, Hilden, Germany), following manufacturer's instructions with some modifications. The membrane slices were placed into bead tubes containing 700 μl of MBL buffer and 200 μl of FB buffer. The tubes were twice vortexed at maximum speed for 45 s and incubated at 56°C for 30 min. Then, we added $2\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of proteinase K (Sigma, Saint-Louis, United States) to the tubes before incubating them at 56°C for 30 min. The tubes were vortexed 15 s and centrifuged at $4,000\times g$ for 1 min. Supernatant was transferred into a 2 ml tube and then centrifuged at $13,000\times g$ for 1 min. Following extraction steps correspond to those described in the extraction kit protocol except of the IRS buffer volume (200 μl) and the final elution step with $2\times 30\mu\text{l}$ of EB buffer. The DNA extracted from the two filter membranes were pooled together to form a single DNA extract for the subsequent analysis. The DNA concentration (A260 nm) and purity (A260/280 nm and A260/230 nm ratios) of each DNA sample were validated using a DS-11 spectrophotometer

(Denovix, Wilmington, United States). The DNA extracts were then stored at -20°C until analysis.

Quantification of the Four *tetA*, *bla*_{TEM}, *sul1*, and *intI1* Indicator Genes by qPCR

The indicator genes (*tetA* encoding for tetracycline resistance, *bla*_{TEM} for β -lactam resistance, *sul1* for sulfonamide resistance and *intI1* encoding for the class 1 integron-integrase) were quantified by the qPCR method. The different sets of primers and probes used for these qPCR reactions are detailed in the **Table 1**. Each qPCR was performed in a 20 μl reaction mixture. For the quantification of the *sul1* (Heuer and Smalla, 2007) and *intI1* (Barraud et al., 2010) genes, we employed the qPCR method using TaqMan probes. The mixtures contained 10 μl of LightCycler Probes Master (Roche, Rotkreuz, Switzerland), 0.2 μM of probes (Eurobio, Les Ulis, France), 0.4 μM of each primer (Eurobio) and 5 μl of DNA extract. For the quantification of the *tetA* (Ng et al., 2001) and *bla*_{TEM} (Bibbal et al., 2007) genes, we employed the qPCR method using SybrGreen dye. The mixtures contained 10 μl of LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), 0.4 μM of each primer (Eurobio) and 5 μl of DNA extract. For qPCR positive controls and the carrying out of standard curves, we used three *Escherichia coli* strains containing either the pRP4 plasmid with the *tetA* gene (CIP RP4), pIP69 plasmid with the *bla*_{TEM} gene (CIP pIP69), pRI

TABLE 1 | Primer and probe sequences and conditions associated to the quantitative PCR (qPCR) used in this study.

Gene	Primer/probe sequences	qPCR conditions	qPCR parameters	References
<i>tuf</i>	ACHGGHRTHGARATGTTCCG	95°C—5 min (1 cycle);	$E = 73.4\%$	Tanaka et al., 2010
	GTTDTORCCHGGCATNACCAT	95°C—10 s, 60°C—30 s,	$r^2 = 0.9989$	
		72°C—15 s (45 cycles)		
<i>tetA</i>	GCTACATCCTGCTTGCCCTTC	95°C—5 min (1 cycle);	$E = 84.8\%$	Ng et al., 2001
	CATAGATGCGCGTGAAGAGG	95°C—10 s, 60°C—30 s,	$r^2 = 0.9873$	
		72°C—5 s (45 cycles)		
<i>bla_{TEM}</i>	TTCTGTTTTTGCTCACCCAG	95°C—5 min (1 cycle);	$E = 93.5\%$	Bibbal et al., 2007
	CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	95°C—10 s, 60°C—30 s,	$r^2 = 0.9992$	
		72°C—5 s (45 cycles)		
<i>intI1</i>	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	95°C—5 min (1 cycle);	$E = 103.3\%$	Barraud et al., 2010
	GATCGTTCGAATGCGTGT	95°C—10 s, 60°C—	$r^2 = 0.9953$	
	(6-FAM)ATTCTGGCCGTGGTTCTGGGTTTT(BHQ1)	1 min, 72°C—1 s		
<i>sul1</i>	CCGTTGGCCCTCCTGTAAG	95°C—5 min (1 cycle);	$E = 110.1\%$	Heuer and Smalla, 2007
	TTGCCGATCGCGTGAAGT	95°C—10 s, 60°C—	$r^2 = 0.994$	
	(FAM)CAGCGAGCCTTGCGGCGG(TAMRA)	1 min, 72°C—1 s		
		(45 cycles)		

plasmid with the *sul1* gene (CRBIP19.58) (Collection of the Institut Pasteur Paris, Paris, France) and the *E. coli* strain containing the pTRC99A plasmid with the *intI1* gene (Barraud et al., 2010). These *E. coli* strains were grown in 10 ml of Trypticase Soy Broth with 0.6% Yeast Extract (TSBYE) containing 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ampicillin (Sigma) and incubated for 24 h at 37°C. After centrifugation for 10 min at 10,000 $\times g$, plasmid DNA was extracted from the cell pellets using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. For qPCR negative controls, we used three *Vibrio parahaemolyticus* strains (ANSES B3PA Collection, Boulogne-sur-Mer, France): B3PA-12-1,629 strain without *bla_{TEM}* gene, B3PA-13-2,931 strain without the *intI1* gene and B3PA-15-0205 strain without the *tetA* and *sul1* genes. These *Vibrio* strains were isolated on saline nutrient agar and incubated for 24 h at 37°C, before DNA extraction using DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. All qPCR reactions (TaqMan probe and SybrGreen dye) were performed according to the conditions detailed in the **Table 1** using a LightCycler 480 thermal cycler (Roche). Quantification cycle (Cq) values were calculated using the second derivate method.

Quantification of Microbial Population (*tuf* Gene) by qPCR

The quantification of the bacterial housekeeping *tuf* gene (Tanaka et al., 2010) was performed by qPCR method using SybrGreen dye to assess the relative abundance of indicator genes in relation to the microbial population. The primers are detailed in the **Table 1**. The reaction mixture of 20 μl contained 10 μl of LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), 0.4 μM of each primer (Eurobio) and 2 μl of DNA extract. Nuclease-free water was added to complete the total reaction volumes and was used for the negative control. For qPCR positive control and for the standard curve, we used the *V. parahaemolyticus* B3PA-16-0006 strain (ANSES B3PA Collection; Briet et al., 2018). Briefly, this strain was isolated on saline nutrient agar and incubated for 24 h at 37°C before DNA extraction using

DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. All qPCR reactions were performed according to the conditions detailed in the **Table 1** using a LightCycler 480 thermal cycler (Roche). Cq values were calculated using the second derivate method.

Data Analysis and Statistics

The qPCR results were validated following these criteria: the efficiency ranged from 75% to 125% (according to the NF T90-471:2015-06 standard), the linearity r^2 value was ≥ 0.99 and the Cq values of the negative controls were below the threshold of sensitivity. Gene copy numbers were calculated by the standard curves. The sensitivity for the qPCR targeting the *tetA* and *bla_{TEM}* genes was set at 10^5 copies. ml^{-1} while it was set at 10^4 copies. ml^{-1} for the *sul1*, *intI1*, and *tuf* genes. The absolute abundance was the concentration of the genes per mL of seawater (log copies. ml^{-1} seawater). Then, to calculate the relative abundance of the indicator genes (*tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1*, and *intI1* genes), we normalized the absolute abundance of the indicator genes with the absolute abundance of the *tuf* gene (Chen et al., 2019). All data presentation and statistical analysis were performed using RStudio Software version 1.4.1717 (RStudio, Inc., Boston, United States). One-way ANOVA and Tukey's multiple pairwise-comparisons were used to assess statistically significant differences at the 95% CI ($p < 0.05$). These analyses were performed on the absolute and relative abundances results to assess the dissemination of the genes according to the geographical areas. Possible correlations between the absolute abundances of the genes and the environmental variables were determined with Pearson's rank correlation coefficient (r). The power of the correlations was defined as follows: very low correlation ($0 < r < 0.19$), low correlation ($0.20 < r < 0.39$), moderate correlation ($0.40 < r < 0.59$), high correlation ($0.60 < r < 0.79$), very high correlation ($0.80 < r < 0.99$), and perfect correlation ($r = 1.0$). The correlation value of p were produced with a significance test to assess the relationships between the targeted genes and the environmental variables.

RESULTS

Absolute Abundance of the Four *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1*, and *int11* Indicator Genes and the *tuf* Gene

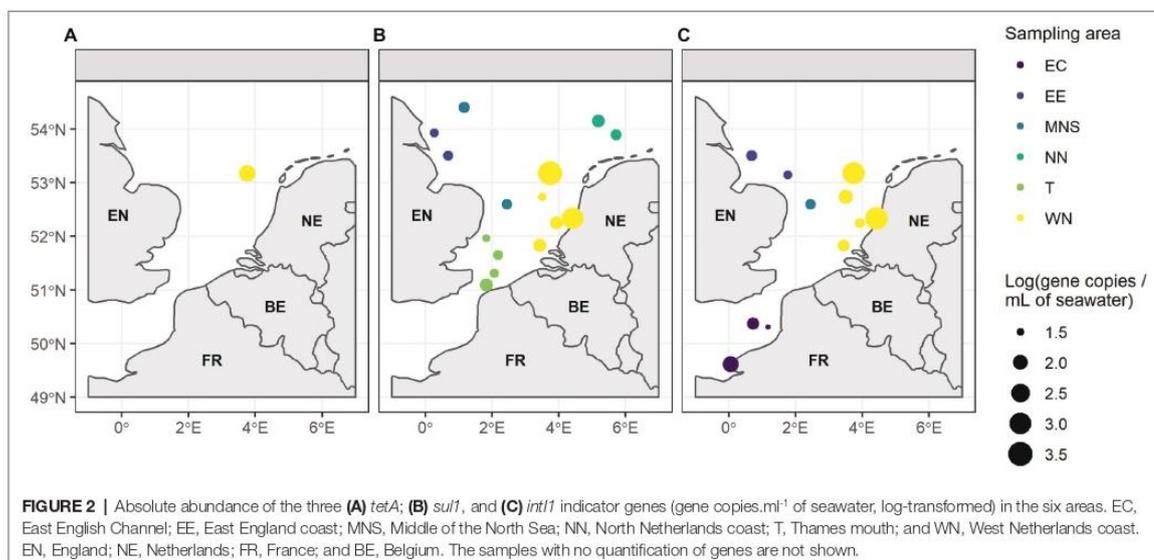
The absolute abundance of the four indicator genes and the *tuf* gene in the seawater samples and their geographical distribution are shown in Figures 2, 3. The absolute abundance values of the indicator genes and the *tuf* gene are referenced in the Supplementary Table S1. The *bla_{TEM}* gene was not quantified in any seawater sample. However, we quantified the *tetA* gene in only one out of the 36 analyzed seawater samples, with an absolute abundance of 2.24 log copies.ml⁻¹ of seawater in the WN area (Figure 2A). The *sul1* gene was quantified in 15/36 analyzed seawater samples with absolute abundances ranging from 1.52 to 3.55 log copies.ml⁻¹ of seawater (Figure 2B). We observed a lower absolute abundance in four areas (EE, MNS, NN, and the T areas) compared to the WN area. Moreover, it was not quantified in the East English Channel area (EC). For the *int11* gene, we found it in 11/36 analyzed seawater samples (Figure 2C). This gene was quantified neither in the T nor in the NN areas. We observed an absolute abundance of approximately 1.60 log copies.ml⁻¹ of seawater in two samples collected near the EE and in one sample from the MNS area. The *int11* gene absolute abundance was higher in the EC area (2.16 log copies.ml⁻¹ in one sample) and in the WN area, with two samples showing absolute abundances of 3.14 and 3.26 log copies.ml⁻¹ of seawater. The *tuf* gene was quantified in all seawater samples, with absolute abundance ranging from 3.38 to 5.02 log copies.ml⁻¹ of seawater (Figure 3). We observed significantly higher absolute abundance in the WN area (between 1.60 and 3.26 log copies.ml⁻¹) compared to the EC (1.47 to 2.16 log copies.ml⁻¹) ($p=0.007$) and to the MNS (1.64 log copies.ml⁻¹) ($p=0.050$) areas.

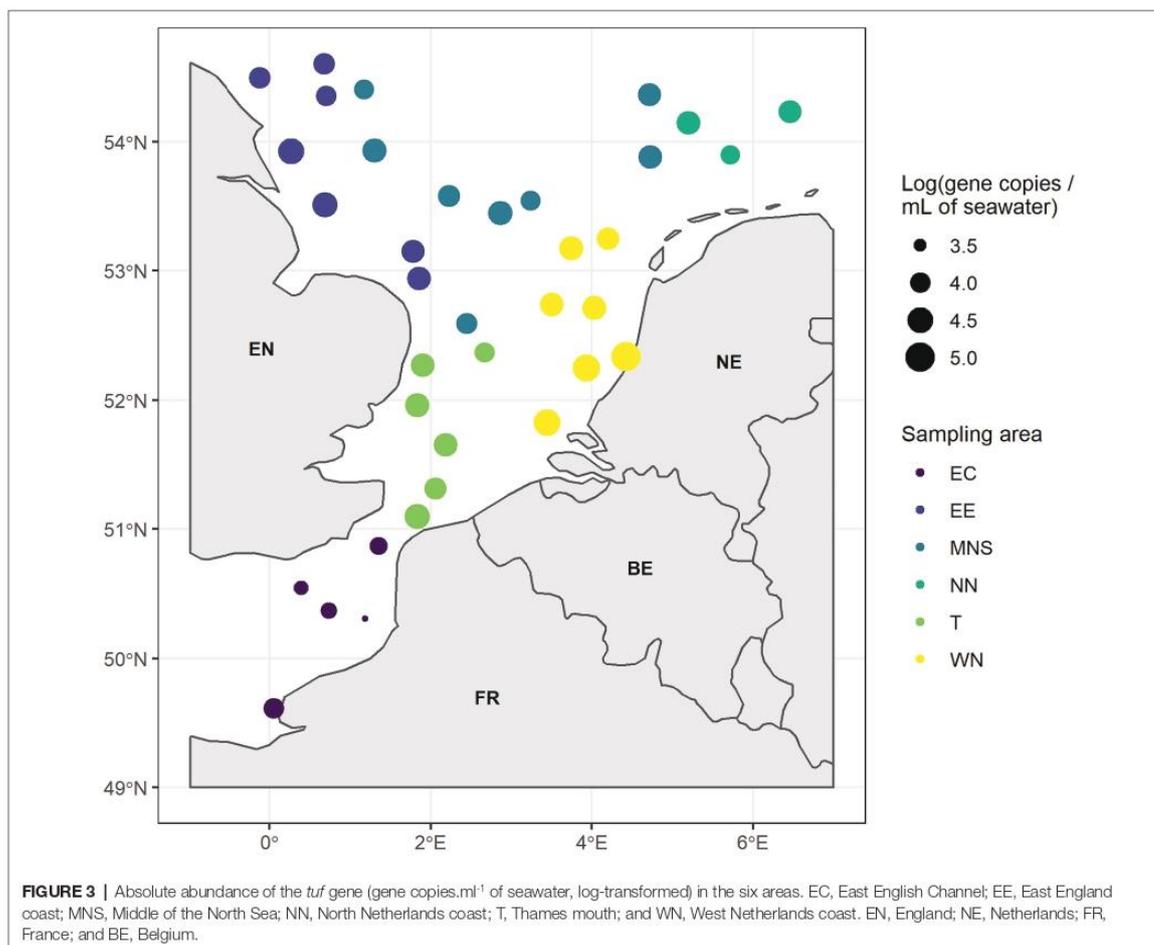
Relative Abundance of the Indicator Genes

The relative abundance of the *tetA* gene in the SW15 sample was 0.51 (Figure 4). For the *sul1* gene, we observed relative abundance ranging from 0.34 to 0.81. In the EE coast, MNS, NN, and T areas, constant relative abundances (around 0.40) were observed. The relative abundances were higher in the SW15 (0.81) and SW18 samples (0.60) collected in the WN area. For the *int11* gene, the relative abundance ranged from 0.34 to 0.72. The relative abundance of the *int11* gene was significantly higher in the WN area compared to the MNS ($p=0.040$) area. Indeed, two samples (SW15 and SW18) in the WN area had higher relative abundance compared to the other analyzed samples in the same area and in the two other areas. The relative abundance results of the *sul1* and *int11* genes were in agreement with those of absolute abundances. Moreover, no quantification of genes was observed in 17/36 (47.22%) seawater samples. When only one gene (*sul1* or *int11* gene) has been detected (33.33% seawater samples), we found exclusively the *int11* gene in the East English Channel (EC) area and the *sul1* gene in the NN and T areas. Among the seven samples with co-occurrence of the *sul1* and *int11* genes, the higher relative abundances were observed in two seawater samples (SW15 and SW18 samples in the WN area). Furthermore, the highest relative abundance of the three *tetA*, *sul1*, and *int11* genes concerned the same sample (SW15 sample), collected in the WN area.

Correlations Between the Absolute Abundance of the *sul1*, *int11*, *tuf* Genes and the Environmental Variables

Since the *bla_{TEM}* gene was not quantified and the *tetA* gene in only 2.78% of the seawater samples, their abundance was not considered in the analysis of correlations with environmental variables. In the analyzed seawater samples, the absolute



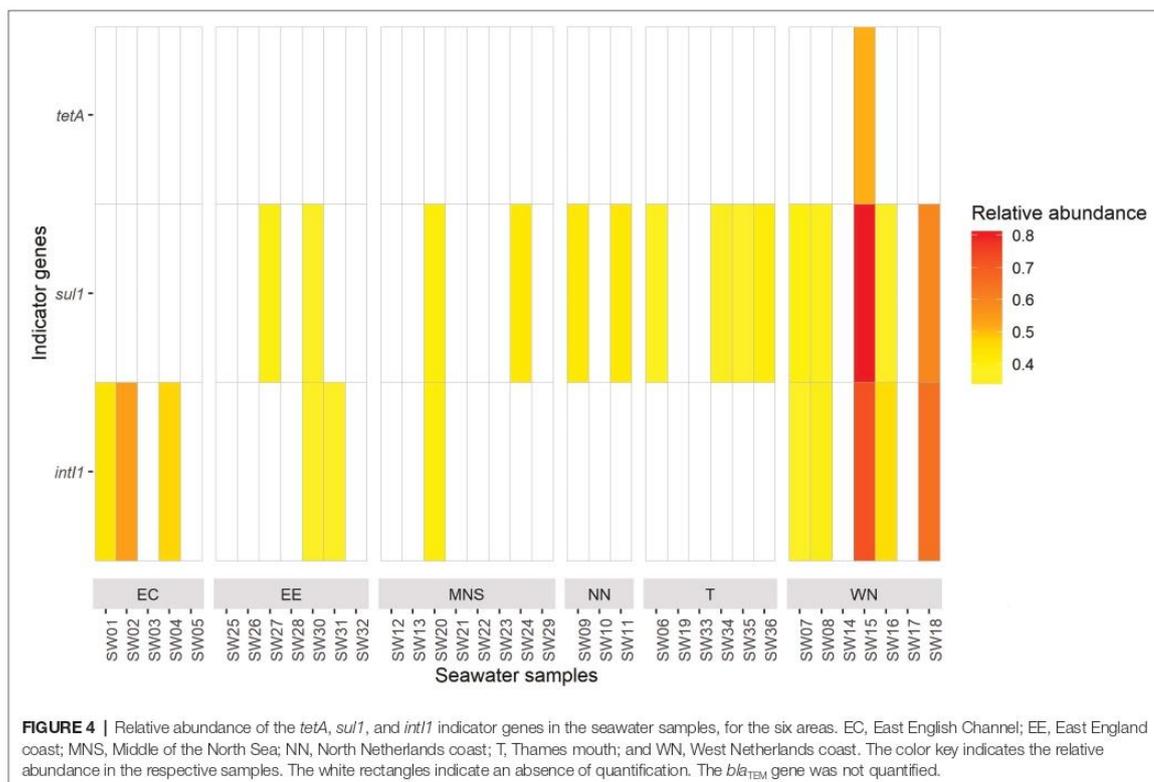


abundance of the *intI1* gene was strongly and positively correlated with the *sulI* gene ($r=0.94$, $p=0.000$; **Figure 5**). Moreover, the absolute abundance of the *intI1* gene was positively and highly correlated with the dissolved oxygen concentration ($r=0.66$, $p=0.003$) and very highly with the turbidity values ($r=0.84$, $p=0.000$). We also observed a moderate correlation between the *sulI* gene abundance and the dissolved oxygen concentration ($r=0.46$, $p=0.030$) and a high correlation between this gene and the turbidity values ($r=0.75$, $p=0.001$). A low positive correlation was observed between the absolute abundance of these genes and the pH values (r values of approximately 0.30). In contrast, the absolute abundances of the *sulI* and *intI1* genes were low and moderately negatively correlated with salinity values, with r values of -0.27 and -0.44 and value of p 0.030 and 0.005, respectively. Furthermore, we observed low positive correlation between these two genes and the temperature, algal biomass and pressure values, with r coefficients ranging from 0.02 to 0.21. Regarding the *tuf* gene, which estimates the bacterial concentration in the seawater samples, we observed a very

high positive correlation with the dissolved oxygen concentration ($r=0.81$, $p=0.000$) and moderate correlations with the turbidity ($r=0.59$, $p=0.001$) and the algal biomass values ($r=0.48$). Moderate negative correlations were observed with the pH ($r=-0.51$, $p=0.001$) and temperature values ($r=-0.51$, $p=0.000$), and highly negative correlations with salinity ($r=-0.76$, $p=0.000$) and pressure values ($r=-0.65$, $p=0.000$). In addition, the *tuf* gene abundance was slightly and positively correlated with the abundance of the *sulI* and *intI1* genes ($r=0.34$ and 0.40, respectively).

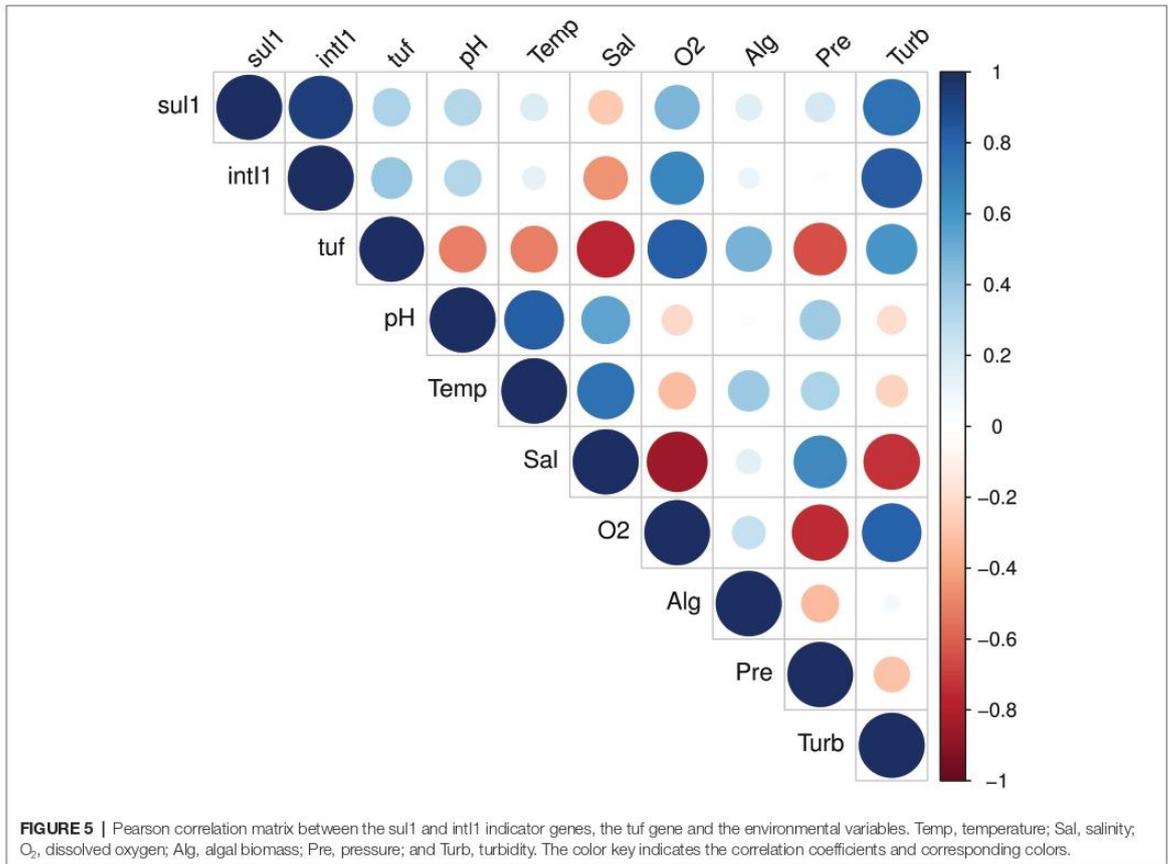
DISCUSSION

This study provided for the first time information on the presence of indicator genes of antimicrobial resistance contamination in the North Sea and English Channel seawaters. We detected at least one of the indicator gene in 52.78% of the samples, two indicator genes in 19.44% of the samples and three indicator genes in 2.78% of the samples analyzed. In contrast, the four



indicator genes were not detected in a same seawater sample. The *bla_{TEM}* gene encoding resistance to β -lactam was not detected in any sample, and the *tetA* gene encoding resistance to tetracycline was quantified in only one sample. Their presence in the marine environment, in *E. coli* strains isolated from coastal marine waters, has been demonstrated in Portugal (Alves et al., 2014). In this study, it is possible that the two *tetA* and *bla_{TEM}* genes were not present or present below the limit of quantification because the marine environment is a diluted medium. The filtration of a larger volume of seawater could confirm or not this hypothesis. In addition, gene quantification in environmental matrix such as seawater may be affected by the presence of PCR inhibitors. Inhibitory substances such as polyphenols, humic and folic acids or glycogen have been isolated from the marine environment and are known to be one of the most common causes of qPCR failure (Schrader et al., 2012). In contrast, the *sul1* and *int11* genes were the most abundant in this study, in 42% and 31% of the seawater samples, respectively. Co-occurrence of these two genes was observed in 19% of the samples, and the correlation analysis carried out also illustrated a strong correlation between the *sul1* and *int11* genes. The *sul1* gene was present alone in 53% of the samples (without *int11*), and by contrast, *int11* was present in 36% of the samples without the *sul1* gene. These observations were also reported in multidrug resistant isolates from river systems in India, where 72.6% of the strains had at least one integron with the *sul1* gene and

8.26% had the *sul1* gene but not the *int11* gene (Chaturvedi et al., 2021). Indeed, class 1 integrons are composed of a 5' conserved region with the *int11* gene and a 3' conserved region with a sulfonamide resistance gene (such as *sul1*), between which one or more ARG-containing cassettes can be inserted. But other genes encoding for sulfonamide resistance can be identified instead of *sul1* within these structures, such as the *sul2* and *sul3* genes (Jones-Dias et al., 2016), which could explain the high prevalence of the *sul1* gene without *int11*. The integrons are mainly found in Gram-negative bacteria (such as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, and *Campylobacter*), whether they are environmental or clinical isolates and may carry acquired resistance genes, thus constituting a human health risk. The abundance of the *sul1* and *int11* genes was highly correlated with the dissolved oxygen concentration and turbidity, which exhibits suspended particulate matters such as microorganisms or particles in suspension where microorganisms aggregate. Similarly, Tao et al. (2016) showed that dissolved oxygen could be an important factor in ARGs selection in wastewater treatment systems, affecting the microbial communities that may be carriers of these resistances. A recent study on the occurrence of ARGs in an estuary in China also showed a correlation between turbidity and ARGs, with a higher prevalence of these genes in areas with high turbidity (Chen et al., 2020). To assess the contribution of the microbial population in the dissemination of ARGs in the marine environment,



we quantified the bacterial housekeeping *tuf* gene to estimate the concentration of bacteria and to calculate the relative abundance of indicator genes. Indeed, we targeted the *tuf* gene rather than the 16S rRNA gene, since it has been shown that the 16S rRNA gene has similarities with the 18S eukaryotic mitochondria gene, which can therefore interfere with the quantification of bacterial DNA in complex samples (Nakano, 2018). The analysis of the correlation between the *sul1*, *int1* genes, and the bacterial *tuf* gene showed a slight correlation between the abundance of the two contamination indicators and the estimated microbial population. This may demonstrate that the indicator genes quantified in this study are not only found in bacteria targeted by the *tuf* gene, but also as free DNA in water or in association with bacteriophages, as has already been shown (Calero-Cáceres and Balcázar, 2019; Sivalingam et al., 2020). This assumption was corroborated with the relative abundance results, which were similar to the absolute abundances. We demonstrated a strong correlation between the microbial population and dissolved oxygen, which could reflect the presence of bacteria that thrive in aerobic environments such as close to the sea surface. As well, we demonstrated a correlation between the microbial population and the turbidity.

We have observed that slight pressure and pH variations in seawater did not affect the abundance of the *sul1* and *int1* genes, but only the microbial population. Currently, it has been shown that pH did not influence the occurrence of ARGs in seawater but only in marine sediments (Chen et al., 2020) and in river sediments (Ergie et al., 2019). Other abiotic factors in the environment can also exert selection pressure, playing a role in the maintenance and proliferation of antimicrobial resistances. Indeed, it has been demonstrated that environmental bacteria can be exposed to selection pressure by antibiotic residues (natural origin or brought by various anthropogenic sources), and thus develop resistance (Larsson, 2014). The occurrence of indicator genes in seawater samples diverged according to the geographical area considered, i.e., the type of anthropogenic impact but, given the limited data on English Channel and North Sea areas, several hypotheses can be advanced considering the geographical location of the samples. High abundance of the three *tetA*, *sul1*, and *int1* genes was noticed in the West of the Netherlands. Certain factors could explain this abundance such as human wastewater originating from the man-made structures in this area and the animals (fish, mammals, and seabirds) contaminated by ARGs and ARB. These

man-made structures refer to the diverse offshore installations present in the North Sea, including platforms for gas and oil exploitation. The various human discharges from these structures could constitute an additional impact on the dissemination of ARGs in the marine environment, but to our knowledge, no study has been conducted on the wastewater decontamination treatment efficiency of these structures for the removal of biological contaminants such as ARB and ARGs. High abundance of the *sul1* and *int11* genes (approximately $3 \log \text{copies.ml}^{-1}$) was also observed slightly further south, where the North Sea receives river water from the North Sea Canal. This canal is subject to various anthropogenic discharges, notably from Amsterdam and its port. It is now recognized that river waters are contaminated with various pollutants, including ARGs, which are not fully removed in wastewater treatment plants and are disseminated in the downstream environment (Zhang et al., 2009). Furthermore, three offshore wind farms are also visible in this area not far from the coast, potentially constituting an additional impact on the presence of ARGs. Indeed, more than 120 offshore wind platforms have been constructed in Europe over the last years, the majority of which are in the North Sea (WindEurope, 2019). A study in the North Sea has shown that offshore wind farms attract certain bird species, such as black-backed and herring gulls (Vanermen et al., 2014), and gull feces have been consistently shown to be a source of ARG contamination. In Portugal, *E. coli* strains carrying different *bla*, *sul*, and *tet* genes have been isolated from seagull feces (Poeta et al., 2008). This reveals a potential involvement of contaminated gull feces in the pollution of marine environment by ARGs. The *sul1* and *int11* genes were also found even further south, near the mouths of the Rhine and Meuse rivers, two large rivers flowing into the North Sea. In a recent study, these two genes were quantified along the entire length of the Rhine in Switzerland, Germany and the Netherlands at different concentrations (Paulus et al., 2020). The authors showed that the presence and concentration of ARGs and *int11* fluctuated greatly between different sampling points, but that the concentration of the *sul1* and *int11* genes was highest in two areas polluted by well-developed pharmaceutical industries and downstream, in Lower Rhine. The impact of these river effluents on pollution in the North Sea is cumulative with the impact of the city and the port of Rotterdam, the largest seaport in Europe. The port of Rotterdam is characterized by a high maritime traffic (more than 30,000 ships call at this port each year) and by large industrial areas composed of oil refineries and chemical industries, but there is no information about the contamination by ARGs of port activity effluents. In the East of England, the *sul1* and *int11* genes were quantified in the same seawater sample, collected south of the Humber estuary. This marine estuary is the largest source of freshwater that England discharges into the North Sea. A study in these estuarine waters identified *V. parahaemolyticus* strains resistant to various antibiotics (kanamycin, gentamicin, cefazolin, tetracycline; Daramola et al., 2009), indicating a potential source of ARGs in this estuary. In addition, this area includes several nearby wind farms, as well as various ports upstream of the Humber Estuary (Port of Hull, Green Port Hull, Immingham). Finally,

the *sul1* and *int11* genes were poorly quantified in the MNS (2/8 and 1/8 samples from this area, respectively). This area, unlike the others, is quite far from the coasts and thus from their influence, but has a concentration of offshore platforms for gas and oil exploitation (Fujii, 2015). However, we have quantified the *sul1* and *int11* genes in seawater samples collected far from the coast, in areas that could be described as subject to little anthropogenic impact. This spreading of genes within the marine environment may raise questions about the involvement of intense maritime traffic and their various discharges, such as ballast water, which is pumped out and discharged into the sea. Few studies have been conducted on the contamination of these ballast waters by ARB and ARGs, and their dissemination in marine waters, but it has been estimated that approximately 10^{19} bacteria are transported worldwide each day in ship ballast water (Brinkmeyer, 2016). In addition, a recent study demonstrated the presence of the *sul1* and *int11* genes at high concentrations (between 10^3 and 10^8 gene copies per 100 ml of water) in ballast waters in two ports in China, from ships coming from all over the world (Australia, Japan, Europe, Korea, Asia, South America; Lv et al., 2020). The replacement of water in tanks occurs at the shoreline, but also in open seawaters, potentially creating long-range dispersion of contaminants. In addition to this ballast waters, we must also consider the impact of wastewater discharges from boats, such as black water (wastewater from bathrooms and toilets) and gray water (wastewater from sinks, washing machines, and bathtubs). Traces of antibiotic residues have been detected in these types of water, such as sulfamethoxazole (from the sulfonamide family), in cruise ships in the port of Hamburg, Germany (Westhof et al., 2016), which can exert a selection pressure on the surrounding bacteria and induce the appearance of antimicrobial resistant strains. In the English Channel, only the *int11* gene has been quantified. In this area, we observed a higher abundance in the sample collected near Le Havre, the second-largest port in France for maritime traffic and the fifth-largest European port for container traffic, located at the Seine mouth. A study has also exhibited the presence of the *int11* gene in this river, which is the final destination of effluents from 16 wastewater treatment plants (Laroche et al., 2009). This gene was detected in *E. coli* isolates all along the Seine (France), with a higher prevalence in the mouth of the estuary near Tancarville (France) and Honfleur (France), two cities located just next to Le Havre (France). The English Channel is considered a "highway of the sea," with around 800 boats sailing through these waters every day (Amara, 2010). By contrast, a little further north at the mouth of the Thames (England) and in northern France, only the *sul1* gene has been quantified. This area is subject to discharges from the Thames (England), a 346 km long river that is itself subject to numerous effluents. Several studies have reported that these waters are polluted, particularly by antibiotic residues and ARGs. For example, White et al. (2019) detected three sulfonamide antibiotics (sulfadiazine, sulfamethoxazole, and sulfanilamide) along the Thames River (England) up to the mouth after seven wastewater treatment plants, potentially exerting selection pressure on bacteria and leading to sulfonamide-resistant strains. In addition, the *bla*_{TEM}

tetA, *sul1*, and *intI1* genes were quantified in these waters at 10^6 – 10^8 copies.L⁻¹ of water (Xu et al., 2019). The sample with the highest *sul1* gene abundance in this area was collected near the French coast, around Calais. This area is subject to the passage of many passenger ships, which connect the city of Calais (France) to Dover (England). The occurrence of the *sul1* gene has also been demonstrated in the north of the Netherlands, away from the coast, distinguished by the presence of an offshore wind farm. All of these man-made constructions (oil and gas platforms, offshore wind farms) and effluents (rivers, streams, sewage and ballast water from ships) are therefore potential sources of contamination of marine waters by ARGs.

CONCLUSION

We have shown for the first time that the seawaters of the English Channel and the North Sea were contaminated with ARGs and MGEs. The marine environment is very complex to study, due to many potential sources of contamination such as different effluents, intense maritime traffic and man-made structures in addition to the impact of environmental conditions on their prevalence and maintenance in the environment, which have been understudied. We believed that the *sul1* and *intI1* genes would be suitable contamination indicators to assess the state of antimicrobial resistance in marine environment, but that other ARGs should be monitored in conjunction with these two genes, such as the *tetM* and *bla*_{CTX-M} genes, also proposed as indicator genes by Berendonk et al. (2015). In addition to seawater analysis, other matrices should be considered such as plankton, fish and bivalve mollusks to characterize the transmission and dissemination of ARGs along marine food webs up to us, final consumers. Indeed, the monitoring of antimicrobial resistance in the marine environment is an important issue, representing a risk to human health, especially through the consumption of fishery products contaminated by antimicrobial-resistant pathogenic bacteria, which can lead to therapeutic failures in case of infection.

REFERENCES

- Alves, M. S., Pereira, A., Araújo, S. M., Castro, B. B., Correia, A. C., and Henriques, I. (2014). Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Front. Microbiol.* 5:426. doi: 10.3389/fmicb.2014.00426
- Amara, R. (2010). Impact de l'anthropisation sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes marins. Exemple de la Manche-mer du nord. *Vertigo* 8. doi: 10.4000/vertigo.10129
- ANSES (2020). Antibiorésistance et environnement. État et causes possibles de la contamination des milieux en France (saisine n°2016-SA-0252). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. (Maisons-Alfort). Available at: <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf>
- Barkovskii, A., Thomas, M., Hurley, D., and Teems, C. (2012). Environmental factors responsible for the incidence of antibiotic resistance genes in pristine *Crassostrea virginica* reefs. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2692–2698. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.10.006

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**; further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EB designed the study, performed the analysis and interpretation of the results, and drafted the manuscript. DC participated in the design of the study, performed the experiments, and contributed to the manuscript writing. TB participated in the design of the study and contributed to the manuscript writing. CB contributed to the manuscript writing. GM participated in the design of the study and contributed to the manuscript writing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by a doctoral fellowship from Région Hauts-de-France and Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale. The Structure Fédérative de Recherche (SFR) Campus de la Mer has also financially supported this work.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Ifremer institute for allowing us to be part of the IBTS oceanographic campaign to collect the seawater samples analyzed in this study and for giving us access to the various environmental data.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.883081/full#supplementary-material>

- Barraud, O., Baclet, M. C., Denis, F., and Ploy, M. C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1642–1645. doi: 10.1093/jac/dkq167
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 310–317. doi: 10.1038/nrmicro3439
- Bibbal, D., Dupouy, V., Ferré, J. P., Toutain, P. L., Fayet, O., Prère, M. F., et al. (2007). Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in *Enterobacteriaceae* and excretion of *bla*_{TEM} genes in swine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4785–4790. doi: 10.1128/AEM.00252-07
- Briet, A., Helsen, N., Delannoy, S., Debuiche, S., Brisabois, A., Midelet, G., et al. (2018). NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2578–2579. doi: 10.1093/jac/dky200
- Brinkmeyer, R. (2016). Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing. *Mar. Pollut. Bull.* 107, 277–285. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.058

- Calero-Cáceres, W., and Balcázar, J. L. (2019). Antibiotic resistance genes in bacteriophages from diverse marine habitats. *Sci. Total Environ.* 654, 452–455. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.166
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., and Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environ. Pollut.* 223, 384–394. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.035
- Chaturvedi, P., Singh, A., Chowdhary, P., Pandey, A., and Gupta, P. (2021). Occurrence of emerging sulfonamide resistance (*sul1* and *sul2*) associated with mobile integrons-integrase (*int11* and *int12*) in riverine systems. *Sci. Total Environ.* 751:142217. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142217
- Chen, Y.-R., Guo, X.-P., Niu, Z.-S., Lu, D.-P., Sun, X.-L., Zhao, S., et al. (2020). Antibiotic resistance genes (ARGs) and their associated environmental factors in the Yangtze estuary, China: from inlet to outlet. *Mar. Pollut. Bull.* 158:111360. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111360
- Chen, J., Su, Z., Tianjiao, D., Huang, B., Mu, Q., Zhang, Y., et al. (2019). Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the sediments of the East China Sea bays. *J. Environ. Sci.* 81, 156–167. doi: 10.1016/j.jes.2019.01.016
- Daramola, B. A., Williams, R., and Dixon, R. A. (2009). In vitro antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources in northern England. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 499–500. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.06.015
- Ergie, A. A., Leng, Y., and Wang, J. (2019). Antibiotics and resistance genes in awash river basin, Ethiopia. *EcoHealth* 16, 441–453. doi: 10.1007/s10393-019-01431-5
- Fujii, T. (2015). Temporal variation in environmental conditions and the structure of fish assemblages around an offshore oil platform in the North Sea. *Mar. Environ. Res.* 108, 69–82. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.03.013
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., and Zhu, Y.-G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269–1279. doi: 10.1038/ismej.2014.226
- Heuer, H., and Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* 9, 657–666. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Barreiro, P., Vieira, L., Moura, I. B., et al. (2016). Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from gram negative bacteria recovered among fruits and vegetables. *Front. Microbiol.* 7:1400. doi: 10.3389/fmicb.2016.01400
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., and Petit, F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 118–130. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00655.x
- Larsson, D. G. J. (2014). Antibiotics in the environment. *Ups. J. Med. Sci.* 119, 108–112. doi: 10.3109/03009734.2014.896438
- Lazard, C., Verin, Y., and Auber, A. (2021). International Bottom Trawl Survey (IBTS2021-Q1)-French cruise report. doi: 10.17600/18000570
- Leonard, A. F. C., Zhang, L., Balfour, A. J., Garside, R., Hawkey, P. M., Murray, A. K., et al. (2018). Exposure to and colonization by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (beach bum survey). *Environ. Int.* 114, 326–333. doi: 10.1016/j.envint.2017.11.003
- Lv, B., Cui, Y., Tian, W., Wei, H., Chen, Q., Liu, B., et al. (2020). Vessel transport of antibiotic resistance genes across oceans and its implications for ballast water management. *Chemosphere* 253:126697. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126697
- Nakano, M. (2018). 16S rRNA gene primer validation for bacterial diversity analysis of vegetable products. *J. Food Prot.* 81, 848–859. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-346
- Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., and Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes* 15, 209–215. doi: 10.1006/mcpr.2001.0363
- Paulus, G. K., Hornstra, L. M., and Medema, G. (2020). International temporal study of antibiotic resistance genes across the Rhine river using newly developed multiplex qPCR assays. *Sci. Total Environ.* 706:135733. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135733
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., and Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems: a review. *Sci. Total Environ.* 697:134023. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134023
- Poeta, P., Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Carvalho, C., Rodrigues, J., et al. (2008). Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7439–7441. doi: 10.1128/AEM.00949-08
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., et al. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* 69, 234–242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerböck, L., and Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Sivalingam, P., Poté, J., and Prabakar, K. (2020). Extracellular DNA (eDNA): neglected and potential sources of antibiotic resistant genes (ARGs) in the aquatic environments. *Pathogens* 9:874. doi: 10.3390/pathogens9110874
- Su, H., Hu, X., Wang, L., Xu, W., Xu, Y., Wen, G., et al. (2020a). Contamination of antibiotic resistance genes (ARGs) in a typical marine aquaculture farm: source tracking of ARGs in reared aquatic organisms. *J. Environ. Sci. Health B* 55, 220–229. doi: 10.1080/03601234.2019.1684747
- Su, Z., Li, A., Chen, J., Huang, B., Mu, Q., Chen, L., et al. (2020b). Wastewater discharge drives ARGs spread in the coastal area: a case study in Hangzhou Bay, China. *Mar. Pollut. Bull.* 151:110856. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.110856
- Tanaka, Y., Takahashi, H., Simidu, U., and Kimura, B. (2010). Design of a new universal real-time PCR system targeting the *tuf* gene for the enumeration of bacterial counts in food. *J. Food Prot.* 73, 670–679. doi: 10.4315/0362-028X-73.4.670
- Tao, W., Zhang, X.-X., Zhao, F., Huang, K., Ma, H., Wang, Z., et al. (2016). High levels of antibiotic resistance genes and their correlations with bacterial community and mobile genetic elements in pharmaceutical wastewater treatment bioreactors. *PLoS One* 11:e0156854. doi: 10.1371/journal.pone.0156854
- Uyaguari, M. I., Scott, G. I., and Norman, R. S. (2013). Abundance of class 1-3 integrons in South Carolina estuarine ecosystems under high and low levels of anthropogenic influence. *Mar. Pollut. Bull.* 76, 77–84. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.09.027
- Vanermen, N., Onkelinx, T., Courtens, W., Walle, M., Verstraete, H., and Stienen, E. (2014). Seabird avoidance and attraction at an offshore wind farm in the Belgian part of the North Sea. *Hydrobiologia* 756, 51–61. doi: 10.1007/s10750-014-2088-x
- Westhof, L., Köster, S., and Reich, M. (2016). Occurrence of micropollutants in the wastewater streams of cruise ships. *Emerg. Contam.* 2, 178–184. doi: 10.1016/j.emcon.2016.10.001
- White, D., Lapworth, D. J., Civil, W., and Williams, P. (2019). Tracking changes in the occurrence and source of pharmaceuticals within the river Thames, UK; from source to sea. *Environ. Pollut.* 249, 257–266. doi: 10.1016/j.envpol.2019.03.015
- WindEurope (2019). European Offshore Wind Farms Map Public [Online]. Available at: <https://windeurope.org/> (Accessed March 02, 2022).
- Xu, L., Chen, H., Canales, M., and Ciric, L. (2019). Use of synthesized double-stranded gene fragments as qPCR standards for the quantification of antibiotic resistance genes. *J. Microbiol. Methods* 164:105670. doi: 10.1016/j.mimet.2019.105670
- Zhang, X. X., Zhang, T., and Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 397–414. doi: 10.1007/s00253-008-1829-z

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

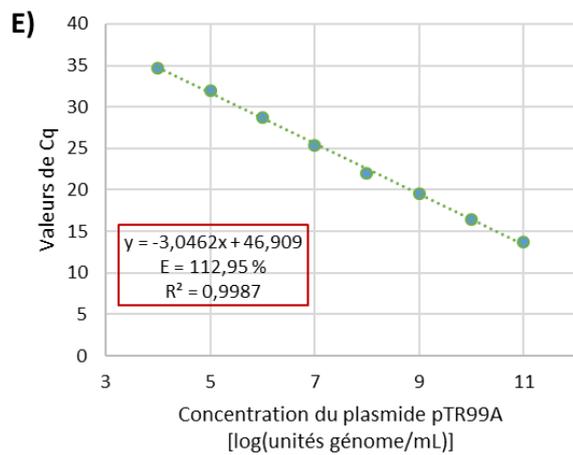
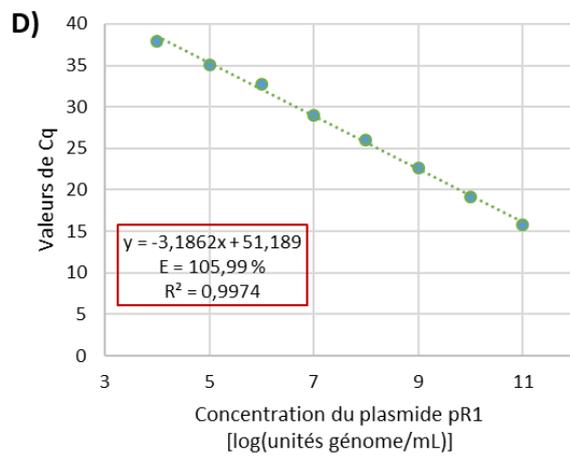
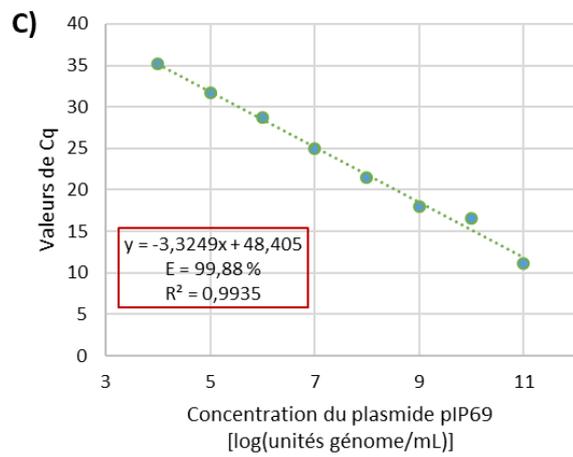
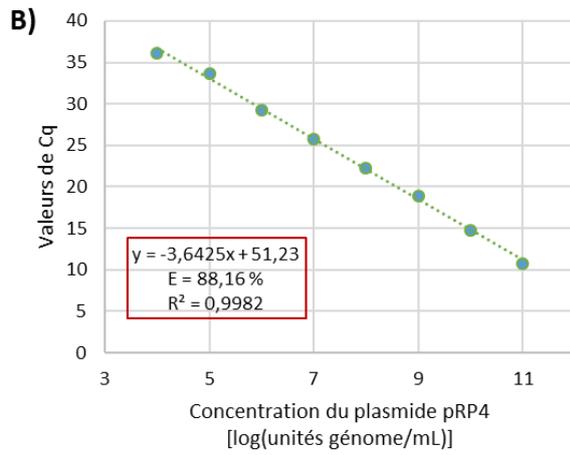
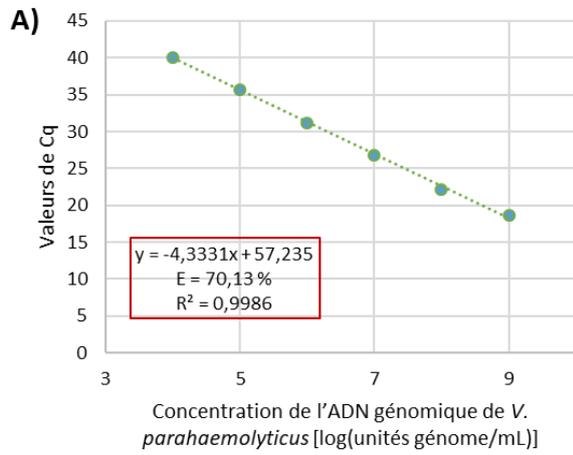
Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Bourdonnais, Colcanap, Le Bris, Brauge and Middel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

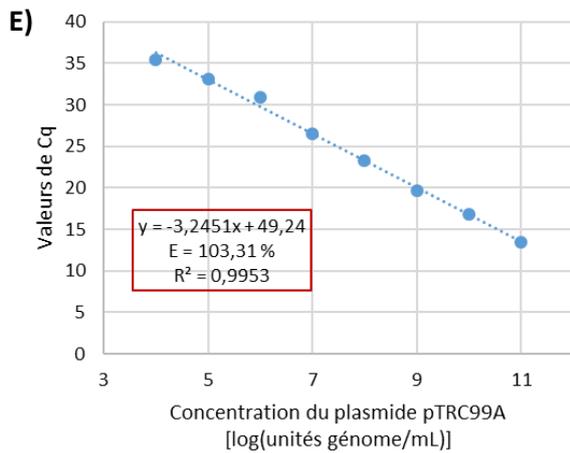
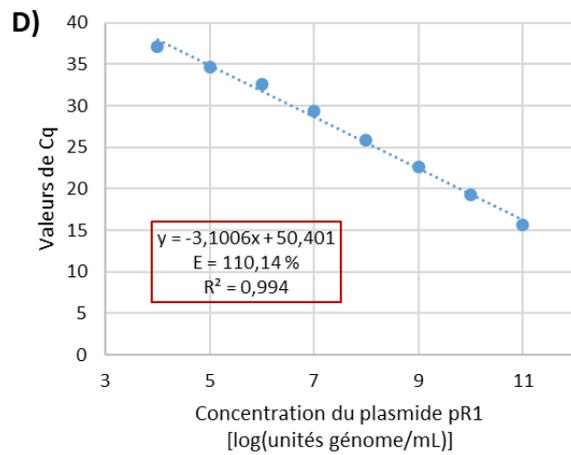
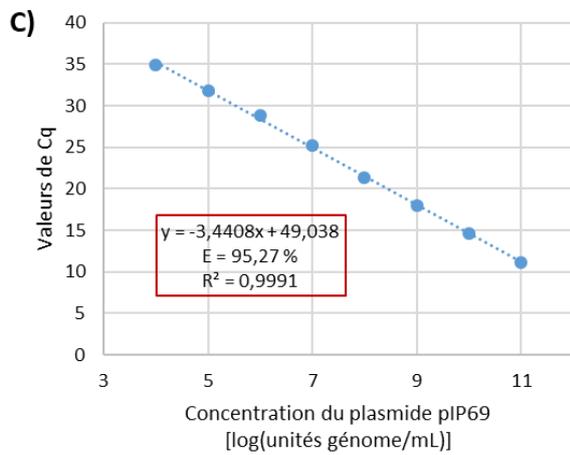
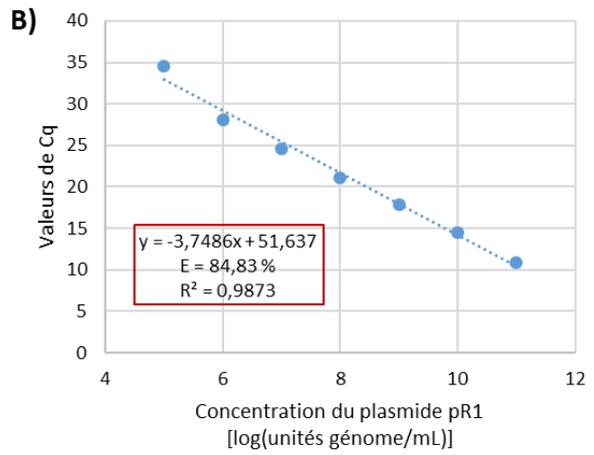
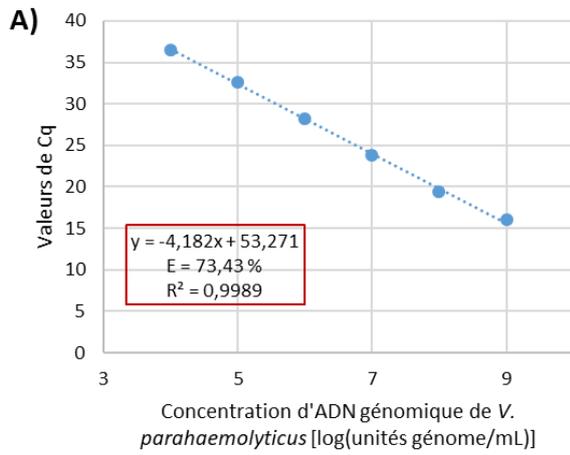
Annexe VI : Informations sur la date de prélèvement et la localisation des sites de prélèvements des échantillons d'eau de mer collectés lors de la campagne océanographique IBTS 2020. CEA : Côte Est de l'Angleterre ; CMN : Centre de la Mer du Nord ; CNP : Côte du Nord des Pays-Bas ; COP : Côte Ouest des Pays-Bas ; ET : Embouchure de la Tamise ; ME : Manche Est.

Echantillon	Station de prélèvement	Zone définie	Coordonnées géographiques (degrés décimaux)		Date de prélèvement
			Latitude	Longitude	
EM01	Y0003	ME	50,3067	1,1839	10/01/2020
EM02	Y0015	ME	49,6152	0,0511	11/01/2020
EM03	Y0021	ME	50,5486	0,3873	12/01/2020
EM04	Y0023	ME	50,3732	0,7286	12/01/2020
EM05	Y0033	ME	50,8696	1,3508	13/01/2020
EM06	Y0040	ET	51,3138	2,0590	14/01/2020
EM07	Y0049	COP	51,8276	3,4384	15/01/2020
EM08	Y0050	COP	52,2477	3,9296	15/01/2020
EM09	Y0058	CNP	53,8983	5,7165	16/01/2020
EM10	Y0060	CNP	54,2316	6,4616	16/01/2020
EM11	Y0067	CNP	54,1464	5,1945	17/01/2020
EM12	Y0068	CMN	54,3624	4,7137	17/01/2020
EM13	Y0069	CMN	53,8822	4,7240	17/01/2020
EM14	Y0076	COP	53,2507	4,2007	18/01/2020
EM15	Y0077	COP	53,1740	3,7456	18/01/2020
EM16	Y0078	COP	52,7396	3,5006	18/01/2020
EM17	Y0083	COP	52,7117	4,0285	19/01/2020
EM18	Y0084	COP	52,3353	4,4228	19/01/2020
EM19	Y0089	ET	52,3680	2,6702	21/01/2020
EM20	Y0090	CMN	52,5935	2,4504	21/01/2020
EM21	Y0099	CMN	53,5416	3,2402	22/01/2020
EM22	Y0100	CMN	53,4435	2,8635	22/01/2020
EM23	Y0102	CMN	53,5773	2,2267	22/01/2020
EM24	Y0110	CMN	54,4035	1,1726	23/01/2020
EM25	Y0111	CEA	54,3555	0,7000	23/01/2020
EM26	Y0112	CEA	54,6031	0,6727	23/01/2020
EM27	Y0119	CEA	53,9273	0,2652	24/01/2020
EM28	Y0121	CEA	54,4963	-0,1233	24/01/2020
EM29	Y0128	CMN	53,9318	1,2981	25/01/2020
EM30	Y0130	CEA	53,5108	0,6822	25/01/2020
EM31	Y0139	CEA	53,1471	1,7777	26/01/2020
EM32	Y0140	CEA	52,9397	1,8490	26/01/2020
EM33	Y0148	ET	52,2710	1,8972	27/01/2020
EM34	Y0150	ET	51,9603	1,8311	27/01/2020
EM35	Y0159	ET	51,6541	2,1822	28/01/2020
EM36	Y0168	ET	51,0960	1,8337	29/01/2020

Annexe VII : Courbes standard des réactions de qPCR réalisées pour l'analyse des échantillons d'eaux fluviales et côtières ciblant les gènes *tuf* (A), *tetA* (B), *bla_{TEM}* (C), *sul1* (D) et *int11* (E).



Annexe VIII : Courbes standard des réactions de qPCR réalisées pour l'analyse des échantillons d'eau de mer de la campagne IBTS 2020 ciblant les gènes *tuf* (A), *tetA* (B), *bla*_{TEM} (C), *sul1* (D) et *int11* (E).



Annexe IX : Informations sur les prélèvements de phytoplancton (PH01 à PH16) et de zooplancton (ZO01 à ZO16) de la campagne océanographique IBTS 2020. CEA : Côte Est Angleterre ; CMN : Centre Mer du Nord ; CNP : Côte du Nord des Pays-Bas ; COP : Côte Ouest des Pays-Bas ; ET : Embouchure Tamise ; ME : Manche Est.

Echantillons	Stations de prélèvement	Zones définies	Coordonnées géographiques (degrés décimaux)		Dates de prélèvements
			Latitude	Longitude	
PH01 ZO01	Y0003	ME	50,3067	1,1839	10/01/2020
PH02 ZO02	Y0031	ME	50,5841	1,4388	13/01/2020
PH03 ZO03	Y0089	ET	52,3680	2,6702	21/01/2020
PH04 ZO04	Y0090	CMN	52,5935	2,4504	21/01/2020
PH05 ZO05	Y0110	CMN	54,4035	1,1726	23/01/2020
PH06 ZO06	Y0102	CMN	53,5773	2,2267	22/01/2020
PH07 ZO07	Y0050	COP	52,2477	3,9296	15/01/2020
PH08 ZO08	Y0077	COP	53,1740	3,7456	18/01/2020
PH09 ZO09	Y0058	CNP	53,8983	5,7165	16/01/2020
PH10 ZO10	Y0060	CNP	54,2316	6,4616	16/01/2020
PH11 ZO11	Y0121	CEA	54,4963	-0,1233	24/01/2020
PH12 ZO12	Y0130	CEA	53,5108	0,6822	25/01/2020
PH13 ZO13	Y0140	CEA	52,9397	1,8490	26/01/2020
PH14 ZO14	Y0150	ET	51,9603	1,8311	27/01/2020
PH15 ZO15	Y0168	ET	51,0960	1,8337	29/01/2020
PH16 ZO16	Y0179	ME	50,3629	0,6195	30/01/2020

Annexe X : Informations sur les prélèvements de chair de mollusques bivalves (CH01 à CH04) de la campagne océanographique IBTS 2020 dans la Manche Est (ME).

Echantillons	Stations de prélèvement	Profondeurs (m)	Zones définies	Coordonnées géographiques (degrés décimaux)		Dates de prélèvements
				Latitude	Longitude	
CH01	Y0013	34,07	ME	49,8456	0,2039	11/01/2020
CH02	Y0177	29,52	ME	50,1501	0,9312	30/01/2020
CH03	Y0021	49,43	ME	50,5486	0,3873	12/01/2020
CH04	Y0031	26,53	ME	50,5841	1,4388	13/01/2020

Annexe XI : Informations sur les prélèvements de poissons plats (PO01 à PO35) de la campagne océanographique IBTS 2020. Chaque échantillon de poisson plat correspond à un prélèvement de peau, des branchies et des viscères. CEA : Côte Est Angleterre ; CMN : Centre Mer du Nord ; CNP : Côte du Nord des Pays-Bas ; COP : Côte Ouest des Pays-Bas ; ET : Embouchure Tamise ; ME : Manche Est.

Echantillons	Stations de prélèvements	Profondeurs (m)	Zones définies	Coordonnées géographiques (degrés décimaux)		Dates de prélèvements
				Latitude	Longitude	
PO01	Y0002	31,98	ME	50,4810	1,4452	10/01/2020
PO02	Y0015	23,80	ME	49,6152	0,0511	11/01/2020
PO03	Y0021	49,43	ME	50,5486	0,3873	12/01/2020
PO04	Y0038	31,75	ET	51,1159	2,0943	14/01/2020
PO05	Y0049	30,04	COP	51,8276	3,4384	15/01/2020
PO06	Y0148	25,99	ET	52,2710	1,8972	27/01/2020
PO07	Y0149	41,58	ET	52,2738	2,2049	27/01/2020
PO08	Y0150	35,35	ET	51,9603	1,8311	27/01/2020
PO09	Y0158	38,68	ET	51,6148	2,5352	28/01/2020
PO10	Y0050	25,11	COP	52,2477	3,9296	15/01/2020
PO11	Y0059	28,82	CNP	53,9242	6,3091	16/01/2020
PO12	Y0060	37,85	CNP	54,2316	6,4616	16/01/2020
PO13	Y0067	41,37	CNP	54,1464	5,1945	17/01/2020
PO14	Y0068	47,18	CMN	54,3624	4,7137	17/01/2020
PO15	Y0069	41,28	CMN	53,8822	4,7240	17/01/2020
PO16	Y0076	30,52	COP	53,2507	4,2007	18/01/2020
PO17	Y0077	28,28	COP	53,1740	3,7456	18/01/2020
PO18	Y0078	26,44	COP	52,7396	3,5006	18/01/2020
PO19	Y0083	27,88	COP	52,7117	4,0285	19/01/2020
PO20	Y0084	18,76	COP	52,3353	4,4228	19/01/2020
PO21	Y0090	52,12	CMN	52,5935	2,4504	21/01/2020
PO22	Y0099	35,13	CMN	53,5416	3,2402	22/01/2020
PO23	Y0101	31,70	CMN	53,3579	2,4485	22/01/2020
PO24	Y0102	17,33	CMN	53,5773	2,2267	22/01/2020
PO25	Y0109	66,61	CMN	54,1874	1,3673	23/01/2020
PO26	Y0111	64,66	CEA	54,3554	0,7000	23/01/2020
PO27	Y0112	68,79	CEA	54,6031	0,6727	23/01/2020
PO28	Y0119	50,46	CEA	53,9273	0,2652	24/01/2020
PO29	Y0121	61,10	CEA	54,4963	-0,1233	24/01/2020
PO30	Y0137	36,33	CMN	53,5703	1,7251	26/01/2020
PO31	Y0138	30,04	CEA	53,4696	1,5866	26/01/2020
PO32	Y0140	32,21	CEA	52,9397	1,8490	26/01/2020
PO33	Y0168	29,52	ET	51,0960	1,8337	29/01/2020
PO34	Y0179	45,59	ME	50,3629	0,6195	30/01/2020
PO35	Y0184	27,16	ME	50,9851	1,0938	31/01/2020

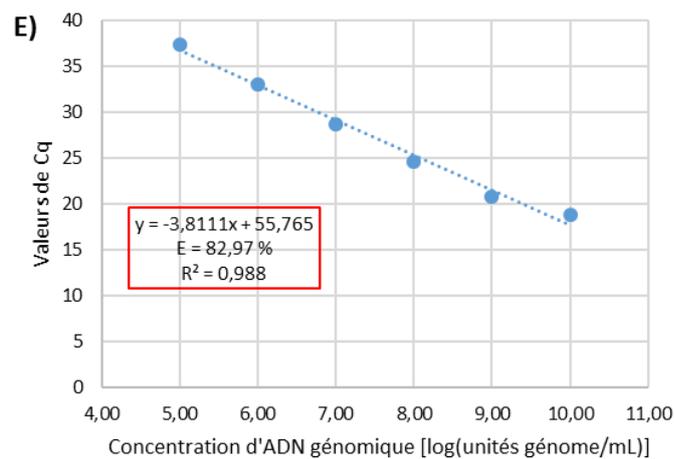
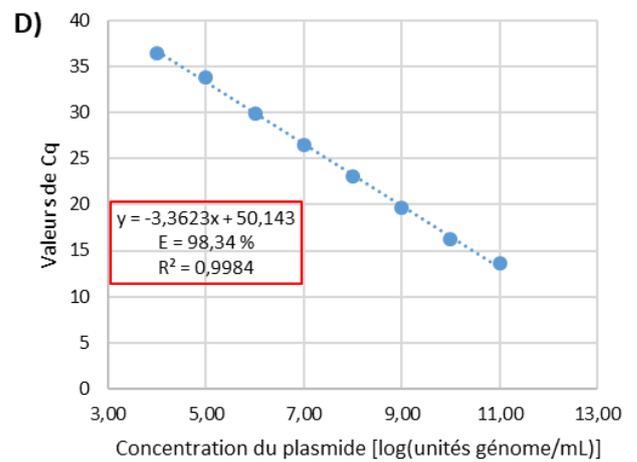
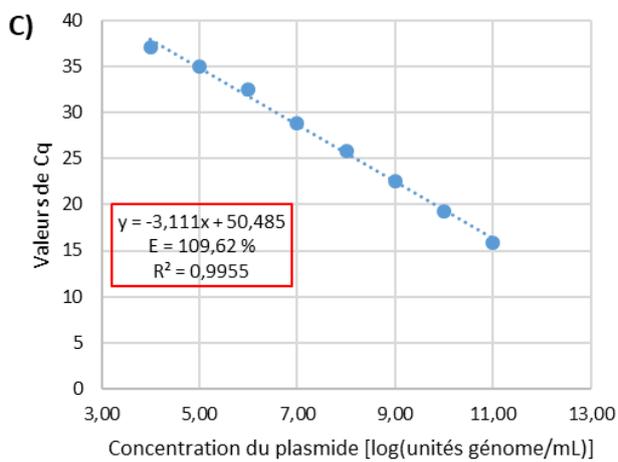
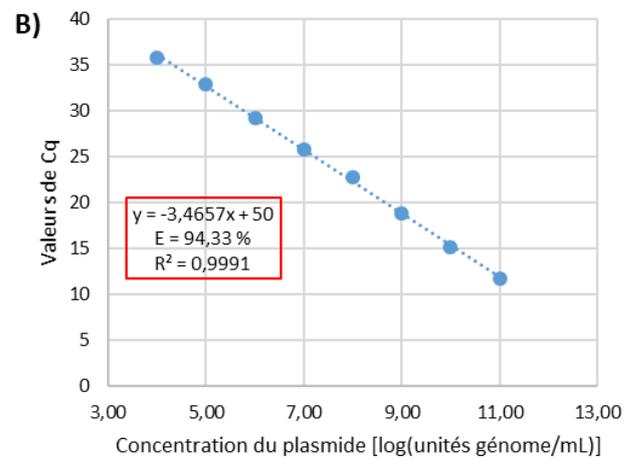
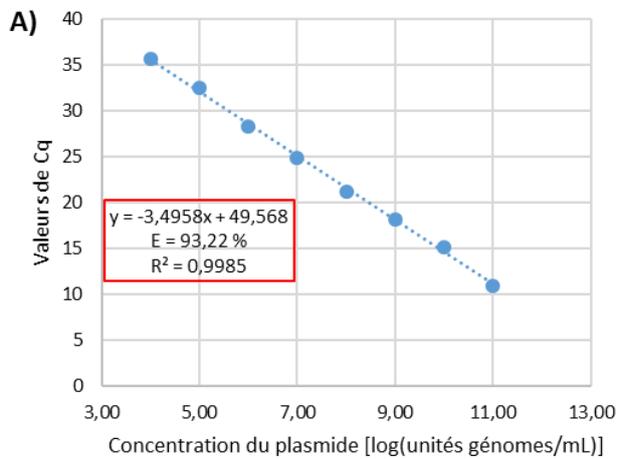
Annexe XII : Caractéristiques des échantillons de mollusques bivalves prélevés lors de la campagne IBTS 2020 et analysés dans cette étude.

Echantillons	Pool d'espèces	Tailles moyennes (cm)	Masses de la chair (g)
CH01	10 <i>A. opercularis</i>	7,85	94,96
CH02	10 <i>A. opercularis</i>	7,70	92,91
CH03	10 <i>A. opercularis</i>	6,55	67,54
CH04	10 <i>A. opercularis</i>	6,35	46,34

Annexe XIII : Caractéristiques des échantillons de poissons plats prélevés lors de la campagne IBTS 2020 et analysés dans cette étude.

Echantillons	Pool d'espèces	Tailles moyennes (cm)	Superficies moyennes (cm ²)	Masses branchies (g)	Masses viscères (g)
PO01	10 <i>P. platessa</i>	21,5	188	16,6	29,84
PO02	10 <i>P. platessa</i>	22,5	203	15	20,73
PO03	10 <i>P. platessa</i>	22,7	207	18,56	33,84
PO04	10 <i>P. platessa</i>	18,7	144	10,8	19,29
PO05	10 <i>L. limanda</i>	20,8	175	13,6	73,81
PO06	10 <i>L. limanda</i>	17,2	117	7,91	37,39
PO07	10 <i>P. platessa</i>	19,3	150	12,95	24,44
PO08	10 <i>P. platessa</i>	18,5	136	14,1	19,8
PO09	10 <i>P. platessa</i>	18,0	130	13,2	19,52
PO10	10 <i>L. limanda</i>	19,3	148	17,56	40,73
PO11	10 <i>L. limanda</i>	13,3	73	5,71	16,7
PO12	10 <i>P. platessa</i>	22,3	200	21,15	32,24
PO13	10 <i>P. platessa</i>	22,0	203	22,18	38,16
PO14	10 <i>P. platessa</i>	20,8	174	14,89	23,71
PO15	10 <i>P. platessa</i>	19,9	161	13,26	25,78
PO16	10 <i>P. platessa</i>	19,6	155	13,87	25,12
PO17	10 <i>P. platessa</i>	14,6	87	10,44	10,58
PO18	10 <i>P. platessa</i>	19,5	153	13,67	22,23
PO19	10 <i>P. platessa</i>	17,8	125	10,61	17,22
PO20	10 <i>P. platessa</i>	10,6	43	4,22	4,86
PO21	10 <i>P. platessa</i>	19,8	158	13,38	24,42
PO22	10 <i>P. platessa</i>	21,4	188	23,98	36,31
PO23	10 <i>P. platessa</i>	23,0	214	19,88	31,93
PO24	10 <i>P. platessa</i>	24,0	232	23,56	58,69
PO25	10 <i>P. platessa</i>	22,1	198	20,64	30,36
PO26	10 <i>P. platessa</i>	19,5	154	12,2	19,51
PO27	10 <i>P. platessa</i>	17,7	135	13,01	21,03
PO28	10 <i>P. platessa</i>	19,6	156	14,25	23,11
PO29	10 <i>P. platessa</i>	19,0	145	14,43	24,84
PO30	10 <i>P. platessa</i>	18,7	143	14,1	22,53
PO31	10 <i>P. platessa</i>	16,9	122	13,9	25,61
PO32	10 <i>P. platessa</i>	17,1	126	11,7	19,99
PO33	10 <i>P. platessa</i>	16,6	111	10,84	15,42
PO34	10 <i>P. platessa</i>	20,8	174	12,58	38,86
PO35	10 <i>P. platessa</i>	19,2	148	14,95	22,85

Annexe XIV : Courbes standard des réactions de qPCR réalisées pour l'analyse des échantillons de phytoplancton, de zooplancton, de chair de mollusques bivalves, de peau, de branchies et de viscères de poissons plats ciblant les gènes *tetA* (A), *bla_{TEM}* (B), *sul1* (C), *int11* (D) et *tuf* (E).



Annexe XV : Abondance absolue du gène bactérien *tuf* et abondances relatives des gènes indicateurs dans les échantillons de phytoplancton (PH), zooplancton (ZO), peau de poissons plats (PE), branchies de poissons plats (BR), viscères de poissons plats (VI) et chair de mollusques bivalves (CH).

Echantillon	Abondance absolue (log copies/ml d'échantillon)	Abondance relative (log)			
	<i>tuf</i>	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>int11</i>
PH01	5,97	-1,97	-0,87	-0,49	-0,81
PH02	6,72	-	-1,86	-2,22	-
PH03	7,13	-	-	-	-
PH04	6,62	-	-	-	-
PH05	6,36	-	-	-1,15	-1,58
PH06	7,08	-2,19	-1,47	-0,84	-1,70
PH07	7,28	-	-	-2,27	-3,11
PH08	7,53	-	-	-3,23	-
PH09	6,54	-	-	-	-
PH10	7,09	-	-	-	-
PH11	6,56	-	-	-	-
PH12	6,99	-2,16	-1,69	-1,13	-1,71
PH13	7,79	-	-	-2,65	-3,42
PH14	7,56	-	-	-3,12	-3,41
PH15	7,08	-	-	-2,59	-
PH16	6,28	-	-	-1,34	-1,96

Echantillon	Abondance absolue (log copies/ml d'échantillon)	Abondance relative (log)			
	<i>tuf</i>	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>int11</i>
Z001	-	-	-	-	-
Z002	-	-	-	-	-
Z003	-	-	-	-	-
Z004	-	-	-	-	-
Z005	-	-	-	-	-
Z006	-	-	-	-	-
Z007	-	-	-	-	-
Z008	-	-	-	-	-
Z009	-	-	-	-	-
Z010	-	-	-	-	-
Z011	-	-	-	-	-
Z012	-	-	-	-	-
Z013	7,13	-	-	-2,19	-2,47
Z014	6,54	-	-	-1,78	-1,47
Z015	-	-	-	-	-
Z016	-	-	-	-	-

Echantillon	Abondance absolue (log copies/cm ²)	Abondance relative (log)			
	<i>tuf</i>	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>intl1</i>
PE01	3,86	-	-	-1,68	-2,01
PE02	4,08	0,004	0,76	0,40	-0,69
PE03	4,02	-	-	-	-
PE04	4,17	-1,14	-	-	-
PE05	4,03	-1,11	-	-1,82	-2,11
PE06	4,94	-2,00	-1,81	-	-
PE07	4,76	-	-	-	-2,81
PE08	4,76	-	-	-2,22	-
PE09	5,37	-	-	-3,00	-
PE10	4,43	-	-	-	-2,52
PE11	4,62	-	-	-	-
PE12	4,09	-	-	-	-2,07
PE13	4,23	-	-	-	-
PE14	4,08	-	-	-1,90	-2,14
PE15	4,06	-	-	-	-
PE16	4,66	-1,47	-	-	-
PE17	4,53	-	-	-	-
PE18	4,52	-	-	-	-
PE19	4,79	-	-	-	-2,67
PE20	4,60	-	-	-	-1,86
PE21	4,29	-	-	-2,19	-2,20
PE22	4,17	-	-	-	-
PE23	3,82	-	-	-	-
PE24	3,85	-	-	-	-
PE25	4,29	-	-	-	-
PE26	3,97	-	-	-	-
PE27	4,23	-	-	-	-
PE28	4,54	-	-	-	-2,49
PE29	4,51	-	-	-2,27	-2,33
PE30	4,44	-	-1,40	-1,75	-2,24
PE31	4,82	-	-	-2,42	-2,45
PE32	4,63	-	-	-	-
PE33	5,11	-	-	-	-2,81
PE34	4,60	-	-	-	-
PE35	4,78	-	-	-2,64	-2,78

Echantillon	Abondance absolue (log copies/g)	Abondance relative (log)			
	<i>tuf</i>	<i>tetA</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>sul1</i>	<i>intl1</i>
BR01	5,38	-1,16	-	-0,59	-2,18
BR02	5,80	-	-	-2,31	-
BR03	5,51	-1,44	-1,19	-1,48	-
BR04	5,30	-0,76	-0,89	-	-1,57
BR05	5,17	-0,89	-	-1,68	-
BR06	5,57	-	-0,74	-1,82	-
BR07	5,74	-	-1,26	-	-
BR08	5,51	-1,25	-	-1,93	-
BR09	5,67	-	-	-	-
BR10	5,62	-	-	-	-
BR11	5,81	-	-	-	-
BR12	5,01	-	-	-	-
BR13	5,60	-	-	-	-
BR14	5,70	-	-	-	-
BR15	5,87	-	-	-	-
BR16	5,50	-	-	-	-
BR17	5,28	-	-	-	-
BR18	5,74	-	-	-	-
BR19	6,00	-	-	-	-
BR20	6,48	-	-	-	-
BR21	5,51	-	-	-	-
BR22	5,42	-	-	-	-
BR23	5,38	-	-	-	-
BR24	5,00	-	-	-	-
BR25	5,97	-1,91	-	-	-
BR26	5,90	-	-	-	-
BR27	6,56	-	-	-	-
BR28	5,90	-	-	-	-
BR29	5,64	-	-	-	-
BR30	5,33	-	-	-	-
BR31	5,39	-	-	-	-
BR32	6,20	-	-	-	-
BR33	5,79	-	-	-	-
BR34	5,66	-	-	-	-
BR35	5,42	-	-	-	-

Echantillon	Abondance absolue (log copies/g)	Abondance relative (log)			
	<i>tuf</i>	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>intl1</i>
VI01		-	-	-	-
VI02	5,22	-	-	-0,87	-1,77
VI03		-	-	-	-
VI04		-	-	-	-
VI05		-	-	-	-
VI06		-	-	-	-
VI07		-	-	-	-
VI08		-	-	-	-
VI09		-	-	-	-
VI10		-	-	-	-
VI11		-	-	-	-
VI12		-	-	-	-
VI13		-	-	-	-
VI14		-	-	-	-
VI15		-	-	-	-
VI16	4,90	-	-	-	-1,72
VI17		-	-	-	-
VI18		-	-	-	-
VI19		-	-	-	-
VI20		-	-	-	-
VI21		-	-	-	-
VI22		-	-	-	-
VI23		-	-	-	-
VI24		-	-	-	-
VI25		-	-	-	-
VI26		-	-	-	-
VI27	5,03	-	-	-0,93	-
VI28		-	-	-	-
VI29		-	-	-	-
VI30		-	-	-	-
VI31		-	-	-	-
VI32		-	-	-	-
VI33		-	-	-	-
VI34		-	-	-	-
VI35		-	-	-	-

Echantillon	Abondance absolue (log copies/g)	Abondance relative (log)			
	<i>tuf</i>	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>intl1</i>
CH01	5,76	-0,82	-0,90	-0,33	-1,85
CH02	6,63			-3,14	-3,84
CH03	6,21				-3,64
CH04	5,88		-2,05		

Annexe XVI : Analyse des corrélations entre l'abondance absolue des gènes *sul1*, *intl1*, *tuf* et des paramètres environnementaux associés aux échantillons d'eau de mer. A) Matrice des coefficients de corrélation de Pearson (r). B) *p*-values obtenues par un test de significativité. Les *p*-values significatives sont soulignées et en gras. Pr : pression ; Temp : température de l'eau ; Sal : salinité ; Turb : turbidité ; Oxyg : saturation en oxygène ; Alg : concentration en algues.

A)

	<i>sul1</i>	<i>intl1</i>	<i>tuf</i>	pH	Pr	Temp	Sal	Turb	Oxyg	Alg
<i>sul1</i>	1	0,94	0,34	0,32	0,21	0,17	-0,27	0,75	0,46	0,16
<i>intl1</i>		1	0,40	0,31	-0,02	0,13	-0,44	0,84	0,66	0,10
<i>tuf</i>			1	-0,51	-0,65	-0,51	-0,76	0,59	0,81	0,48
pH				1	0,38	0,82	0,54	-0,19	-0,21	0,04
Pr					1	0,34	0,65	-0,29	-0,74	-0,32
Temp						1	0,74	-0,23	-0,31	0,39
Sal							1	-0,73	-0,86	0,14
Turb								1	0,81	0,06
Oxyg									1	0,25
Alg										1

B)

	<i>sul1</i>	<i>intl1</i>	<i>tuf</i>	pH	Pr	Temp	Sal	Turb	Oxyg	Alg
<i>sul1</i>	0	<u>0,0000</u>	0,097	0,484	0,349	0,155	<u>0,027</u>	<u>0,001</u>	<u>0,025</u>	0,614
<i>intl1</i>		0	<u>0,033</u>	0,322	0,128	0,083	<u>0,005</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,003</u>	0,804
<i>tuf</i>			0	<u>0,001</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,0009</u>	<u>0,0000</u>	<u>0,001</u>	<u>0,0000</u>	0,201
pH				0	<u>0,010</u>	<u>0,0001</u>	<u>0,004</u>	<u>0,039</u>	<u>0,017</u>	0,390
Pr					0	<u>0,017</u>	<u>0,002</u>	<u>0,018</u>	<u>0,0003</u>	0,078
Temp						0	<u>0,0002</u>	<u>0,005</u>	<u>0,004</u>	0,892
Sal							0	<u>0,0000</u>	<u>0,0000</u>	0,671
Turb								0	<u>0,0000</u>	0,868
Oxyg									0	0,389
Alg										0

Annexe XVII : Analyse des corrélations entre l'abondance absolue des gènes indicateurs, du gène *tuf* et des paramètres environnementaux associés aux échantillons de phytoplancton. A) Matrice des coefficients de corrélation de Pearson (r). B) *p*-values obtenues par un test de significativité. Les *p*-values significatives sont soulignées et en gras. Pr : pression ; Temp : température de l'eau ; Sal : salinité ; Turb : turbidité ; Oxyg : saturation en oxygène ; Alg : concentration en algues.

A)

	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>int11</i>	<i>tuf</i>	pH	Pr	Temp	Sal	Turb	Oxyg	Alg
<i>tetA</i>	1	0,83	0,89	0,92	1,00	-0,86	0,77	-0,99	-0,12	0,95	0,97	0,66
<i>bla</i> _{TEM}		1	0,99	0,98	0,84	-0,43	0,99	-0,74	0,45	0,97	0,94	0,97
<i>sul1</i>			1	1,00	0,90	-0,53	0,97	-0,81	0,35	0,99	0,97	0,93
<i>int11</i>				1	0,92	-0,58	0,96	-0,84	0,29	1,00	0,98	0,91
<i>tuf</i>					1	-0,85	0,78	-0,99	-0,10	0,95	0,98	0,67
pH						1	-0,33	0,93	0,61	-0,65	-0,72	-0,18
Pr							1	-0,66	0,55	0,93	0,89	0,99
Temp								1	0,27	-0,88	-0,93	-0,54
Sal									1	0,21	0,11	0,67
Turb										1	1,00	0,87
Oxyg											1	0,82
Alg												1

B)

	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>sul1</i>	<i>int11</i>	<i>tuf</i>	pH	Pr	Temp	Sal	Turb	Oxyg	Alg
<i>tetA</i>	0	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,149	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
<i>bla</i> _{TEM}		0	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,563	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
<i>sul1</i>			0	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,436	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
<i>int11</i>				0	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,381	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
<i>tuf</i>					0	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,153	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
pH						0	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>	<u>0,028</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,003</u>
Pr							0	<u>0,000</u>	0,718	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
Temp								0	0,099	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
Sal									0	0,318	0,255	1,000
Turb										0	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
Oxyg											0	<u>0,000</u>
Alg												0

Annexe XVIII : Analyse des corrélations entre l'abondance absolue des gènes *sul1*, *int1* et des paramètres environnementaux associés aux échantillons de zooplancton. A) Matrice des coefficients de corrélation de Pearson (*r*). B) *p*-values obtenues par un test de significativité. Les *p*-values significatives sont soulignées et en gras. Pr : pression ; Temp : température de l'eau ; Sal : salinité ; Turb : turbidité ; Oxyg : saturation en oxygène ; Alg : concentration en algues.

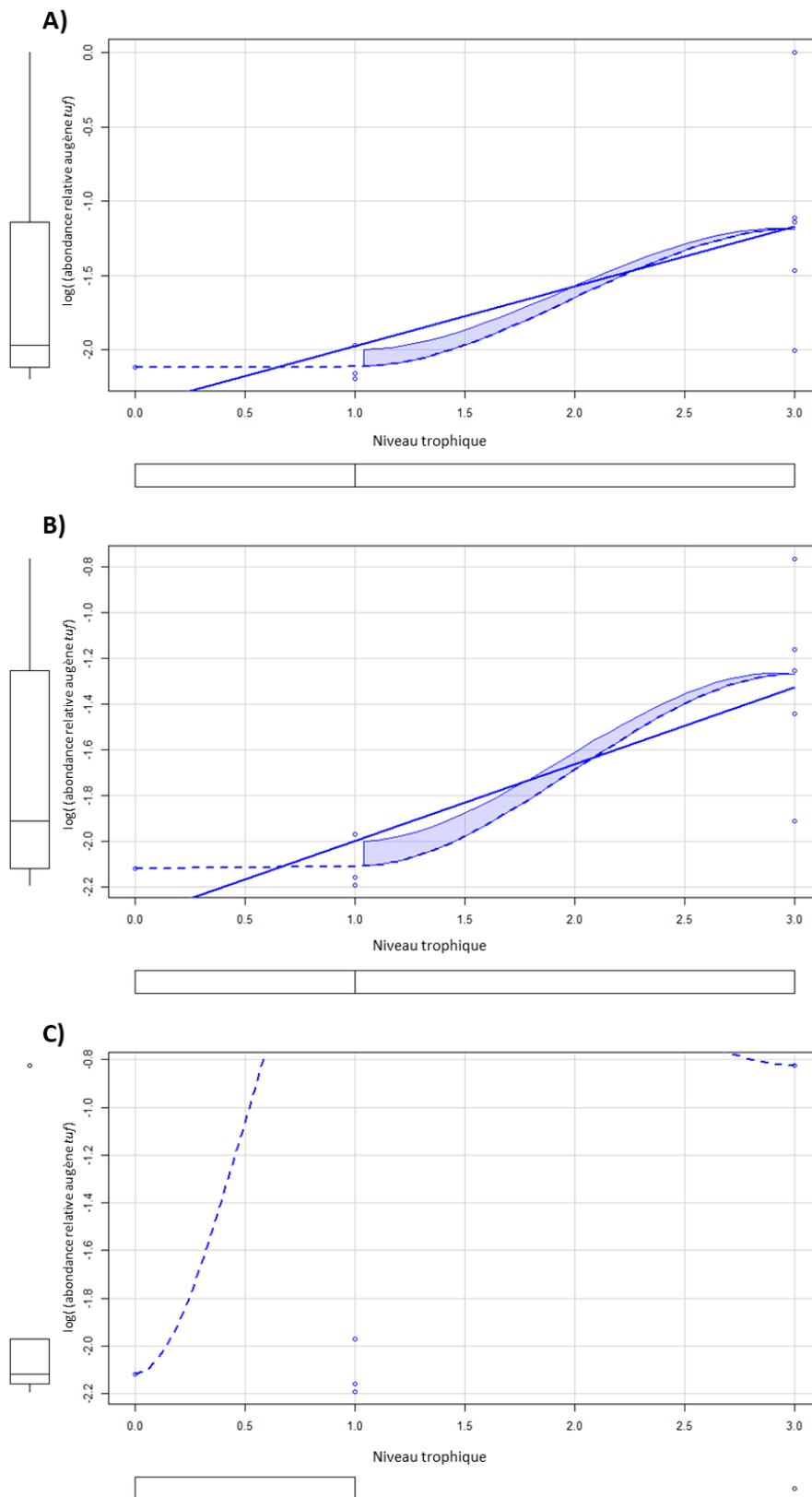
A)

	<i>sul1</i>	<i>int1</i>	pH	Pr	Temp	Sal	Turb	Oxyg	Alg
<i>sul1</i>	1	0,62	0,50	0,36	0,42	0,29	0,07	0,51	0,23
<i>int1</i>		1	0,51	0,30	0,33	0,44	0,67	0,06	0,82
pH			1	0,19	0,92	0,82	-0,12	-0,13	0,10
Pr				1	0,23	0,27	0,22	0,43	0,22
Temp					1	0,76	-0,14	-0,26	-0,08
Sal						1	0,03	-0,07	0,11
Turb							1	-0,14	0,82
Oxyg								1	0,06
Alg									1

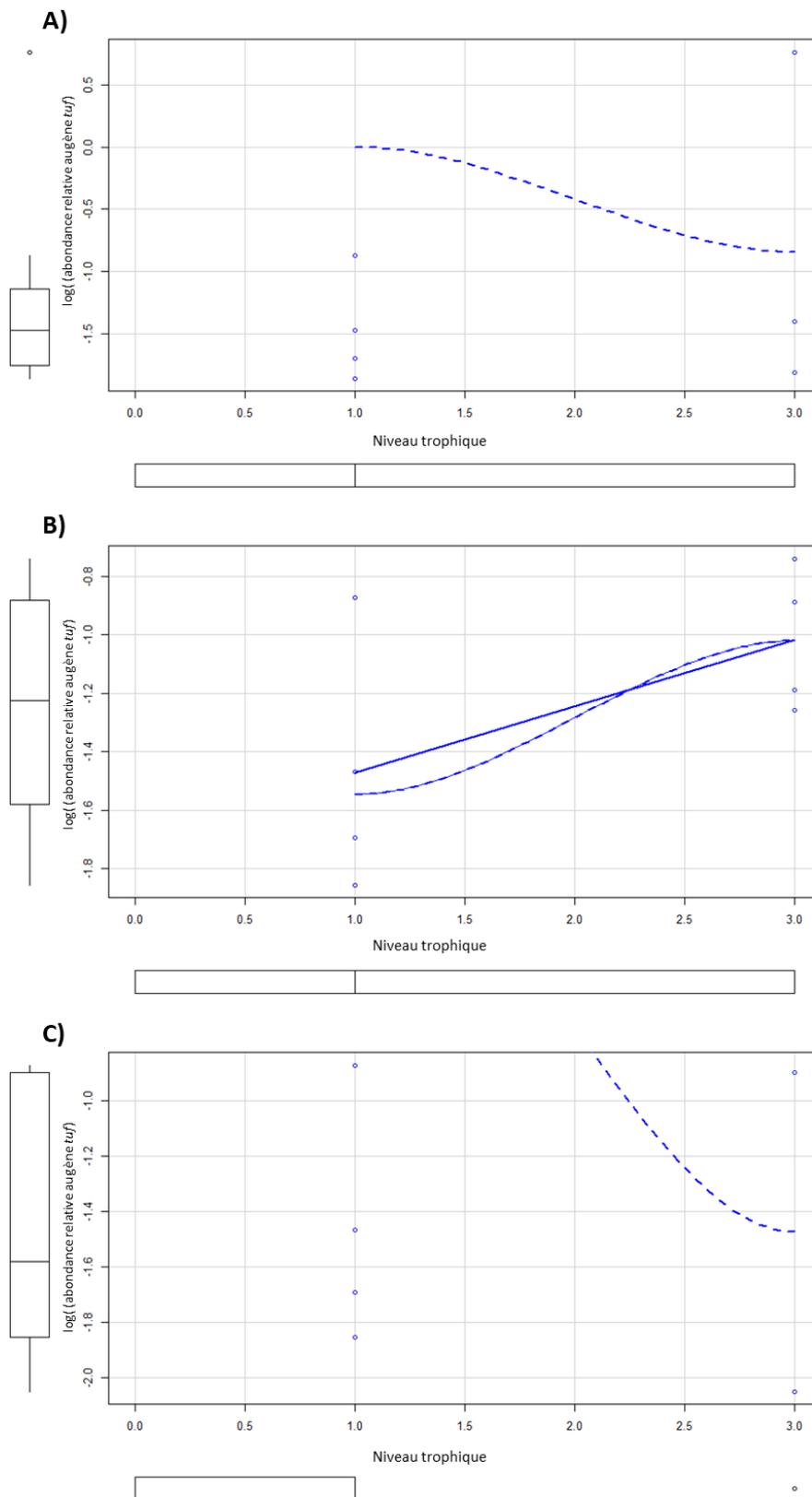
B)

	<i>sul1</i>	<i>int1</i>	pH	Pr	Temp	Sal	Turb	Oxyg	Alg
<i>sul1</i>	0	0,931	0,444	0,917	0,546	0,875	0,221	0,244	0,400
<i>int1</i>		0	0,901	0,276	0,882	0,984	<u>0,024</u>	0,205	<u>0,008</u>
pH			0	0,423	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,132	0,121	0,174
Pr				0	0,569	0,503	0,731	0,163	0,591
Temp					0	<u>0,000</u>	0,106	0,111	0,106
Sal						0	0,188	0,082	0,193
Turb							0	0,48	<u>0,000</u>
Oxyg								0	0,599
Alg									0

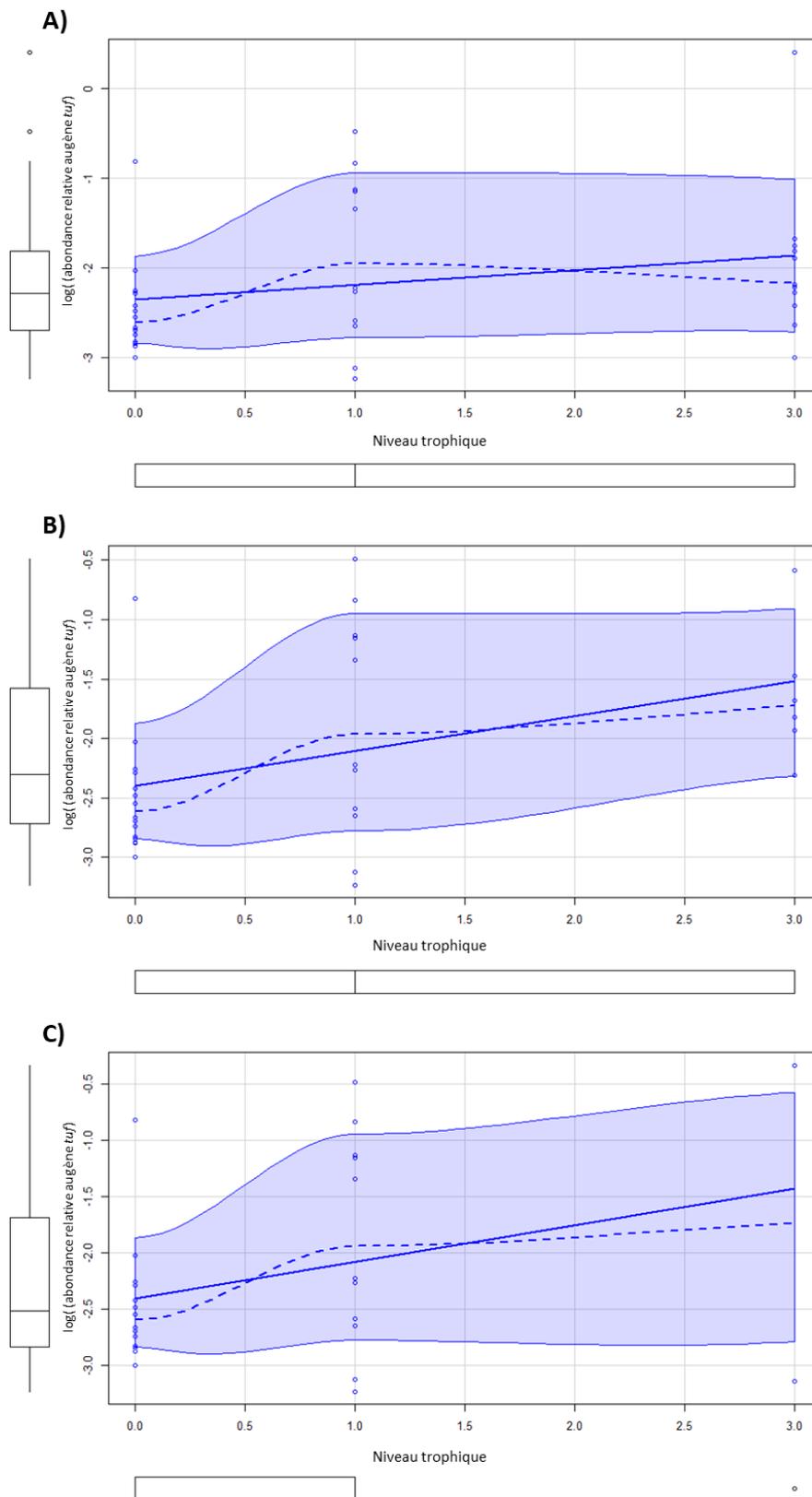
Annexe XIX : Modèles de régression entre l'abondance relative du gène *tetA* et le niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspondait à (A) la peau des poissons plats, (B) aux branchies des poissons plats ou (C) à la chair des mollusques bivalves. Ligne bleue continue : régression linéaire ; courbe bleue en pointillés : régression locale (de type lowess) ; zone bleue : intervalle de confiance de 95 %.



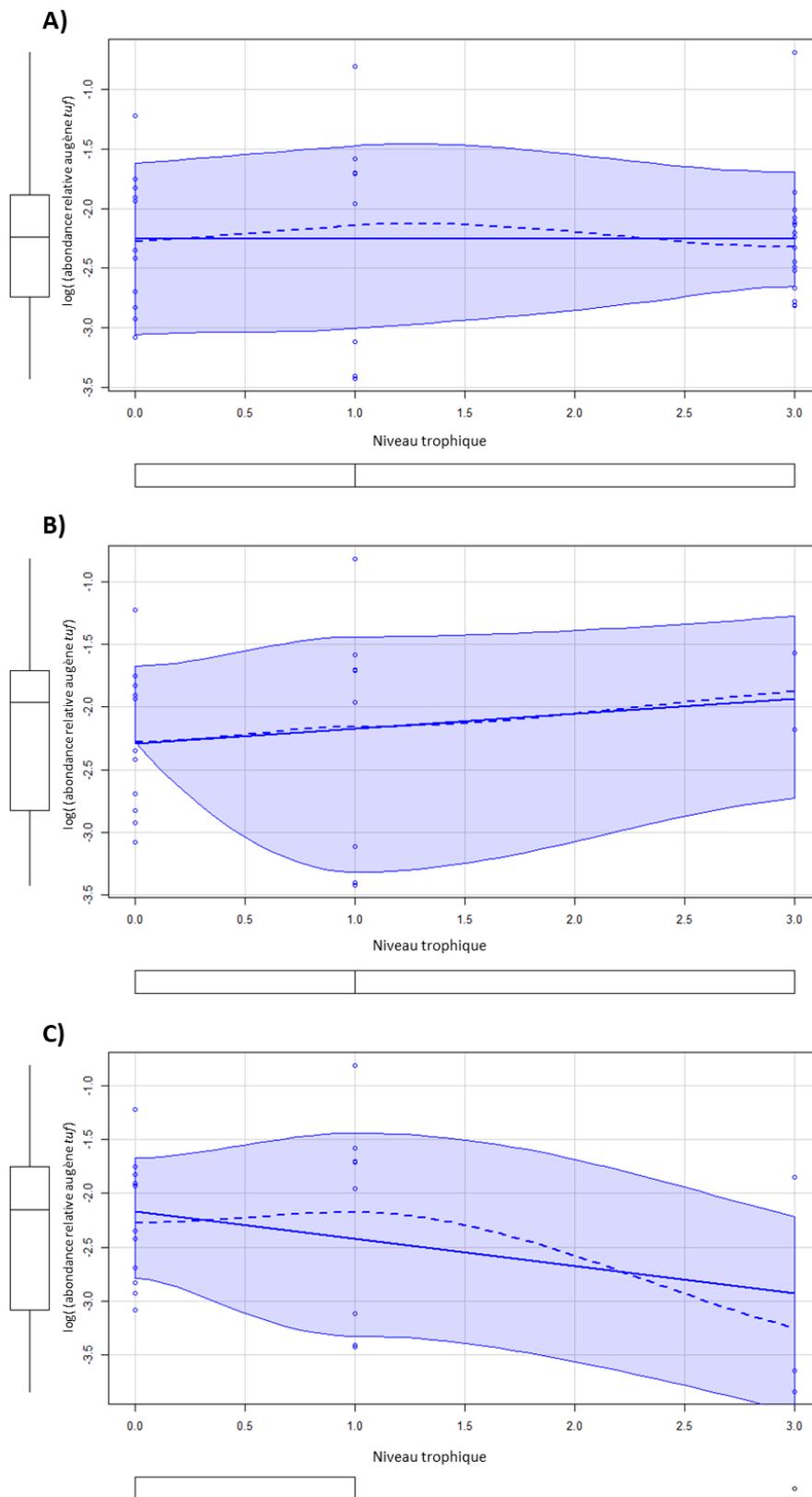
Annexe XX : Modèles de régression entre l'abondance relative du gène *bla_{TEM}* et le niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspondait à (A) la peau des poissons plats, (B) aux branchies des poissons plats ou (C) à la chair des mollusques bivalves. Ligne bleue continue : régression linéaire ; courbe bleue en pointillés : régression locale (de type lowess) ; zone bleue : intervalle de confiance de 95 %.



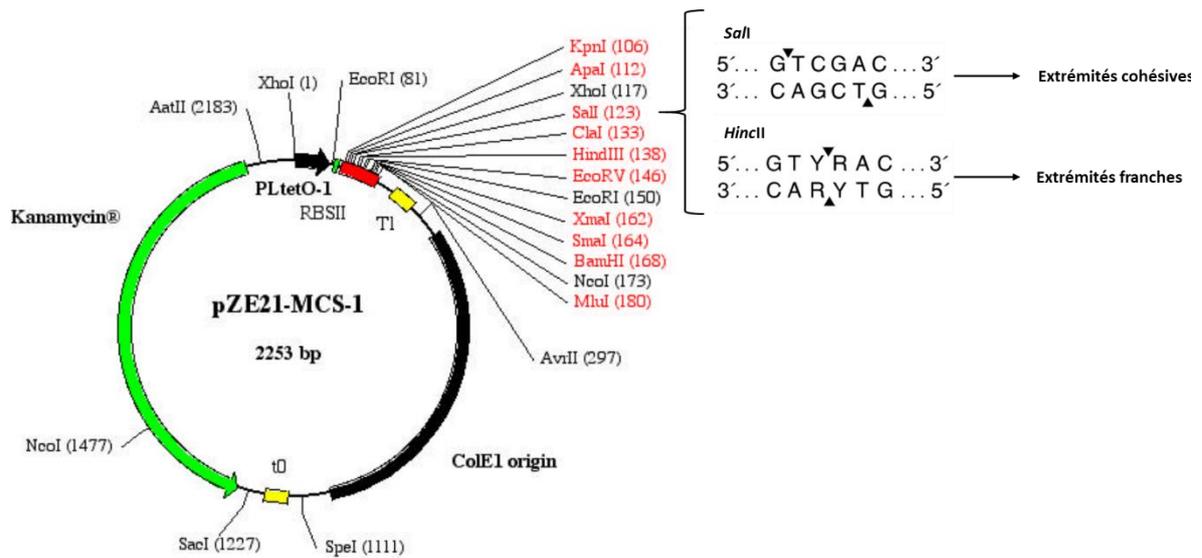
Annexe XXI : Modèles de régression entre l'abondance relative du gène *su1* et le niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspondait à (A) la peau des poissons plats, (B) aux branchies des poissons plats ou (C) à la chair des mollusques bivalves. Ligne bleue continue : régression linéaire ; courbe bleue en pointillés : régression locale (de type lowess) ; zone bleue : intervalle de confiance de 95 %.



Annexe XXII : Modèles de régression entre l'abondance relative du gène *intl1* et le niveau trophique. Le niveau trophique 3 correspondait à (A) la peau des poissons plats, (B) aux branchies des poissons plats ou (C) à la chair des mollusques bivalves. Ligne bleue continue : régression linéaire ; courbe bleue en pointillés : régression locale (de type lowess) ; zone bleue : intervalle de confiance de 95 %.



Annexe XXIII : Carte et séquence nucléotidique complète du plasmide pZE21-MCS avec la séquence des amorces pZE21-seqF/pZE21-seqR (bleu), des amorces pZE21-colF/pZE21-colR (rose) et du site de restriction *HincII* (orange).



CTCGAGTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCAC
 TGACC**GAATTC**ATTAAAGAGGAGAAAGGTACCGGGCCCCCTCGAG**GTCGAC**GGTATCGATAAGCTTGATATC
 GAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCCATGGTACGCGTG**CTAGAGGCATCAAATAAAACGAA**GGCTCAGTCGAAA
 GACTGGGCCTTTCTGTTTTATCTGTTGTTTGTCTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCT
 AGGGCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA**TACGGTTATCCACAGAATCAGG**GGAT
 AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGT
 TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAG
 GACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGG
 ATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTG
 TAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC
 TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
 GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
 TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCAC
 CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
 GATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGACTAGTGCTTG
 GATTCTACCAATAAAAAACGCCGCGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTA
 CTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCTGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGC
 GATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTAGCCCATTCGCC
 GCCAAGCTCTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACA
 GTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGA
 GATCCTCGCCGTGGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGT
 CCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGTTGGTGGTC
 GAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAG
 GAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCACTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTCCCGCTCAGTGA
 CAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTGAGT
 TCATTACAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGC
 GGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGGCCGAGAACC
 TCGGTGAATCCATCTTGTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCTGTCTTGTGATCAGATCTTGATCCCCTGCGCC
 ATCAGATCCTTGGCGCAAGAAAGCCATCCAGTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAG
 CTGGCAATCCGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTT
 TCGTCTTAC

Annexe XXIV : Composition du bouillon LB (Lysogeny Broth) et du milieu LB gélosé utilisés pour la métagénomique fonctionnelle.

Bouillon LB (Lysogeny Broth) – Pour 1 L de milieu :

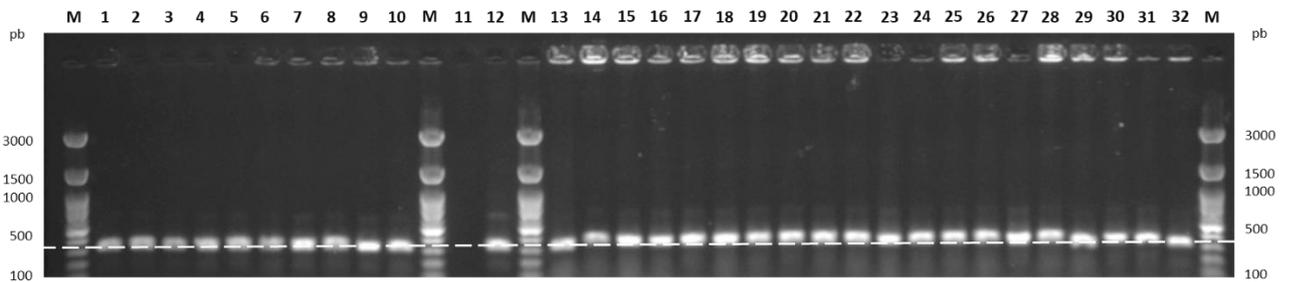
- 10 g de peptone (Biomérieux)
- 5 g d'extrait de levure (BioRad)
- 10 g de NaCl (Labbox)

Milieu LB gélosé - Pour 1 L de milieu :

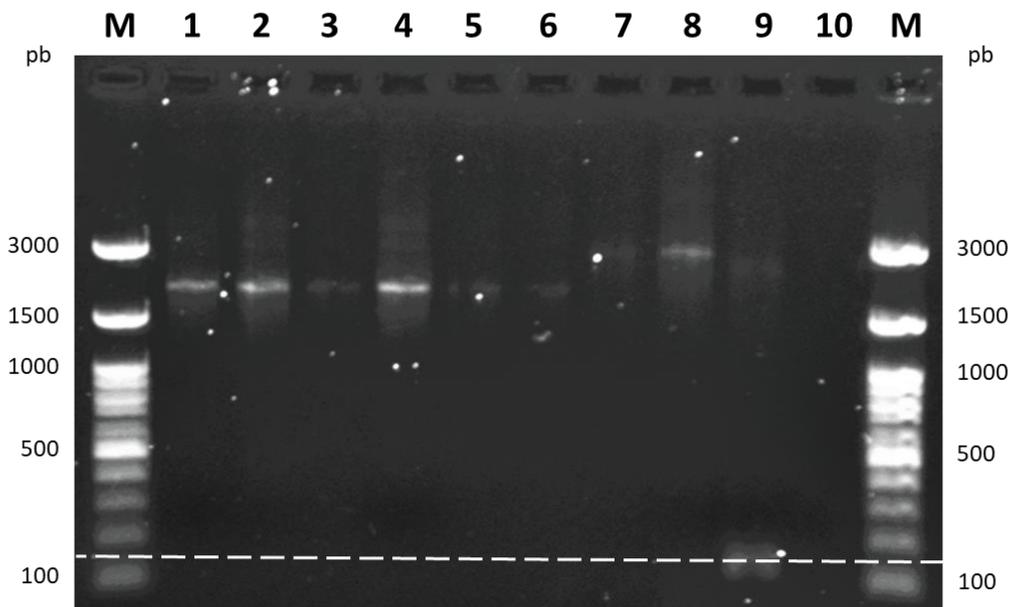
- 10 g de peptone (Biomérieux)
- 5 g d'extrait de levure (Biorad)
- 10 g de NaCl (Labbox)
- 15 g d'agar bactériologique (Thermo Scientific)

Le pH a été ajusté à $7,0 \pm 0,2$ puis le milieu a été autoclavé à 121 °C

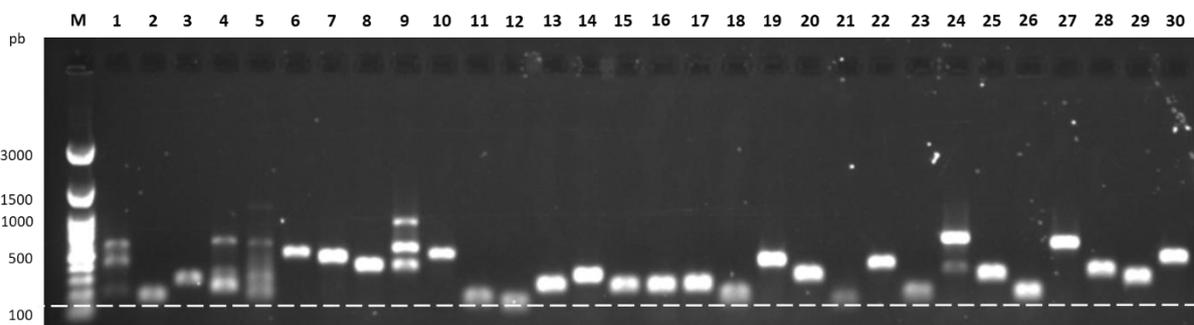
Annexe XXV : Révélation sur gel d'agarose à 1 % des amplicons de la PCR sur les transformants de la librairie métagénomique de la souche de *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 réalisée par choc thermique. M : marqueur de taille 100 pb ; puits 1 à 10 : clones ; puit 11 : eau nuclease-free (témoin négatif) ; puit 12 : ADN du plasmide pZE21-MCS sans insert ; puits 13 à 32 : clones. La ligne blanche indique la taille des amplicons quand le plasmide est vide.



Annexe XXVI : Révélation sur gel d'agarose à 1 % des amplicons de la PCR réalisée sur les colonies résistantes au sulfaméthoxazole de la souche *V. parahaemolyticus* 16-B3PA-0006 (puits 1 à 6 : 16-SUL-1 à 16-SUL-6) et à la tétracycline de la souche *V. parahaemolyticus* 13-B3PA-2931 (puits 7 et 8 : 13-TET-1 et 13-TET-2). Puit 9 : ADN du plasmide pZE21-MCS sans insert ; puit 10 : eau nuclease-free (témoin négatif) ; M : marqueur de taille 100 pb. La ligne blanche indique la taille des amplicons quand le plasmide est vide.



Annexe XXVII : Révélation sur gel d'agarose à 1 % des amplicons de la PCR réalisée sur les colonies s'étant développées en présence d'érythromycine. M : marqueur de taille 100 pb ; puits 1 à 10 : librairie métagénomique de la souche 12-B3PA-1629 (clones 12-ERY-1 à 12-ERY-10) ; puits 11 à 20 : librairie métagénomique de la souche 13-B3PA-2931 (clones 13-ERY-1 à 13-ERY-10) ; puits 21 à 30 : librairie métagénomique de la souche 16-B3PA-0006 (clones 16-ERY-1 à 16-ERY-10). La ligne blanche indique la taille des amplicons quand le plasmide est vide.



Annexe XXVIII : Analyse des séquences des inserts plasmidiques des clones s'étant développés en présence d'érythromycine (bibliothèques métagénomiques 12-B3PA-1629, 13-B3PA-2931 et 16-B3PA-0006) par un Blast nucléotidique (NCBI). NA : non annoté. Produit : protéine ou fonction de la protéine codée par le gène identifié ; query cover : pourcentage correspondant à la longueur de la séquence blastée couvrant la séquence cible ; % d'identité : pourcentage d'identité correspondant au degré de similitude entre la séquence blastée et la séquence cible ; bactérie : espèce bactérienne dans laquelle le gène a été identifié.

Clone	Gène identifié	Produit	Query cover	% d'identité	Bactérie
12-ERY-3	<i>pstS</i>	protéine de liaison au substrat du transporteur ABC	26 %	100 %	<i>Shewanella algae</i> (CP033575.1)
	<i>tonB</i>	récepteur tonB-dépendant		98 %	
12-ERY-6	<i>dsbA</i>	protéine de formation de liaisons disulfures	75 %	99,2 %	<i>Shewanella algae</i> (CP018456.1)
12-ERY-7	NA	amidohydrolase	70 %	100 %	<i>Shewanella algae</i> (CP046378.1)
	NA	protéine hypothétique		85 %	
12-ERY-8	<i>flgM</i>	protéine de biosynthèse flagellaire	55 %	100 %	<i>Shewanella algae</i> (AP024612.1)
	<i>astD</i>	N-succinylglutamate 5-semialdéhyde déshydrogénase		95 %	
	NA	protéine hypothétique		100 %	
12-ERY-10	NA	urocanate hydratase	45 %	97 %	<i>Shewanella algae</i> (CP018456.1)
	<i>icmF</i>	protéine de sécrétion de type VI		95 %	

Clone	Gène identifié	Produit	Query cover	% d'identité	Bactérie
13-ERY-14	NA	régulateur transcriptionnel de la famille LysR	29 %	100 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP044070.1)
13-ERY-15	NA	protéine à domaine Hpt	20 %	98,1 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP034305.1)
13-ERY-17	NA	protéine hypothétique	44 %	100 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP046411.1)
13-ERY-19	<i>crcB</i>	transporteur d'efflux de fluorure	59 %	99 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP023472.1)
	<i>yejH</i>	hélicase à ARN ATP-dépendante		100 %	
13-ERY-20	<i>yejH</i>	hélicase à ARN ATP-dépendante	39 %	98 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP013248.1)
	NA	protéine hypothétique		99 %	

Clone	Gène identifié	Produit	Query cover	% d'identité	Bactérie
16-ERY-22	<i>pdxH</i>	pyridoxamine 5'-phosphate oxydase	20 %	100 %	<i>Proteus vulgaris</i> (CP060211.1)
16-ERY-25	NA	sulfatase-like hydrolase/transferase	43 %	100 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP045794.1)
16-ERY-27	NA	fumarate hydratase de classe II	55 %	100 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP012950.1)
	NA	perméase de type FtsX		97 %	
16-ERY-28	NA	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	38 %	100 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP051111.1)
16-ERY-30	NA	perméase de type NCS2	60 %	100 %	<i>V. parahaemolyticus</i> (CP034298.1)

RESUME

La résistance aux antimicrobiens est une préoccupation pour la santé humaine mais est peu étudiée dans le milieu marin comparé au milieu terrestre. Les gènes de résistance aux antimicrobiens (GRA) peuvent disséminer jusqu'au milieu marin, récepteur final d'effluents contaminés par les activités humaines. L'objectif de ces travaux a été d'étudier l'occurrence de quatre gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens, *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* et *int11*, dans un réseau trophique benthique et les eaux de surface. D'abord, des outils de biologie moléculaire ont été mis au point pour quantifier les gènes indicateurs de la résistance aux antimicrobiens dans des échantillons représentatifs d'un réseau trophique benthique et des échantillons d'eau. Cela incluait de valider des protocoles de filtration d'eau, d'extraction d'ADN bactérien total à partir d'échantillons de plancton, de mollusques bivalves, de poissons plats et d'eau ainsi que l'optimisation de qPCR ciblant les quatre gènes indicateurs. Ces protocoles ont été appliqués à des échantillons prélevés dans la Manche/Mer du Nord (représentatifs du réseau trophique benthique et de l'eau de mer) et à des échantillons d'eaux fluviales et côtières. Les gènes avaient une prévalence globale de 81,7 % dans ces échantillons avec une abondance plus élevée dans le fleuve et les zones soumises à l'anthropisation. Une prévalence plus élevée des gènes *sul1* et *int11* a été observée dans l'ensemble des échantillons par rapport aux gènes *tetA* et *bla_{TEM}*. Une accumulation des gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens a été constatée dans la chair des mollusques, la peau et les branchies des poissons. Certains facteurs environnementaux mesurés dans l'eau de mer comme la turbidité et la saturation en oxygène étaient corrélés à l'abondance des gènes indicateurs de la résistance aux antimicrobiens. De plus, afin d'identifier de nouveaux gènes indicateurs pour les échantillons marins, une méthode de métagénomique fonctionnelle a été développée sur des souches témoins de *V. parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche et résistantes aux antibiotiques. Cette technique a permis d'identifier des GRA connus comme *tetA*, *sul2* et *strA*. Le séquençage complet de l'ADN génomique des souches a révélé pour la première fois la présence du gène *bla_{OXA-SHE}* dans une souche de *V. parahaemolyticus*.

Mots clés : Gènes indicateurs de résistance aux antimicrobiens, environnement marin, réseau trophique benthique, extraction d'ADN

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a human health concern but is understudied in the marine environment compared to the terrestrial environment. Antimicrobial resistance genes (ARGs) can disseminate to the marine environment, the ultimate receptor of effluents contaminated by human activities. The objective of this work was to study the occurrence of four antimicrobial resistance indicator genes, *tetA*, *bla_{TEM}*, *sul1* and *int11*, in a benthic food web and surface waters. First, molecular biology tools were developed to quantify antimicrobial resistance indicator genes in representative benthic food web and water samples. This included validating water filtration protocols, extraction of total bacterial DNA from plankton, bivalve mollusks, flatfish and water samples, and optimization of qPCR targeting the four indicator genes. These protocols were applied to samples collected in the English Channel/North Sea (representative of the benthic food web and seawater) and to river and coastal water samples. Genes had an overall prevalence of 81.7 % in these samples with higher abundance in the river and areas subject to anthropization. A higher prevalence of the *sul1* and *int11* genes was observed in all samples compared to the *tetA* and *bla_{TEM}* genes. An accumulation of antimicrobial resistance indicator genes was found in shellfish meat, skin and gills of fish. Some environmental factors measured in seawater such as turbidity and oxygen saturation were correlated with the abundance of antimicrobial resistance indicator genes. In addition, in order to identify new indicator genes for marine samples, a functional metagenomic method was developed on antibiotic resistant control strains of *V. parahaemolyticus* isolated from fishery products. This technique identified known ARGs such as *tetA*, *sul2* and *strA*. Complete genomic DNA sequencing of the strains revealed for the first time the presence of the *bla_{OXA-SHE}* gene in a *V. parahaemolyticus* strain.

Keywords : Antimicrobial resistance indicator genes, marine environment, benthic food web, DNA extraction