



HAL
open science

Rapport final du projet Antibiotools - Des outils pour caractériser et suivre les antibiotiques et antibiorésistances dans les écosystèmes aquatique (PNREST Anses, 2017/3 ABR/22)

Chloé Bonnineau, Agnes Bouchez, Christophe Dagot, Marion Devers-Lamrani, J. Labanowski, Fabrice Martin-Laurent, Leslie Mondamert, Stéphane Pesce

► To cite this version:

Chloé Bonnineau, Agnes Bouchez, Christophe Dagot, Marion Devers-Lamrani, J. Labanowski, et al.. Rapport final du projet Antibiotools - Des outils pour caractériser et suivre les antibiotiques et antibiorésistances dans les écosystèmes aquatique (PNREST Anses, 2017/3 ABR/22). [Rapport de recherche] INRAE RiverLy. 2022. hal-03797468

HAL Id: hal-03797468

<https://hal.inrae.fr/hal-03797468>

Submitted on 4 Oct 2022

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.

ANTIBIO-TOOLS –N°2017/3 ABR/22

Rapport Final

Projet financé dans le cadre du PNR EST
Programme national de recherche Environnement-Santé Travail

Titre du projet: Des outils pour caractériser et suivre les antibiotiques et antibiorésistances dans les écosystèmes aquatiques

Période concernée: du 18/01/2018 au 15/12/2021

Nom, titre et organisme du responsable scientifique:
Chloé Bonnineau, chargée de recherche, INRAE centre Lyon-Villeurbanne
Auvergne-Rhône-Alpes

DÉCLARATION DU RESPONSABLE SCIENTIFIQUE

Je, soussigné Chloé Bonnineau, responsable scientifique du projet ANTIBIO-TOOLS, déclare que

Le présent rapport final donne une description fidèle des travaux réalisés dans le cadre du projet depuis son démarrage.

Le projet (cocher la case correspondante):

- a entièrement atteint ses objectifs;
- a atteint l'essentiel de ses objectifs excepté des écarts mineurs;
- n'a pas réussi à atteindre certains des objectifs essentiels prévus.

A ma connaissance, le rapport financier est en accord avec les travaux réalisés.

Date: 15/12/2021

Signature:



1. RÉSUMÉ

Synthèse publiable du rapport final

Après leur découverte au début du 20^{ème} siècle, la production et la consommation d'antibiotiques ont augmenté massivement dans le monde entier, permettant une réduction significative des décès causés par les maladies infectieuses. En 2015, environ 1300 tonnes d'antibiotiques ont été vendus en France dont 60 % destiné à la médecine humaine et 40 % à la santé animale (Maugat et al., 2016). Les antibiotiques sont des substances actives qui ne sont que partiellement métabolisées puis excrétées (Voulvoulis et al., 2016). Les antibiotiques comme d'autres résidus pharmaceutiques se dispersent dans l'environnement aquatique du fait de rejets diffus (agricoles suite aux traitements vétérinaires ou épandages des déchets, assainissements individuels...), et de leur transport massif *via* les eaux usées collectées dans les stations de traitement des eaux usées (STEU). Bien que les antibiotiques puissent être dégradés dans l'environnement (e.g. photo-dégradation ou biodégradation), leur apport dans les cours d'eau est continu et provoque ainsi une contamination chronique persistante des écosystèmes aquatiques. Si les concentrations d'antibiotiques dans les eaux de surface vont du ng/L au µg/L (Carvalho and Santos, 2016) et peuvent être modélisées à l'échelle européenne (Johnson et al., 2015), les concentrations d'antibiotiques dans d'autres compartiments aquatiques comme les sédiments (e.g. Osorio et al., 2016) ou le biote (e.g. Ruhí et al., 2016) sont moins bien connues.

La présence d'antibiotiques exerce une pression de sélection sur les bactéries commensales et saprophytes, avec un risque avéré de développement de résistances qui engendre un problème sanitaire majeur (OMS, 2016 : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/fr/>). Ainsi, dans le monde entier environ 700 000 décès par an sont attribués à des infections par des bactéries résistantes aux antibiotiques et l'augmentation de ces antibiorésistances pourrait entraîner jusqu'à 10 millions de morts en 2050 (O'Neill et al., 2016). En France, la proportion de *Klebsiella pneumoniae*, une bactérie pathogène responsable d'infection respiratoire, résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération, aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides est en constante augmentation depuis 2005 (2.1 % d'isolats résistants) et a atteint 22.5% en 2015 (European Centre for Disease Prevention and Control, Surveillance Atlas of Infectious Diseases : <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Instance=GeneralAtlas>). Devant le constat alarmant de cette dissémination des antibiorésistances à l'échelle mondiale, différents rapports (O'Neill et al., 2014, TWH 2014, WHO 2015, Acar et al., 2009, DOH 2011) pointent la nécessité de réduire la consommation d'antibiotiques en améliorant l'information sur la surconsommation d'antibiotiques, en développant les méthodes de diagnostic des maladies infectieuses et les solutions alternatives aux antibiotiques (O'Neill et al. 2016) mais aussi de surveiller la dissémination des antibiorésistances à l'échelle homme-animal-environnement dans une approche dite "One Health" intégrant protection de l'environnement et santé humaine. En effet, différents écosystèmes anthropiques (hôpitaux, STEU, fermes d'élevage...) sont considérés comme des réservoirs de bactéries multi-résistantes et de gènes de résistance. Les effluents de ces sites vont apporter non seulement des antibiotiques mais aussi des bactéries résistantes dans l'environnement récepteur.

La présence d'antibiorésistances dans l'environnement représente donc un risque encore mal évalué pour la santé humaine et animale (Huijbers et al., 2015; Mao et al., 2014). Afin de limiter la dissémination des antibiorésistances dans l'environnement, il est nécessaire de connaître et de mieux comprendre la dynamique des antibiotiques et des antibiorésistances (e.g. répartition, évolution temporelle, contribution des communautés microbiennes à cette dynamique) et le lien possible entre antibiotiques et antibiorésistance dans les différents compartiments aquatiques. Pour établir des stratégies de gestion et de surveillance efficaces des antibiorésistance, des techniques pertinentes et adaptées de suivi de la résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes complexes des écosystèmes aquatiques doivent également être mises en place. C'est dans cette optique que le projet **ANTIBIO-TOOLS** s'inscrit pour contribuer à une **meilleure compréhension de la dynamique des antibiotiques et antibiorésistances dans l'environnement aquatique** et à **l'amélioration des outils de suivi des antibiorésistances**.

Le projet ANTIBIO-TOOLS s'articule autour de 3 volets :

- **Volet 1** : **quantifier** les **antibiotiques** et **antibiorésistances** dans différents compartiments aquatiques (eau de surface, biofilm, sédiment) afin d'identifier des points d'accumulation ;
- **Volet 2** : **comparer** plusieurs méthode de **détection** des **antibiorésistances** : détection des gènes de résistance, quantification des intégrons (éléments génétiques mobiles de l'ADN), mesure de la tolérance des communautés microbiennes *via* des tests de toxicité aiguë suivant une approche PICT (Pollution Induced Community Tolerance, Tlili et al. 2016)
- **Volet 3** : estimer le potentiel de **biodégradation** des **antibiotiques** par les communautés microbiennes du sédiment exposées à ces molécules

Ces 3 volets ont été mis en place lors de campagnes trimestrielles de prélèvements réalisées pendant 2 ans sur 2 sites de la rivière Arve et 2 sites du lac Léman dans les eaux françaises. Dans chacun de ces écosystèmes, nous avons sélectionné deux sites avec des niveaux de contamination en antibiotiques contrastés. Le premier site choisi sur le Léman (zone côtière naturelle, fig. 1 : L1) est situé à l'ouest de Thonon sur le site de Rovorée et est considéré comme peu impacté par les micro-polluants suite aux études de l'UMR CARTEL (Rimet et al., 2015). Le second site en zone côtière du port de Tougues (Chens sur Lemman, fig. 1 : L3) est soumis à une influence urbaine plus importante car il est situé à une centaine de mètres du rejet de la STEU de Douvaine (41 386 équivalents habitants). A noter que 2 suivis ont également été réalisés au site L2, proche du point de rejet des effluents de la STEU de Thonon, mais les prélèvements n'ont pas été poursuivis sur ce site à cause de difficultés techniques. Les deux sites sélectionnés sur l'Arve se trouvent à l'amont (A1, fig. 1) et à l'aval (A2, fig. 1) du rejet de la STEU de Bellecombe et présentent des niveaux de contamination en micro-polluants contrastés. En effet, l'Arve est le milieu récepteur d'une STEU, gérée par le Syndicat Intercommunal de Bellecombe qui a depuis 2009 une capacité de 32 000 équivalents habitants. De plus, depuis 2012, la STEU traite les rejets du nouveau Centre Hospitalier Alpes Léman d'une capacité de près de 500 lits (estimé à 2 000 équivalents habitants). Depuis 2011, SIPIBEL conduit une surveillance des entrées et sorties de la STEU (eaux brutes, eaux traitées et milieu récepteur : Arve) et de ce fait ce site pilote a cristallisé de nombreuses actions de recherche (e.g. programme ANSES PERSIST'ENV).

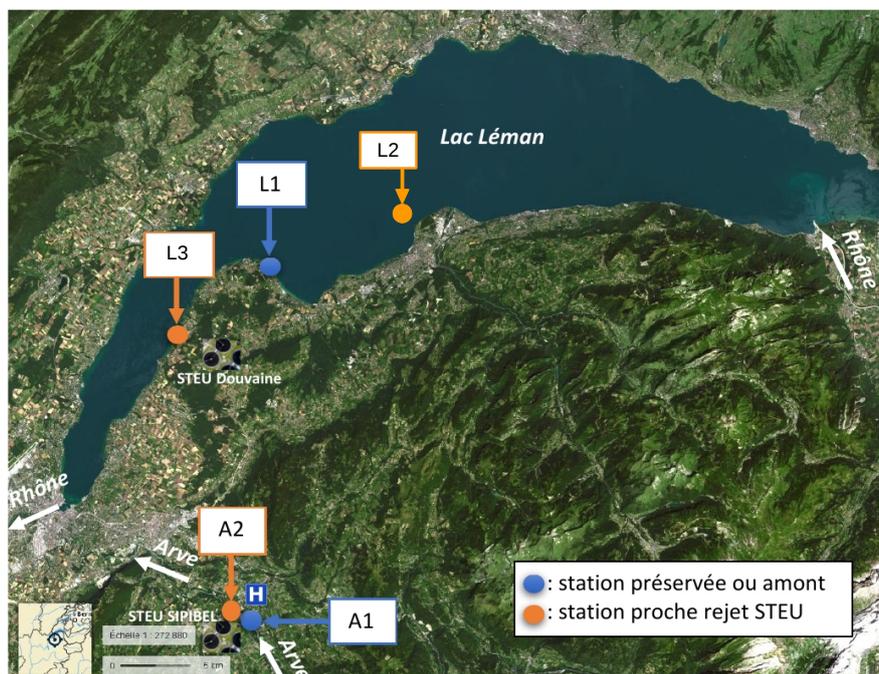


Figure 1 : Sites d'échantillonnage sur la rivière Arve (A1 : amont, A2 : aval) et sur le lac Léman (L1 : Rovorée, L2 : STEP – Dranse, L3 : STEP – Tougues).

Les premiers résultats de ces campagnes de prélèvement montrent la présence d'antibiotiques (Fig. 2) et de gènes d'antibiorésistance dans tous les compartiments (eaux de surface, biofilm, sédiments) des sites étudiés. Le type de contamination était variable selon le compartiment étudié, certaines substances étaient retrouvées majoritairement dans l'eau de surface (e.g. atenolol, sulfaquinoxaline), d'autres dans le biofilm (e.g. levofloxacine, sulfaméthazine, diclofenac) ou dans les sédiments (e.g. propranolol). Selon leur nature, ces points d'accumulation peuvent se comporter comme un vecteur de dissémination (e.g. le biote) ou comme un puits de contaminants (e.g. sédiments) avec un risque de relargage massif en cas de perturbation forte du milieu (e.g. remise en suspension des sédiments lors de crues).

L'abondance relative des éléments génétiques mobiles tels que les intégrons et des gènes de résistance aux antibiotiques était beaucoup plus élevée sur l'Arve que sur le lac Léman. L'abondance variait au cours du temps mais les profils de résistance étaient relativement stables au cours du temps. Dans toutes les communautés microbiennes étudiées, les éléments mobiles étaient présents en abondance. Les mesures de tolérance fonctionnelle montrent aussi une plus grande tolérance des communautés microbiennes de l'Arve que du Léman, surtout pour le biofilm. Malgré une variabilité temporelle importante, la tolérance aux antibiotiques était généralement plus élevée en aval de l'Arve qu'en amont (notamment pour l'érythromycine, l'ofloxacine, la sulfaméthazine chez les biofilms). Pour certains composés, notamment l'érythromycine, une corrélation positive a été observée entre abondance de gènes d'antibiorésistance et tolérance fonctionnelle néanmoins ce n'est pas le cas pour tous les antibiotiques étudiés. De plus, la résistance à un antibiotique spécifique dans un compartiment (biofilm ou sédiment) n'a pu être reliée à sa teneur dans le compartiment considéré. Dans quelques cas, le niveau de tolérance fonctionnelle reflétait la concentration en antibiotiques mesurées dans l'eau. Sur l'Arve, nos résultats ont mis en avant une augmentation des antibiorésistances en aval de la STEU, notamment chez les communautés microbiennes du biofilm. Les effluents de la STEU sont non seulement une source de substances pharmaceutiques mais également de bactéries antibiorésistantes susceptibles de s'installer dans le milieu récepteur et de contribuer à l'acquisition de tolérance microbienne et à la dissémination des gènes d'antibiorésistance.

Notre étude a permis de montrer que les communautés microbiennes du sédiment étaient capables de bio-dégrader les sulfonamides. Cependant les niveaux de biodégradation observés étaient assez faibles avec un maximum de 15 % de sulfaméthoxazole dégradé après 90 jours d'incubation pour les communautés microbiennes des sédiments prélevés à l'aval de l'Arve.

La base de données complète des résultats du projet Antibio-tools sera prochainement mise à disposition sur Data-INRAE et fera l'objet d'une analyse approfondie.

Partenaires impliqués dans le projet ANTIBIO-TOOLS

- **INRAE, UR RiverLy, équipe EMA (Écotoxicologie Microbienne Aquatique)** : coordination, réalisation des campagnes de prélèvements, caractérisation des sédiments, mesures des activités microbiennes et de la tolérance fonctionnelle microbienne aux antibiotiques (approche PICT).
- **INRAE, UMR CARTEL** : participation aux campagnes de prélèvements, caractérisation physico-chimique de l'eau de surface, caractérisation de la diversité microbienne.
- **UMR 7285, Institut de Chimie des milieux et des Matériaux de Poitiers, Université de Poitiers** : quantification des substances pharmaceutiques dans les différentes matrices étudiées.
- **UMR INSERM 1092, Université de Limoges** : détermination de l'abondance relative en gènes de résistance et intégrons chez les communautés microbiennes étudiées.
- **INRAE, UMR Agroécologie** : détermination du potentiel de biodégradation microbienne des sulfonamides.

Références

Carvalho, I.T., Santos, L. (2016). *Environ. Int.* 94, 736–757. Huijbers, P.M.C. et al. (2015). *Environ. Sci. Technol.* 49, 11993–12004. Johnson, A.C. et al. (2015). *Sci. Total Environ.* 511, 747–755. Mao, D. et al. (2014). *Environ. Sci. Technol.* 48, 71–78. Maugat, S. et al. *Saint-Maurice : Santé publique France ; 2016. 20 p.* O'Neill, J. et al. (2014) *Rev. Antimicrob. Resist.* O'Neill, J. et al. (2016) *Rev. Antimicrob. Resist.* Osorio, V. et al. (2016) *Sci. Total Environ.* 540, 267–277. Ruhí, A. et al. (2016) *Sci. Total Environ.* 540, 250–259. Tlili, A. et al. (2016) *Freshw. Biol.* 61, 2141–2151. Voulvoulis, N. et al. (2016) *Issues Environ. Sci. Technol.* 2016–January, 120–179

2. OBJECTIFS INITIAUX DU PROJET DE RECHERCHE

Le projet ANTIBIO-TOOLS a pour ambition d'explorer les liens entre antibiotiques, antibiorésistances et facteurs environnementaux dans les écosystèmes aquatiques. Ainsi, ce projet s'est articulé autour de 3 volets complémentaires décrits ci-après.

- Volet 1 : L'objectif de ce premier volet était de quantifier une série d'antibiotiques et d'antibiorésistances dans différents compartiments aquatiques (eau de surface, périphyton, sédiment) afin d'identifier des compartiments d'accumulation. La prise en compte des facteurs environnementaux (e.g. saison, facteurs physico-chimiques...) nous a également permis de mieux comprendre le rôle de ces facteurs dans la dynamique des antibiotiques et des antibiorésistances dans ces différents compartiments.
- Volet 2 : L'objectif de ce deuxième volet était de comparer plusieurs outils permettant de révéler la présence et l'importance des antibiorésistances :
 - la détection des gènes de résistance,
 - la quantification des intégrons,
 - la mesure de la tolérance des communautés microbiennes à partir de descripteurs fonctionnels (approches PICT).

Lors des différents suivis, nous avons pu confronter ces différentes méthodes de diagnostic des antibiorésistances dans une approche multi-compartiment, inédite à notre connaissance. Cette approche nous a permis (1) d'explorer les liens entre structure du résistome (évaluée par l'identification des gènes de résistance aux antibiotiques) et fonctions associées à ces résistances (augmentation de la tolérance et de la capacité de biodégradation) chez les communautés microbiennes exposées et également (2) de définir les avantages, les spécificités mais aussi les limites de chaque technique ainsi que leur champ d'application.

- Volet 3 : Ce troisième volet nous a permis d'estimer le potentiel naturel de biodégradation des antibiotiques par des communautés microbiennes du sédiment exposées à ces molécules. La biodégradation accélérée des antibiotiques a été récemment démontrée dans le compartiment terrestre, les analyses prévues dans le projet ont permis d'estimer son ampleur dans le compartiment aquatique et son influence potentielle sur les concentrations d'antibiotiques résiduelles et l'abondance des bactéries résistantes.

L'ensemble des connaissances et outils développés dans le projet ANTIBIO-TOOLS pourra être utilisé pour contribuer à la mise en œuvre de nouvelles approches de surveillance environnementale, participant ainsi à rendre opérationnel le concept « one health ».

3. TRAVAUX ET REALISATIONS DU PROJET

3.1 Campagnes de prélèvement

Le projet ANTIBIO-TOOLS repose sur 8 suivis de terrain sur la rivière Arve et le lac Léman qui ont été réalisés pendant 2 ans à différentes saisons (25 Oct. – 08 Nov. 2018, 28 Jan. - 26 Fev. 2019, 16 Avr. - 13 Mai 2019, 26 Août – 23 Sept. 2019, 19 Oct. - 25 Nov. 2019, 03 Fev – 09 Mars 2020, 04 Juin – 29 Juin 2020, 14 Sept. - 12 Oct. 2020).

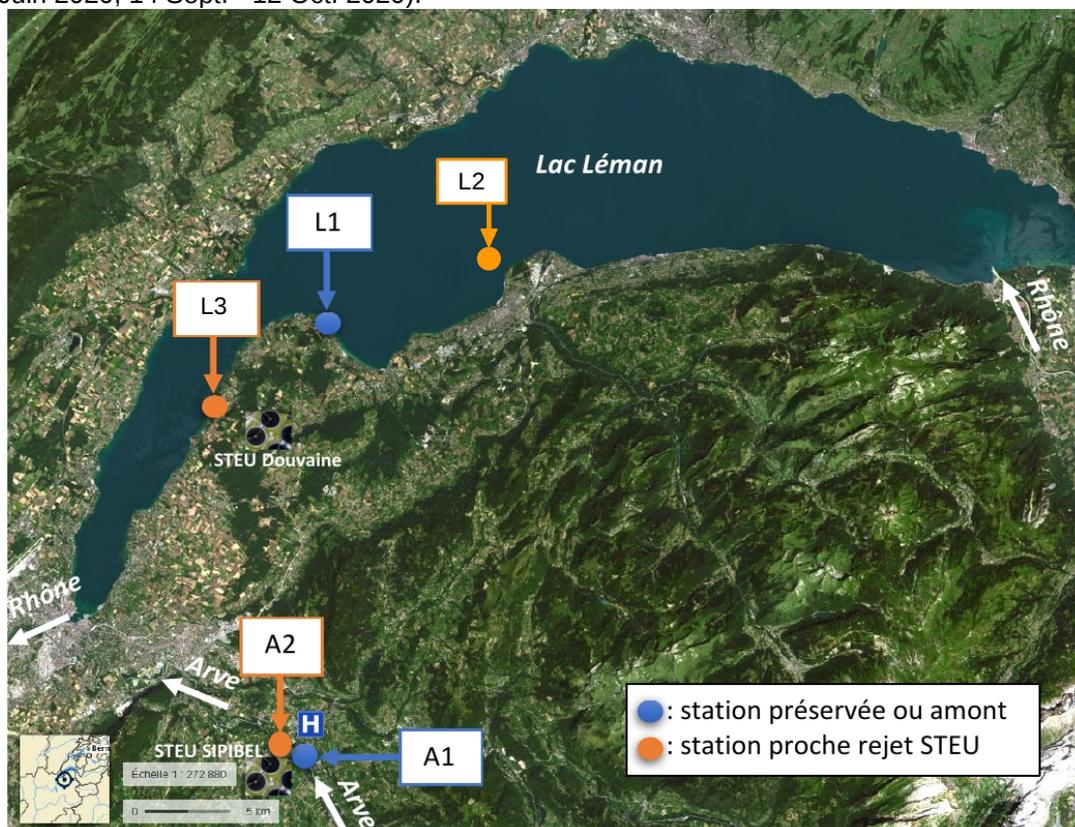


Figure 1 : Sites d'échantillonnage sur la rivière Arve (A1 : amont, A2 : aval) et sur le lac Léman (L1 : Rovorée, L2 : STEP – Dranse, L3 : STEP – Tougues).

Les sites de prélèvement sur l'Arve se situent en amont (GPS : 6,318333 / 46,13694444) et en aval (GPS : 6,312222 / 46,13388889) de la station d'épuration de Bellecombe (Fig. 1). Ces sites ont précédemment fait l'objet de suivis similaires (Chonova et al., 2016, 2018a, 2018b, 2019) que nos données viendront compléter.

Sur le lac Léman, le site de Rovorée (L1, Fig. 1) a été sélectionné car des études précédentes de l'UMR CARTEL suggéraient une faible contamination par les micro-polluants de ce site (Rimet et al., 2015). Nous avons également sélectionné un deuxième site sur le lac Léman (L2, Fig.1), ce site proche de l'embouchure de la Dranse était susceptible d'être plus contaminé par des micro-polluants car proche du rejet de la station d'épuration (STEU) de Thonon-les-Bains qui assure le traitement des eaux urbaines de Thonon (160 000 équivalents habitants) ainsi que des eaux usées des Hôpitaux du Léman (356 lits). Cependant, lors des 2 premières campagnes de prélèvement, il n'a pas été possible de prélever des sédiments sur ce site L2 malgré une recherche élargie autour du point de rejet de la STEU et l'utilisation de différentes méthodes d'échantillonnage (benne à sédiments de type ekman, carottier gravitaire). Cela s'explique par la pente élevée au fond du lac à cet endroit ainsi que par la présence de sédiment grossier, apporté notamment par la Dranse. De plus, les capteurs passifs (POCIS) immergés à ce site ont été détruits par la force des vagues malgré les précautions prises (immersion des POCIS en duplicats, dans des cagettes en inox percées de petits trous). Afin de pallier à ce problème, un autre site de prélèvement potentiellement affecté par les rejets urbains et accessible a été identifié : le site en zone côtière du port de Tougues (Chens sur Léman), situé à une centaine de mètres du rejet de la STEU de Douvaine (41 386 équivalents habitants) (L3, Fig.1). Lors de la 3^{ème} campagne, des sédiments ont pu être prélevés sur ce site et les POCIS ont pu être récupérés intègres, validant la faisabilité des campagnes de prélèvement sur ce site. Ainsi, les campagnes 1 et 2 ont été réalisées à L2 puis les campagnes 3 à 8 ont été réalisées à L3.

Sur chaque site et pour chaque temps de prélèvement, le déroulement des campagnes était similaire :

1. prélèvement d'eau de surface et immersion des cagettes en inox, pour la colonisation du biofilm, et des POCIS,
2. après 2 semaines d'immersion : changement des POCIS pour éviter la saturation de ces capteurs passifs,
3. après 4 semaines d'immersion : récupération des cagettes en inox contenant le biofilm, récupération des POCIS et prélèvement des sédiments et d'eau de surface.

Les POCIS, préparés par l'UMR 7285 à l'Institut de Chimie des milieux et des Matériaux de Poitiers, se composent d'une phase de type OASIS HLB, pour suivre les composés très polaires. La résine est séparée du milieu par des membranes en polyéthersulfone de $0.22\mu\text{m}$ et est pré-dopée avec un composé référence de performance (PRC) (déisopropylatrazine-d5 ; Desgranges, 2015) pour une calibration *in situ* à l'aide des références externes au milieu.

Sur chaque site, 3 cagettes en inox ont été immergées, ces cagettes contiennent 4 ou 5 longueurs de gaine plastique en polyéthylène basse densité PE-LD (Longueur ≈ 900 mm et largeur 40 mm) servant de substrat de colonisation pour les biofilms environnementaux. Dans 2 des 3 cagettes, un capteur passif POCIS était fixé ainsi qu'un capteur lumière-température (HOBO® Pendant Temperature/Light, 64K Data Logger ONSET). Après récupération, les cagettes en inox contenant les films plastiques colonisés par le périphyton étaient transportées dans l'eau du site jusqu'au laboratoire et les analyses sur le périphyton frais étaient réalisées dans les 24h suivant le prélèvement.

Sur chaque site, trois seaux contenant 1L de sédiment fin, tamisé à 2 mm, étaient prélevés et transportés au laboratoire. Pour les analyses sur matériel frais, le sédiment était conservé à 4°C au maximum 7 jours après le prélèvement. Pour les autres analyses, le sédiment était conservé à -20°C .

Lors de l'immersion des cagettes puis du prélèvement des cagettes et des sédiments, un prélèvement de l'eau de surface du site était réalisé pour analyser les nutriments et ions majeurs (PO_4^{3-} , NO_3^- , carbone organique total : COT, SO_4^{2-} , Cl⁻), les caractéristiques physico-chimiques (pH, température, conductivité, taux d'oxygène) ont été mesurées à l'aide de sondes portables (WTW). Le détail des analyses qui ont pu être réalisées est présenté dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Analyses effectuées après chaque campagne de prélèvement du projet ANTIBIO-TOOLS pour les différents compartiments étudiés : eau de surface, biofilm et sédiments. L'absence de croix indique que l'analyse n'a pas pu être réalisée pour différentes raisons : prélèvement de sédiments impossible, tests de toxicité aiguë non fonctionnels ou confinement.

Date de la campagne	Ecosysteme	Station	Eau de surface		Biofilm			Sédiments					
			Produits pharma & physico-chimie (via POCIS)	Nutriments & physico-chimie	Produits pharma	Gènes de résistance et intégrons	Tolérance fonctionnelle (P/CT)	Activités microbiennes & diversité	Produits pharma des sédiments	Gènes de résistance et intégrons	Tolérance fonctionnelle (P/CT)	Biodégradation des sulfonamides	Activités microbiennes & diversité
1	Rivière Ave	Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Rovoree	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Lac Leman	STEP – Dranse (L2)	POCIS détériorés	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	Lac Leman	STEP – Tougues (L3)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	Lac Leman	STEP – Tougues (L3)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	Lac Leman	STEP – Tougues (L3)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	Lac Leman	STEP – Tougues (L3)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	Lac Leman	STEP – Tougues (L3)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	Lac Leman	STEP – Tougues (L3)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Amont	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Aval	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Produits pharma : Quantification de 25 substances pharmaceutiques dont 16 antibiotiques
 Nutriments et physico-chimie : Mesure des nutriments et ions majeurs (PO₄³⁻, NO₃⁻, carbone organique total : COT, SO₄²⁻, Cl⁻), de température, conductivité, saturation en oxygène et pH
 Caractérisation des sédiments : Détermination de la granulométrie et du taux de matière organique des sédiments
 Gènes de résistance et intégrons : Détermination de l'abondance relative de ~ 80 gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques ou à d'autres polluants ainsi que des 3 intégrons principaux
 Tolérance fonctionnelle (P/CT) : Tests de toxicité aiguë à la ciprofloxacine (C), l'ofloxacine (O), la sulfaméthazine (SMZ) ou l'érythromycine (E)
 Activités microbiennes & diversité : Mesure des activités enzymatiques extra-cellulaires (beta-glucosidase, leucine aminopeptidase, phosphatase), de l'activité photosynthétique, des activités métaboliques potentielles : respiration, dénitrification, méthanisation.
 Biodégradation des sulfonamides : Analyse de la composition des communautés bactériennes (16S) et de diatomées (fBCL) par séquençage
 Mesure du potentiel de biodégradation de la sulfaméthazine et du sulfaméthoxazole (radiospirométrie)

3.2 Caractérisation des sites d'étude

Pour le Léman comme pour l'Arve, les valeurs de conductivité, d'O₂, de pH et de température étaient similaires entre le site préservé et le site proche des rejets de STEU. Néanmoins des variations saisonnières ont été observées, notamment pour la température avec une plus grande amplitude de variation sur le Léman (de 6 à 22°C au cours de l'année) que sur l'Arve (4 – 14°C). Les principaux nutriments quantifiés dans l'eau (Cl⁻, COT, NO³⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻) suivaient également des variations temporelles. Les teneurs en nutriments étaient proches entre les 2 sites étudiés du Léman alors que sur l'Arve, des teneurs légèrement plus élevées en nutriments ont été observées à l'aval du rejet de STEU par rapport à l'amont. La granulométrie des sédiments prélevés était variable au cours du temps sauf à la station Rovorée à laquelle la granulométrie des sédiments est restée stable au cours du temps avec une majorité de sable (refus > 200µm). Bien que la plupart des sédiments prélevés aient un faible pourcentage de matière organique (<3,5 %), les sédiments prélevés sur le site proche du rejet de STEU sur le Léman (STEP - Tougues) étaient en général plus riches en matière organique que ceux prélevés à Rovorée, les sédiments en amont de l'Arve étaient également plus riches en matière organique que ceux prélevés en aval.

Les activités microbiennes du sédiment et du périphyton sont également marquées par des variations saisonnières. La dénitrification et la respiration, mesurées *in vitro* par microchromatographie gazeuse au laboratoire, montrent une activité microbienne plus importante au site STEP-Tougues qu'à Rovorée et l'amont qu'à l'aval de la STEU sur l'Arve.

L'analyse de diversité (basée sur le séquençage des gènes 16S pour les bactéries et rbcL pour les diatomées) a mis en évidence une séparation claire entre les communautés microbiennes de l'Arve et du Léman. Sur la rivière Arve, les communautés microbiennes du biofilm avaient une composition proche entre l'amont et l'aval, la richesse et la diversité microbienne étaient également similaires entre les 2 sites (Fig. 2, 3). Sur le lac Léman, les biofilms du site STEP-Tougues ont une composition en diatomées différente des biofilms de Rovorée (Fig.2), de plus ce site est caractérisé par une richesse et une diversité microbienne plus importante que le site de Rovorée (Fig. 3).

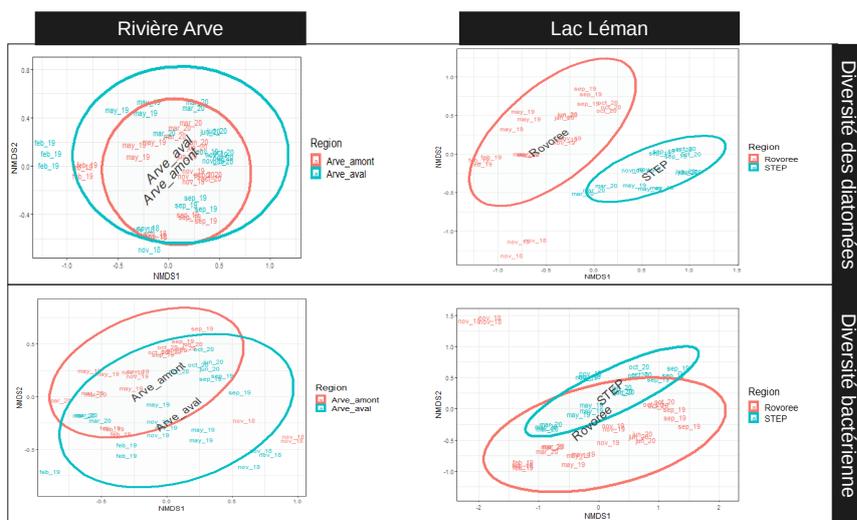


Figure 2: NMDS des communautés microbiennes des biofilms prélevés sur l'Arve et le Lac Léman lors des différents prélèvements. Le site STEP correspond au site STEP – Tougues.

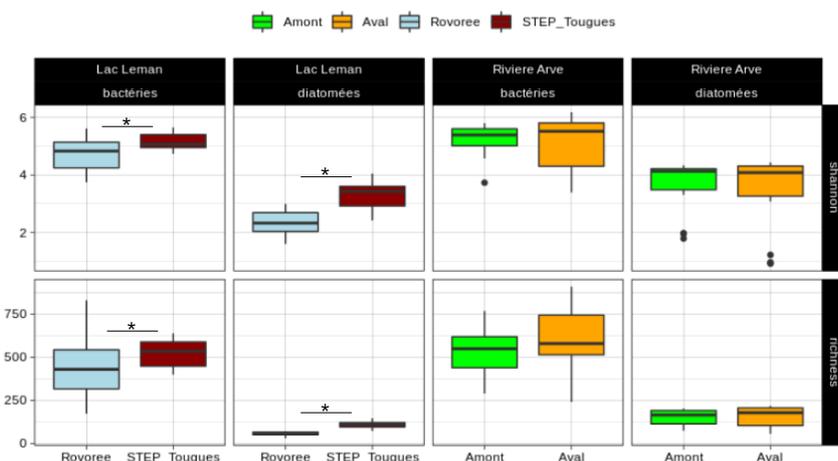


Figure 3 : indice de Shannon et richesse des communautés microbiennes de bactéries ou de diatomées prélevées sur le Lac Léman ou la rivière Arve lors des différents prélèvements. Les étoiles indiquent des différences significatives entre 2 sites (t-test, $p < 0.05$).

3.3 Volet 1 – Identifier & quantifier les antibiotiques dans différents compartiments aquatiques

A chaque campagne de terrain, 25 produits pharmaceutiques, dont 16 antibiotiques, ont été recherchés dans les différentes matrices environnementales étudiées : eau de surface, biofilm et sédiments (Fig.4).

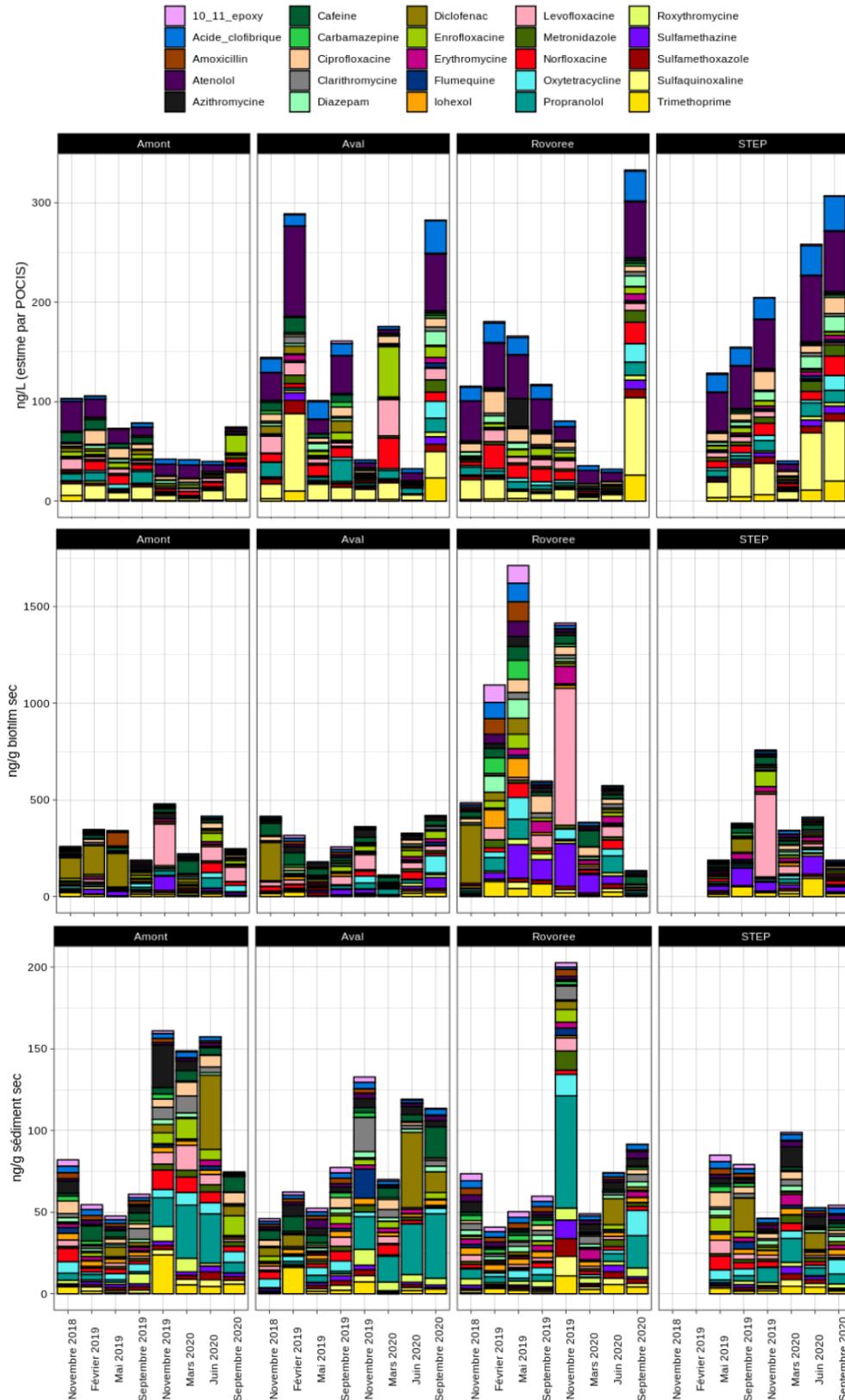


Figure 4: Concentrations en produits pharmaceutiques dans l'eau de surface (estimées à partir de POCIS), les biofilms et les sédiments des 4 sites étudiés au cours du temps

Le profil de contamination varie fortement entre les matrices, soulignant l'importance de l'approche multi-compartiment pour mieux cerner la contamination du milieu. Par exemple, l'acide clofibrique, l'aténolol ou la sulfaquinoxaline avaient les concentrations les plus élevées dans l'eau de surface alors que le diclofénac, la levofloxacine ou la sulfaméthazine se retrouvaient majoritairement dans les biofilms. Les sédiments quant à eux étaient caractérisés par de plus fortes concentrations en propranolol, azithromycine ou diclofenac. Ainsi, les sédiments et le biofilm représentent des réservoirs spécifiques à certains produits pharmaceutiques. Les concentrations mesurées ainsi que dans une moindre mesure le profil de contamination étaient variables au cours du temps dans toutes les matrices étudiées avec des pics de concentrations observés en Février 2019 et/ou Septembre 2020 pour l'eau de surface, en Mai et/ou en Novembre 2019 pour le biofilm et les sédiments.

Sur la rivière Arve, les concentrations en produits pharmaceutiques dans l'eau de surface étaient en moyenne plus élevées à l'aval du rejet de STEU qu'à l'amont mais cette tendance n'est pas observée dans les biofilms ou les sédiments. Sur le lac Léman, les concentrations de produits pharmaceutiques dans l'eau de surface et les sédiments étaient similaires entre les 2 sites avec des valeurs proches de celles retrouvées dans la rivière Arve. Les biofilms du site de Rovorée étaient les plus contaminés des 3 stations étudiées avec des concentrations en produits pharmaceutiques pouvant dépasser 1 µg/g de biofilm (notamment en Février, Mars et Novembre 2019).

3.4 Volet 2 – Plusieurs outils pour estimer l'antibiorésistance

L'abondance relative des éléments génétiques mobiles (MGE) tels que les intégrons et des gènes de résistance aux antibiotiques était beaucoup plus élevée sur l'Arve que sur le lac Léman (Fig. 5). L'abondance varie au cours du temps mais les profils de résistance sont relativement stables au cours du temps. Dans toutes les communautés microbiennes étudiées, les éléments mobiles étaient présents en abondance.

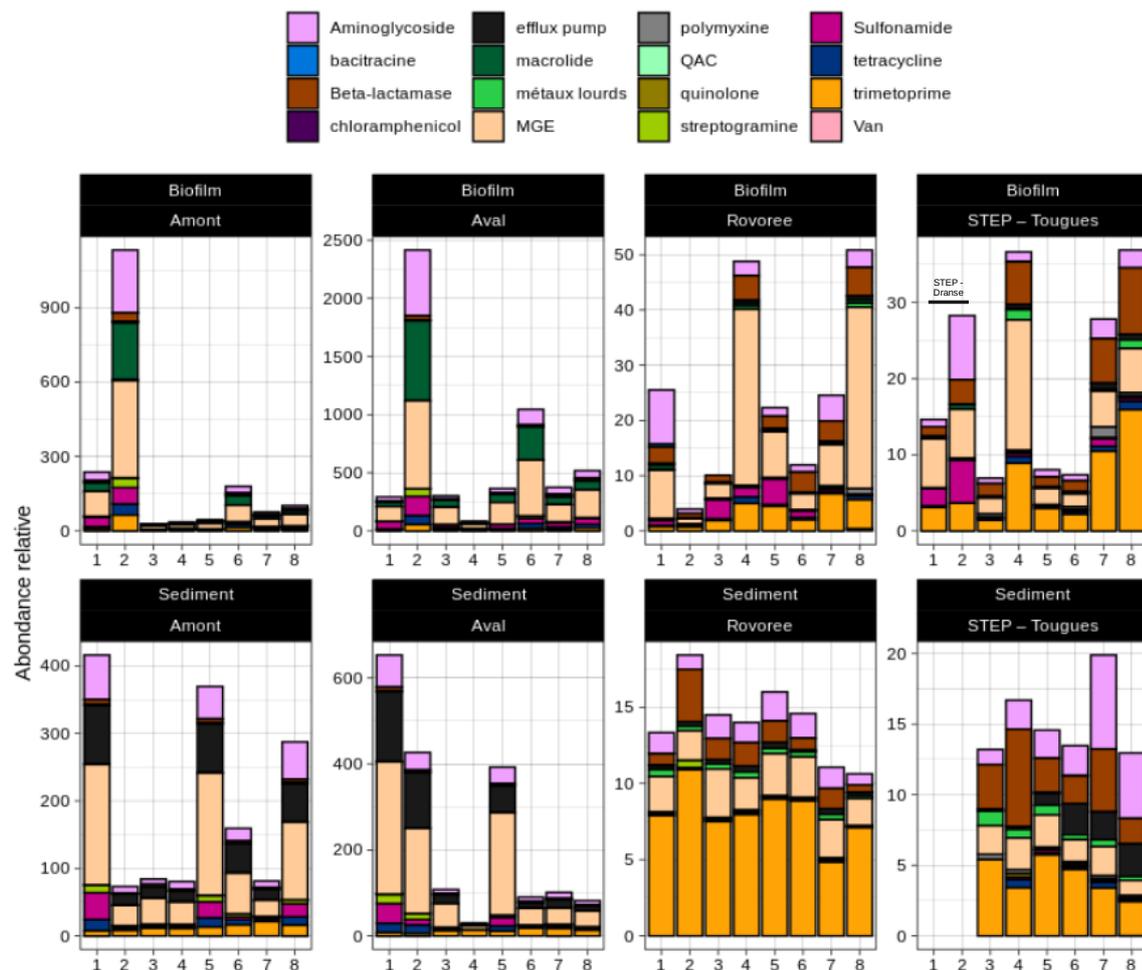


Figure 5 : Abondance relative d'éléments génétiques mobiles (MGE) et des gènes de résistance à différentes familles d'antibiotiques ainsi qu'aux métaux lourds chez les communautés microbiennes du biofilm et du sédiment lors des campagnes 1 à 8 du projet ANTIBIO-TOOLS.

Les mesures de tolérance fonctionnelle montrent aussi une plus grande tolérance des communautés microbiennes de l'Arve que du Léman, surtout pour le biofilm (Fig.6). Malgré une variabilité temporelle importante, la tolérance aux antibiotiques était généralement plus élevée en aval de l'Arve qu'en amont (notamment pour l'érythromycine, l'ofloxacine, la sulfaméthazine chez les biofilms).

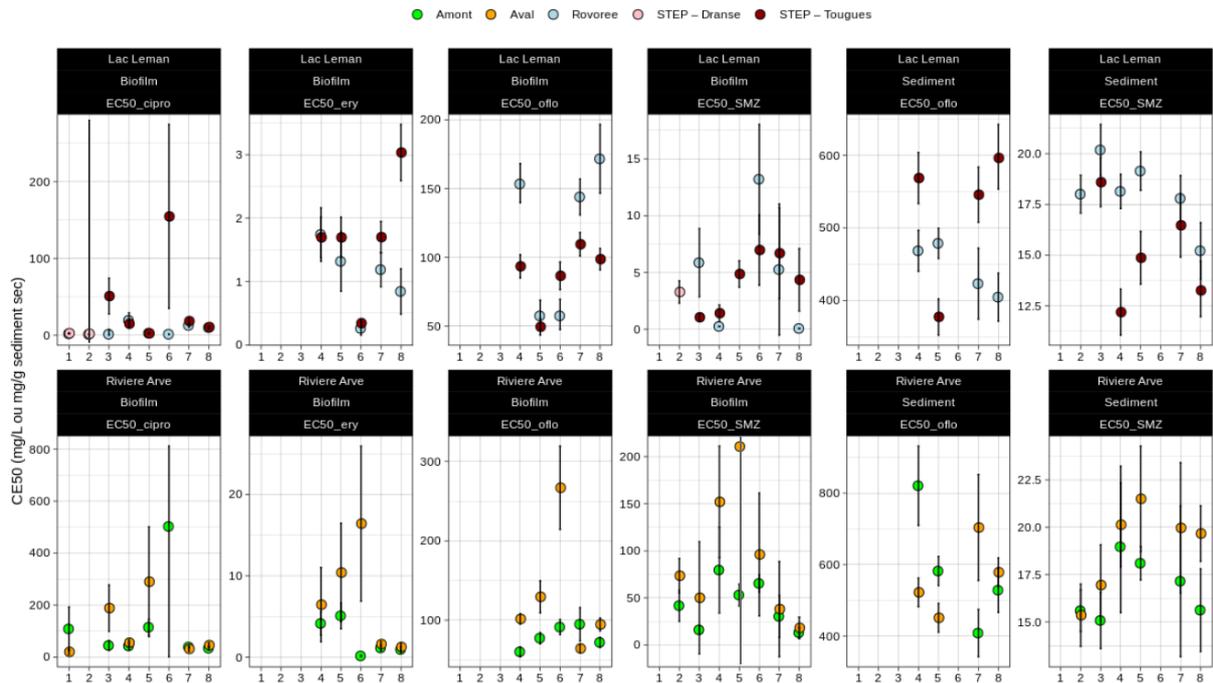


Figure 6 : CE50: concentration en ciprofloxacine (cipro), erythromycine (ery), ofloxacine (oflo) ou sulfaméthazine (SMZ) entraînant une réduction de 50 % de l'activité microbienne mesurée lors de tests de toxicité aiguë chez les communautés microbiennes du biofilm et du sédiment lors des campagnes 1 à 8 du projet ANTIBIO-TOOLS. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95 % de la CE50, lorsque 2 barres d'erreur ne se superposent pas les valeurs de CE50 sont considérées comme significativement différentes.

Chez les communautés de biofilm, pour certains antibiotiques, des corrélations ont pu être mises en évidence entre tolérance fonctionnelle estimée par le seuil de tolérance (CE50) et l'abondance relative de gènes de résistance (Fig. 7A-B). Ainsi, la CE50 des biofilms à l'érythromycine est positivement corrélée à l'abondance relative des de résistance au macrolide (corrélations de Pearson, $r = 0,8$; $p < 0,05$), cette corrélation est aussi observée entre la CE50 à la ciprofloxacine et l'abondance de gènes de résistance aux quinolones (corrélations de Pearson, $r = 0,32$; $p < 0,1$). Dans d'autres cas la corrélation est beaucoup plus faible, par exemple entre la CE50 à la sulfaméthazine et les gènes de résistance aux sulfonamides, indiquant la tolérance microbienne observée n'est pas uniquement l'expression des gènes de résistance. De plus, dans certains cas, la tolérance fonctionnelle est également corrélée à la présence d'éléments génétiques mobiles, illustrant l'importance de ces éléments dans l'acquisition de tolérance (Fig. 7C-D).

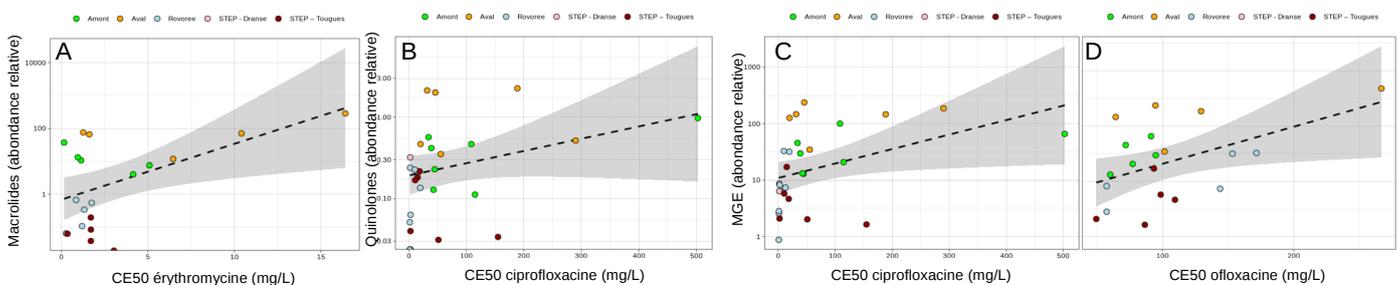


Figure 7 : Corrélations entre l'abondance de gènes de résistance aux macrolides et la CE₅₀ à l'érythromycine (A), l'abondance de gènes de résistance aux quinolones et la CE₅₀ à la ciprofloxacine (B), l'abondance d'éléments génétiques mobiles et la CE₅₀ à la ciprofloxacine (C) ou l'ofloxacine (D) chez les biofilms.

Chez les communautés microbiennes du sédiment, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre CE50 et gènes de résistance. Cela pourrait s'expliquer par les plus faibles niveaux d'antibiorésistance observés dans le sédiment ainsi que par l'amplitude plus faible de variations des CE50 et des abondances relatives, notamment sur le lac Léman.

Pour chacun des compartiment étudié, aucune corrélation significative n'a pu être établie entre l'antibiorésistance (estimée *via* l'abondance relative de gènes d'antibiorésistance ou *via* la CE50) à un composé et sa teneur dans le compartiment considéré (biofilm ou sédiments). Néanmoins, quelques corrélations significatives ont pu être observées avec les teneurs dans l'eau évaluées par les POCIS. Ainsi les CE50 des biofilms à l'érythromycine et à l'ofloxacine est positivement corrélées aux concentrations en enrofloxacin (corrélation de Pearson, $r > 0,7$; $p < 0,05$), levofloxacin (corrélation de Pearson, $r > 0,65$; $p < 0,05$) et norfloxacin (corrélation de Pearson, $r > 0,45$; $p < 0,05$) dans l'eau de surface. De même la CE50 des communautés microbiennes du sédiment à la sulfaméthazine est corrélée positivement à la concentration en sulfaquinoxaline dans l'eau de surface. L'abondance relative de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques (aminoglycoside, bacitracine, quinolone, streptogramine, sulfonamide, tetracycline) ainsi que celle des éléments génétiques mobiles sont corrélées à la concentration en caféine dans l'eau de surface (corrélation de Pearson, $r > 0,5$, $p < 0,05$).

3.5 Volet 3 – Évaluer le potentiel de biodégradation des antibiotiques des communautés microbiennes du sédiment

Une faible minéralisation des sulfonamides par les communautés microbiennes des sédiments de l'Arve et du lac Léman a été observée (Fig. 8). Les sédiments en aval de l'Arve présentent le plus fort potentiel de biodégradation avec jusqu'à 15 % de sulfaméthoxazole minéralisé après 90 jours d'incubation.

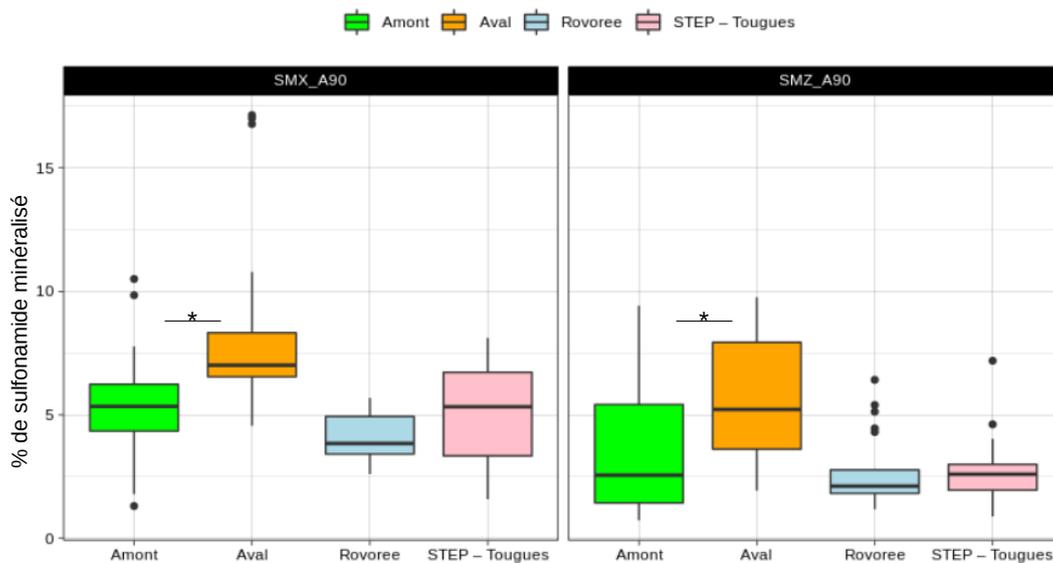


Figure 8 : Pourcentage de sulfaméthoxazole (SMX) ou de sulfaméthazine (SMZ) minéralisé après 90 jours d'incubation des sédiments des différents sites. Les étoiles indiquent des différences significatives entre 2 sites (*t*-test, $p < 0,05$).

Pour tous les sites étudiés, une biodégradation relativement importante du glyphosate a été observée avec 20 à 40 % du glyphosate initial minéralisé après 100 jours d'incubation. Bien que le potentiel de biodégradation soit variable au cours du temps, il est globalement plus élevé pour l'Arve, notamment à la station aval que pour les autres sites.

Résultats scientifiques

Les campagnes de prélèvement prévues dans le projet ANTIBIO-TOOLS ont été réalisées avec succès permettant la création d'une base de données complètes intégrant :

- la physico-chimie de l'eau de surface (température, conductivité, saturation en oxygène, pH, teneurs en nutriments et ions majeurs) et des sédiments (granulométrie, teneur en matière organique) ;
- les activités microbiennes du biofilm et des sédiments: activités enzymatiques, efficacité photosynthétique, potentiel de dénitrification, respiration, méthanisation ;
- composition de la communauté bactérienne et des diatomées (micro-algues) déterminée par séquençage de marqueurs génétiques spécifique (16S pour les bactéries et rbcL pour les diatomées)
- la concentration en 25 substances pharmaceutiques dont 16 antibiotiques dans l'eau de surface (*via* l'utilisation de capteurs passifs POCIS), le biofilm et les sédiments ;
- l'abondance relative d'intégrons et d'environ 80 gènes de résistances aux antibiotiques et à d'autres contaminants chez les communautés microbiennes du biofilm et des sédiments ;
- les seuils de tolérance (CE10, CE50) spécifique à certains antibiotiques (ciprofloxacine, ofloxacine, erythromycine et/ou sulfaméthazine) des communautés microbiennes de biofilm et sédiments ;
- les paramètres des cinétiques de biodégradation des sulfonamides par les communautés microbiennes des sédiments.

Une première analyse de cette base de données a permis d'obtenir les principaux résultats décrits ci-après.

Volet 1

La quantification de 25 substances pharmaceutiques a mis en lumière une contamination des 4 sites par ces substances à des concentrations relativement élevées. Les résultats obtenus pour le site de Rovorée, supposé éloigné des sources de contamination urbaine, posent question et invitent à s'intéresser plus en détails aux potentielles sources de contamination urbaine dans cette zone. La comparaison des teneurs en substances pharmaceutiques dans l'eau de surface en amont et en aval de la STEU de Bellecombe montre une légère augmentation de ces concentrations en aval, reflétant l'apport en substances pharmaceutiques par la STEU comme observé précédemment (Chonova et al. 2017).

La quantification de 25 substances pharmaceutiques dans l'eau de surface, les biofilms et les sédiments des 4 sites étudiés a permis de mettre en avant l'accumulation spécifique des substances pharmaceutiques. En effet, certaines substances sont retrouvées majoritairement dans l'eau de surface (*e.g.* atenolol, sulfaquinoxaline), d'autres dans le biofilm (*e.g.* levofloxacine, sulfaméthazine, diclofenac) ou dans les sédiments (*e.g.* propranolol). Le biofilm et les sédiments représentent donc des compartiments susceptibles d'accumuler des substances pharmaceutiques spécifiques. Dans notre étude, les concentrations retrouvées dans les sédiments sont proches de celles d'autres rivières européennes en zone urbaine (*e.g.* Osorio et al. 2016). Les concentrations en substances pharmaceutiques dans les biofilms sont relativement élevées, pouvant atteindre jusqu'à 1.5µg/g en comparaison à de précédentes études rapportant des valeurs proches du ng/g (*e.g.* Ruhi et al. 2015). Cette bioaccumulation interroge, notamment sur le risque de transfert trophique de ces substances aux consommateurs du biofilm tels que certains invertébrés ou poissons. Une analyse plus détaillée du jeu de données est nécessaire pour identifier les paramètres (*e.g.* log K_{ow}, poids moléculaire, température...) influençant l'accumulation des substances pharmaceutiques dans les différents compartiments étudiés.

Volet 2

Les gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que des intégrons, les éléments génétiques mobiles impliqués dans la résistance des bactéries à Gram négatif, ont été retrouvés dans les biofilms et les sédiments de tous les sites étudiés. Ces résultats illustrent l'ubiquité et la dissémination de ces antibiorésistances dans l'environnement et illustrent le rôle de réservoirs d'antibiorésistances que peuvent jouer ces compartiments (Calero-Cáceres et al., 2017). L'abondance relative de ces antibiorésistances subit de fortes variations saisonnières et est beaucoup plus élevée (jusqu'à 500 x) sur l'Arve que sur le lac Léman quelque soit le compartiment considéré. Sur l'Arve, une augmentation de l'abondance relative des antibiorésistances dans les biofilms en aval de la STEU par rapport à l'amont, témoigne de l'influence de l'apport de la STEU. Bien que la concentrations en substances

pharmaceutiques soient également plus élevées à l'aval de la STEU qu'en amont de l'Arve, aucune relation claire n'a pu être mise en évidence entre les concentrations en antibiotiques mesurées dans l'eau de surface, le biofilm ou les sédiments et les antibiorésistances associées. Une analyse plus détaillée du jeu de données sera réalisée pour rechercher d'autres paramètres (e.g. physico-chimie, débit) pouvant influencer l'abondance relative des antibiorésistances dans l'environnement.

L'approche PICT a permis d'évaluer la tolérance fonctionnelle des communautés microbiennes prélevées à une sélection d'antibiotiques lors de tests de toxicité aiguë. Pour certains antibiotiques comme l'érythromycine, la tolérance fonctionnelle était positivement corrélée aux gènes impliqués dans la résistance à cet antibiotique, suggérant que ces gènes d'antibiorésistance jouent un rôle important dans la tolérance observée. Cependant, cette corrélation n'a pas été observée pour les autres antibiotiques (quinolones ou sulfonamides) indiquant que d'autres mécanismes peuvent jouer un rôle important dans la tolérance microbienne à l'échelle de la communauté comme la sélection d'espèces naturellement plus résistantes (sans pour autant posséder de gènes d'antibiorésistance particuliers). De plus, la mesure d'abondance relative des gènes d'antibiorésistance est réalisée à partir d'extraits d'ADN et intègrent donc les cellules vivantes et actives mais aussi les cellules dormantes ou mortes alors que les mesures de tolérance intègrent uniquement la réponse des cellules actives. Pour certains antibiotiques (erythromycine et ofloxacine dans les biofilms, sulfaméthazine dans les sédiments), la tolérance microbienne aux antibiotiques reflètent les concentrations dans l'eau de surface des antibiotiques de la même famille mais ne sont pas corrélées aux concentrations dans les matrices étudiées (biofilm ou sédiment).

Sur l'Arve, nos résultats ont mis en avant une augmentation des antibiorésistances en aval de la STEU, notamment chez les communautés microbiennes du biofilm. Les effluents de la STEU sont non seulement une source de substances pharmaceutiques mais également de bactéries antibiorésistantes susceptibles de s'installer dans le milieu récepteur et de contribuer à l'acquisition de tolérance microbienne et à la dissémination des gènes d'antibiorésistance. Bien que l'analyse préliminaire n'ait pas mis en avant de différences importantes de composition entre les communautés bactériennes amont et aval, une analyse plus approfondie sera menée pour identifier la présence potentielle d'espèces bactériennes connues pour leur résistance aux antibiotiques en aval de la STEU sur l'Arve.

Volet 3

Les communautés microbiennes des sédiments de l'Arve et du lac Léman ont un faible potentiel de biodégradation des sulfonamides par rapport à ce qui est observé par exemple chez les communautés microbiennes du sol qui peuvent dégrader jusqu'à 20 % de la sulfaméthazine initiale après ~35 jours d'incubation (Billet et al. 2021). Néanmoins, Billet et al. (2021) ont mis en avant l'influence de différents facteurs (e.g. taux de matière organique, teneur en sulfonamides) sur le potentiel de biodégradation microbien. Ainsi le potentiel de biodégradation observé dans notre étude, notamment sur le site Aval, peut être stimulé selon les conditions environnementales (taux de matière organique, température, apport de bactéries dégradantes...).

Dans l'ensemble, ces premiers résultats du projet ANTIBIO-TOOLS confirment la **dissémination des antibiotiques et des gènes de résistance associés dans l'environnement aquatique**, même dans des endroits relativement éloignés de sources de contamination urbaine. Ces résultats mettent également en avant la spécificité de chacun des compartiments étudiés comme illustré par la différence dans le profil de contamination de l'eau de surface, des biofilms et des sédiments. Notre étude confirme également le rôle des STEU dans la dissémination des antibiotiques et antibiorésistances dans les milieux récepteurs. Les différents outils utilisés pour évaluer la résistance aux antibiotiques ont révélé des résultats contrastés, indiquant que la résistance aux antibiotiques des communautés microbiennes environnementales ne peut être réduite à la présence de gènes d'antibiorésistance.

Tableau de suivi de réalisation des tâches et d'utilisation des ressources

Le nom de certains partenaires a changé au cours du projet. L'équipe EMHA (Écologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés) s'est renommée EMA (Écotoxicologie Microbienne Aquatique). L'unité de recherche MALY dont faisait partie EMHA s'est renommée RiverLy. En 2020, Irstea et INRA ont fusionné pour former INRAE.

Pour chaque tâche initialement prévue ou décidée en cours de projet, préciser l'état d'avancement de la tâche : réalisée, retardée, révisée, abandonnée.

Tâche	Partenaire responsable	Etat d'avancement	Date de fin prévue	Principales réalisations
Echantillonnage : pose des POCIS, des substrats artificiels et prélèvements	EMA, UR RiverLy, INRAE (ex – EMHA, UR MALY, Irstea)	Réalisée		8 campagnes de prélèvements (Tableau 1)
Extraction d'ADN des communautés microbiennes du biofilm et des sédiments...	EMA, UR RiverLy, INRAE	Réalisée		95 échantillons de biofilm et 90 de sédiments extraits
Analyse de diversité des communautés microbiennes (bactéries et diatomées)	UMR CARTELL, INRAE (ex-INRA)	Réalisée		Séquençage et analyse de diversité des communautés microbiennes du biofilm et des sédiments
Tests de toxicité aiguë (PICT)	EMA, UR RiverLy, INRAE	Réalisée		
Préparation des POCIS	UMR 7285 (U. Poitiers)	Réalisée		POCIS fonctionnel
analyse des résidus médicamenteux dans les différentes matrices (POCIS, sédiments, périphyton) allant de l'extraction au dosage par LC-MS/MS.	UMR 7285	Réalisée		Quantification de 25 substances pharmaceutiques dans x POCIS, échantillons de biofilm et x échantillons de sédiment
Détection et quantification relative des gènes de résistance et des intégrons de classe 1, 2 et 3.	UMR INSERM 1092 (U. Limoges)	Réalisée		Détermination de l'abondance relative de ~80 gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et à d'autres polluants ainsi que des intégrons chez les communautés microbiennes du biofilm et des sédiments
Mesure du potentiel de biodégradation des antibiotiques par les communautés microbiennes du sédiment	UMR Agroécologie, INRAE	Réalisée		Réalisation de cinétiques de dégradation par les communautés microbiennes des sédiments de sulfaméthazine, sulfaméthoxazole et glyphosate radio-marqués

Liste du personnel financé par ou ayant contribué au projet

EMA (UR RiverLy, INRAE)

- Personnel financé et recruté sur le projet :
 - Anaïs Charton, INRAE, CDD ingénieure d'étude, 100 % du temps pour 20 mois
 - Maëlle Helly, INRAE, stagiaire en Master 2, 6 mois
 - Principal sujet d'intérêt : écotoxicologie microbienne aquatique
 - Responsable : Chloé Bonnineau et Stéphane Pesce
 - Titre de rapport : « Évaluation de l'impact des rejets de stations de traitement des eaux usées sur les communautés microbiennes benthiques d'un lac et d'une rivière »
- Personnes ayant contribué au projet :
 - Chloé Bonnineau, INRAE, Chargée de recherche, 6 mois
 - Stéphane Pesce, INRAE, Directeur de recherche, 1 mois
 - Bernadette Volat, INRAE, Ingénieur d'étude, 3 mois
 - Bernard Motte, INRAE, Assistant ingénieur, 3 mois
 - Christophe Rosy, INRAE, Technicien, 3 mois
 - Florian Favier, INRAE, stagiaire licence, 1,5 mois

UMR CARRETEL INRAE

- Personnes ayant contribué au projet :
 - Agnès BOUCHEZ / DR2 / INRAE CARRETEL / 6 jours
 - Emilie LYAUTEY / MCF / USMB CARRETEL / 9 jours
 - Teofana CHONOVA / CDD IR bioinformatique / INRAE CARRETEL / 9 jours
 - Viet TRAN-KHAC / IR responsable chimie / INRAE CARRETEL / 1 jour
 - Laura CREPIN / TR chimie / INRAE CARRETEL / 4 jours
 - Pascal PERNEY / TR chimie et prélèvement / INRAE CARRETEL / 4 jours + 2 jours prélèvement
 - Jean-Christophe HUSTACHE / TR prélèvement / INRAE CARRETEL / 2 jours prélèvement

UMR 7285 (Institut de Chimie des milieux et des Matériaux de Poitiers, U. Poitiers)

- Personnel financé et recruté sur le projet :
 - Maha AL BADANY, CNRS, ingénieure d'étude contractuelle, 100 % du temps pour 11 mois
- Personnes ayant contribué au projet :
 - Jérôme LABANOWSKI, CNRS, Chargé de recherche, 4 mois
 - Leslie MONDAMERT, Université de Poitiers, Maître de conférence, 4 mois

UMR INSERM 1092 (U. Limoges)

- Personnes ayant contribué au projet :
 - Christophe Dagot, U. de Limoges, Professeur, 1 mois
 - Marie-Cécile Ploy, U. de Limoges, Professeure hosp., 1 mois
 - Margaux Gaschet, U. de Limoges, Technicienne, 3 mois

UMR Agroécologie INRAE

- Personnes ayant contribué au projet :
 - Fabrice Martin-Laurent, INRAE, DR2, 1 mois
 - Marion Devers, INRAE, IE2, 1 mois
 - Nadine Rouard, INRAE, TR-EX, 3 mois
 - Jérémie Béguet, INRAE, IE2, 1 mois

4. DISSEMINATION DES RÉSULTATS ET TRANSFERT DE CONNAISSANCES

Liste des publications scientifiques

- Bonnineau C., Pesce S. *et al.* « Main drivers of functional tolerance to antibiotics in aquatic microbial communities from biofilms and sediments » - publication en préparation pour une revue de rang A (e.g. Aquatic Toxicology)
- Bonnineau C. *et al.* Data paper présentant la base de données issues du projet ANTIBIO-TOOLS - publication en préparation pour une revue de rang A.
- Mondamert L., Labanowski J. *et al.* « La contamination du Lac Léman et la rivière Arve par les substances pharmaceutiques – une étude de cas » - publication en préparation pour une revue à destination des gestionnaires (e.g. TSM)
- Dagot C. *et al.* Article de synthèse sur le résistome dans l'environnement intégrant les résultats du projet ANTIBIO-TOOLS et des projets PANDORE (financement ANSES), PERSEPHONE (cofinancement agence de l'eau) et ACRAS-R (financement ANR)

Participation à des manifestations scientifiques : posters et présentations

- 14-15 Mars 2018 - *Séminaire de présentation des projets APR2017*, Paris, France - **Présentation** orale du projet ANTIBIO-TOOLS
- 13 Juin 2019 - **Présentation** du projet au *comité de gestion de Sipibel* (Site pilote de Bellecombe)
- 24-25 Juin 2019 – *Congrès annuel de la Société d'Écotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA)*, Lyon, France - **Poster** « Résistance aux antibiotiques & impact écologique chez les communautés microbiennes benthiques exposées à la contamination urbaine »
- Nov. 2019 - *7^{ème} conférence Eau et Santé*, Villeurbanne, France - **Poster** «ANTIBIO-TOOLS : Des outils pour caractériser et suivre les antibiotiques et antibiorésistances dans les écosystèmes aquatiques »
- Oct. 2020 - *EcotoxicoMic 2020, 2^{ème} conférence internationale d'écotoxicologie microbienne* – **Présentation** orale : « The impact of urban contamination on antibioresistance in microbial communities from periphyton and sediments »
- Présentations prévues en 2022 :
 - Demande de poster au 32^{ème} congrès européen de la SETAC
 - Demande de communication orale à EcotoxicoMic 2022, 3^{ème} conférence internationale en écotoxicologie microbienne

Contribution à l'expertise

- Mars 2022 – Participation à l'organisation du **séminaire PharmAqua** centré sur la contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques: impacts écotoxicologiques et conséquences sur les antibiorésistances. Ce séminaire, rassemblant scientifiques et gestionnaires de l'environnement sur 3 jours, a pour objectifs :
 - de présenter et discuter les résultats de différents projets de recherche sur ce thème (projets ANR ANTIBIOTOX, ANSES PANDORE et ANTIBIO-TOOLS, AE RM&C COMMUSED et PHARMATOX) avec les scientifiques impliqués ;
 - de présenter les résultats-clés de ces projets à différents partenaires socio-économiques nationaux et régionaux (incluant une ouverture vers la Suisse) et de discuter des principaux enjeux autour de ces questions ;
 - d'identifier de futures pistes de recherche qui pourraient donner naissance à de nouveaux projets collaboratifs.

Produits issus des travaux

Les résultats du projet ANTIBIO-TOOLS seront mis à disposition sous forme d'une base de données hébergée par Data-INRAE

Communication au grand public

Aucune communication spécifique au projet ANTIBIO-TOOLS

5. RETOMBÉES ET PERSPECTIVES

Contribution à l'évaluation et à la gestion des risques sanitaires

Les premiers résultats du projet Antibio-tools montrent l'importance de **suivre les substances pharmaceutiques dans différents compartiments aquatiques** afin de rendre compte au mieux de la contamination du milieu et d'identifier les substances à risque de dissémination dans le biote (*i.e.* transfert trophique des substances bio-accumulées dans les biofilms) et celles susceptibles de s'accumuler dans les sédiments avec un risque de relargage massif en cas de perturbation forte du milieu (*e.g.* remise en suspension des sédiments lors de crues).

Nos travaux pointent également le rôle des STEU dans la dissémination des antibiotiques et antibiorésistances dans l'environnement. Cependant, il serait intéressant d'identifier l'importance relative des bactéries antibiorésistantes dans l'acquisition de tolérance aux antibiotiques des communautés microbiennes aquatiques.

Les différents outils de détection des antibiorésistances utilisées dans le projet ANTIBIO-TOOLS s'avèrent complémentaires. La détection de gènes d'antibiorésistance et d'intégrons permet de rendre compte de la dissémination des antibiorésistances potentielles dans l'environnement mais ne renseigne pas sur la tolérance effective des communautés étudiées. En complément, l'approche PICT permet de comparer la tolérance à un antibiotique spécifique entre 2 communautés pour identifier des stations propices à l'acquisition et au développement de l'antibiorésistance. Si l'approche PICT peut également renseigner sur la pression de sélection (*i.e.* la concentration en antibiotique dans le milieu), l'abondance relative en gènes d'antibiorésistance n'est pas clairement reliée au niveau de contamination suggérant que d'autres facteurs (comme l'apport de bactéries résistantes issues de STEU) jouent un rôle important dans la dissémination des antibiorésistances.

Jusqu'à présent, les souches bactériennes capables de biodégrader des antibiotiques ont principalement été isolées de sols contaminés aux antibiotiques, l'identification de communautés microbiennes sédimentaires capables de biodégrader les sulfonamides ouvrent des perspectives de potentielle bioremédiation des milieux aquatiques.

Poursuite des travaux

Préciser pour chaque partenaire quelle suite il est prévu de donner aux travaux menés dans le cadre de ce projet.

- *EMA (UR RiverLy, INRAE)* : analyse approfondie de la base de données ANTIBIO-TOOLS, poursuite des études sur les liens entre acquisition de tolérance microbienne et exposition dans les écosystèmes aquatiques via notamment le projet PharmaTox (financé par l'agence de l'eau R&MC). Les objectifs sont d'identifier et de mieux comprendre les facteurs induisant une acquisition de tolérance fonctionnelle chez les communautés microbiennes aquatiques.
- *UMR CARTELE INRAE* – collaboration avec EMA dans le cadre du projet PharmaTox.
- *UMR 7285 (Institut de Chimie des milieux et des Matériaux de Poitiers, U. Poitiers)* : mise à disposition des données de contamination chimique auprès des organismes gestionnaires intéressés par les sites étudiés (CIPEL, SM3A)
- *UMR INSERM 1092 (U. Limoges)* : construction d'une base de données résistome rassemblant les résultats de différents projets sur cette thématique (PANDORE, PERSEPHONE, ACRAS-R)
- *UMR Agroécologie INRAE* – collaboration avec EMA dans le cadre du projet PharmaTox.