

Exposition des eaux souterraines peu profondes à *Escherichia coli* résistant aux antibiotiques : approche hydrochimique pour identifier les sources et les voies de transfert

Julie LIONS¹, Alain HARTMANN², Anne TOGOLA¹, Guillaume DUYCK¹,
Monique FABRE³, Catherine NEUWIRTH⁴

¹ BRGM, Service géologique français, France.

² INRA Dijon UMR1347 Agroécologie, Pôle Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire: écologie microbienne, microbiologie, détection moléculaire, France.

³ Laboratoire départemental de la Côte d'Or (Contrôle de la qualité des eaux), France.

⁴ Laboratoire de Bactériologie, Plateau Technique de Biologie, CHU Dijon

RÉSUMÉ. – L'antibiorésistance est une préoccupation croissante en termes de santé humaine et animale au niveau international. *Escherichia coli* est responsable de nombreuses infections chez l'Homme comme les infections urinaires, mais aussi des infections plus sévères (septicémies). Le but du travail est de suivre l'impact des eaux usées sur la qualité de l'eau et d'évaluer la capacité des *E. coli* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération ou C3G (productrices de beta-lactamase à spectre élargi ou BLSE de type CTX-M) à se propager et survivre dans les eaux du bassin versant de l'Ouche (Bourgogne, France).

Une stratégie pour l'échantillonnage des eaux de surface et souterraines a été déployée selon les contextes hydrogéologiques, l'utilisation des terres et les rejets de STEU. L'approche hydrochimique s'appuie sur l'analyse des paramètres chimiques tels que les nitrates et le bore complétés par l'analyse de Terres rares dont le gadolinium et le suivi de produits pharmaceutiques (caféine, carbamazépine, paracétamol, ibuprofène).

Les premiers résultats montrent une contamination des eaux de surface par des souches d'*E. coli* productrices de BLSE. Cette dissémination est associée au rejet des eaux usées dans le milieu. On note néanmoins qu'au niveau de la nappe alluviale le transfert d'*E. coli* est nul à faible et celui des d'*E. coli* productrices de BLSE est nul. Dans ce contexte, la filtration des eaux de surface par les berges et potentiellement les temps de transfert jouent en faveur de l'épuration des *E. coli*. A l'inverse en secteur karstique, on note la présence d'*E. coli* productrices de BLSE au niveau des émergences. Contrairement aux eaux de la nappe alluviale qui bénéficie d'une épuration naturelle, les eaux karstiques semblent fortement vulnérables.

Mots-clés : résistance aux antibiotiques, *E. coli*, pathogènes, hydrochimie, eaux usées, karst, eaux souterraines, épuration naturelle

Shallow groundwater exposure to antibiotic resistant *Escherichia coli*: hydrochemical approach to identify sources and transfer pathways

ABSTRACT. – Antimicrobial resistance is a growing public health concern in European hospitals and communities. *Escherichia coli* is one of the most common agents of bacterial infection which causes urinary tract infections as well as more serious infections (septicemia). The aim of the project is to investigate the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* that are resistant to third generation cephalosporins, in waste water treatment plants in the Burgundy region and to monitor the impact of treated effluents on water quality in the Ouche watershed. CTX-M is a recently occurring ESBL, encoded by the blaCTX-M genes, which causes resistance to 3rd generation cephalosporins (3GC).

A regional strategy for sampling surface and ground waters had be carried out in relation to existing data, in order to evaluate the capacity of CTX-M producing *E. coli* to spread and survive in water resources.

To characterize the dissemination of ESBL producing *E. coli* in the aquatic system, we selected several sampling points according to hydrogeological contexts, land use and waste water plants with a particular interest for karst aquifers that are predominant in the studied area. For each sampling point, we combined microbial and chemical approaches. Inorganic elements (including trace elements) were analyses completed by REE (ie Gadolinium anomaly) and pharmaceutical products (caffeine, carbamazepine, ibuprofen and acetaminophen).

From the presence or absence of ESBL producing *E. coli*, we attempt to identify the sources and vectors of water contamination. The first results show the contamination of surface water with ESBL producing *E. coli*. This dissemination is associated with the discharge of treated sewage into the environment. Nevertheless, in alluvial aquifer transfers of *E. coli* is low to zero and ESBL producing *E. coli* is zero. In this context, surface water is filtrated by the river banks which prevent the *E. coli* migration toward ground water. On the opposite, in karstic area, we note the presence at low level of ESBL producing *E. coli* in ground water and springs. Unlike the waters of the alluvial aquifer, karstic waters are highly vulnerable.

Key-words: waste water, antibiotic resistance, *E. coli*, pathogens, groundwater, karts, hydrochemistry, natural purification

I. INTRODUCTION

L'émergence de souches résistantes aux antibiotiques est un phénomène mondial qui peut remettre en cause l'utilisation des antibiotiques. Chez les bactéries à Gram négatif non fermentaires de nombreuses bactéries multi-résistantes sont décrites et en particulier chez les entérobactéries où les souches productrices de beta lactamases à spectre élargi (BLSE) ont une incidence croissante. Le portage digestif chez l'Homme d'*E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M, codé par les gènes *bla*_{CTX-M} provoque une résistance aux céphalosporines de troisième génération (3GC). L'augmentation de ces occurrences devient inquiétante dans certains pays (jusqu'à 30 à 50% de la population). Cependant il existe peu de données sur l'existence de réservoirs environnementaux pour ces souches et sur leur capacité à survivre dans l'environnement et en particulier dans les eaux douces (eau de surface et eau souterraine) et dans les sols [Coleman *et al.* 2013 ; McKeon *et al.* 1995].

La migration des bactéries dans l'environnement est un processus complexe qui implique différents mécanismes physico-chimiques qui contrôlent leur mobilité. Le transfert de ces souches vers les eaux de surface et les eaux souterraines constitue un risque majeur pour le bon état qualitatif des eaux. Il est donc nécessaire de connaître les sources et les voies de dissémination de ces souches dans l'environnement afin de protéger la qualité des eaux et prévenir des risques sanitaires.

Le secteur étudié se trouve en Bourgogne avec un focus particulier sur le bassin versant de l'Ouche (à proximité de Dijon). L'Ouche est un affluent de la Saône, la superficie du bassin versant est de 916 km² pour une population totale de 262 000 habitants. Le cours d'eau s'étend sur près de 100 km, il draine un massif karstique sur l'amont principalement rural et forestier, l'agglomération de Dijon et un secteur agricole (agriculture intensive) sur l'aval. On rencontre également sur le bassin des industries notamment agro-alimentaires et pharmaceutiques. Ce cours d'eau recueille également les eaux usées de plusieurs STEUs dont une collectant les effluents d'un centre hospitalier.

Ce secteur présente deux grands types de géologie : le karst et la plaine alluviale qui ont chacune un fonctionnement hydro(géo)logique différent et relativement vulnérable aux pollutions. En effet, les massifs karstiques sont très vulnérables par comparaison avec les autres types d'aquifères (sédimentaire par exemple). Les capacités d'atténuation naturelle (ou auto-épuration) y sont très limitées car le pouvoir filtrant de la zone d'infiltration est faible, les temps de résidence sont très courts et la dispersion et la dilution sont faibles au sein du réseau de conduits. La présence de pertes permet à des eaux superficielles de s'infiltrer directement dans le réseau.

Les objectifs de ce travail sont de mettre en évidence la dissémination de souches résistantes aux antibiotiques dans les eaux de surface et les eaux souterraines. Par une approche hydrochimique, l'objectif est d'identifier et de caractériser les voies possibles de transferts de ces souches présentes dans les eaux usées et rejetées par les STEU voire épandues sur les sols agricoles (boues issues du traitement des eaux usées utilisées comme amendements organiques) en se basant sur l'analyse de marqueurs chimiques.

L'analyse des éléments chimiques et physico-chimiques est utilisée comme un outil permettant la caractérisation de l'eau et la compréhension des flux d'eau capables de mobiliser les souches *E. coli* et ainsi d'identifier l'origine des souches d'*E. coli* productrices de BLSE.

II. CONTEXTE

II.1. Site d'étude

Afin d'évaluer la capacité des souches productrices de BLSE à se disperser et à survivre dans les eaux, une stratégie d'échantillonnage des points d'eau sur le secteur a été élaborée en fonction du contexte hydrologique et hydrogéologiques et sur la base des données disponibles relatives, notamment à la présence d'*E. coli* dans les eaux qui est déterminée dans le cadre du suivi sanitaire des alimentations en eaux potables (AEP).

A partir des occurrences en *E. coli* connues dans les eaux souterraines, trois secteurs ont été identifiés :

- Des sources karstiques comportant des vignes et des STEU sur les bassins versants (7 points d'eau)
- La plaine alluviale de l'Ouche au niveau de Dijon, très vulnérable et pour laquelle des contaminations par des eaux usées ont déjà été décelées et le secteur de la STEU de Longvic collectant les eaux usées d'origine hospitalière (Seidel, 2012) (7 points d'eau).
- Un secteur en nappe alluviale de l'Ouche (secteur de Tart-le-Bas) à proximité d'une STEU et en aval de Dijon (3 points d'eau).

Pour chaque secteur, les points de prélèvements ont été sélectionnés afin d'échantillonner soit des sources, soit des eaux de surface (cours d'eau et étang) ou des eaux souterraines superficielles (puits et forages AEP) (Figure 1).

II.2. Approche hydrochimique

L'objectif de l'approche est d'acquérir les données sur les paramètres physico-chimiques et les éléments chimiques de manière à comprendre le fonctionnement hydrochimique du système mais également à tracer les eaux météoriques (isotope de la molécule de l'eau), ainsi que le traçage des eaux usées de STEU à l'aide de traceurs géochimiques tels que les Terres rares et le suivi des composés pharmaceutiques.

Les terres rares sont un ensemble d'éléments chimiques de caractéristiques similaires comprenant Ce, Gd, Sm, Dy, La, Tb, Er, Lu, Tm, Eu, Nd, Y, Ho, Pr, Yb. En l'absence de sources de contamination, les concentrations en terres rares dans les eaux souterraines dépendent des interactions eau-roche et de la géologie de l'aquifère. Ces éléments sont utilisés dans les eaux comme traceurs naturels des processus et des sources. Parmi les terres rares, le gadolinium (Gd) a fait l'objet d'une attention particulière car cet élément est un marqueur des apports anthropiques de type eaux usées. En effet, la source la plus importante de Gd dans les eaux de surface et souterraines est l'acide gadopentétique et autres sels de gadolinium, utilisés pour les diagnostics médicaux comme agent de contraste en IRM [Bau et Dulski, 1996]. Les rejets à l'environnement par les patients traités se font directement via les effluents de STEU ou les systèmes d'assainissement individuels. En effet, cet élément n'est pas métabolisé et reste en solution lui conférant les propriétés d'un traceur. L'anomalie en gadolinium est donc un bon indicateur des eaux usées dans les eaux naturelles [Lawrence and Bariel, 2010 ; Petelet-Giraud *et al.*, 2009]. Le suivi de composés pharmaceutiques peut s'avérer un bon traceur des eaux usées, à la fois dans les eaux de surface mais aussi dans les eaux souterraines [Rabiet *et al.*, 2006]. La prise en compte de molécules persistantes comme la carbamazépine et de molécules plus dégradables (comme le paracétamol, l'ibuprofène ou la caféine) peut permettre de mieux caractériser les apports et les temps de transferts des eaux usées vers les eaux.

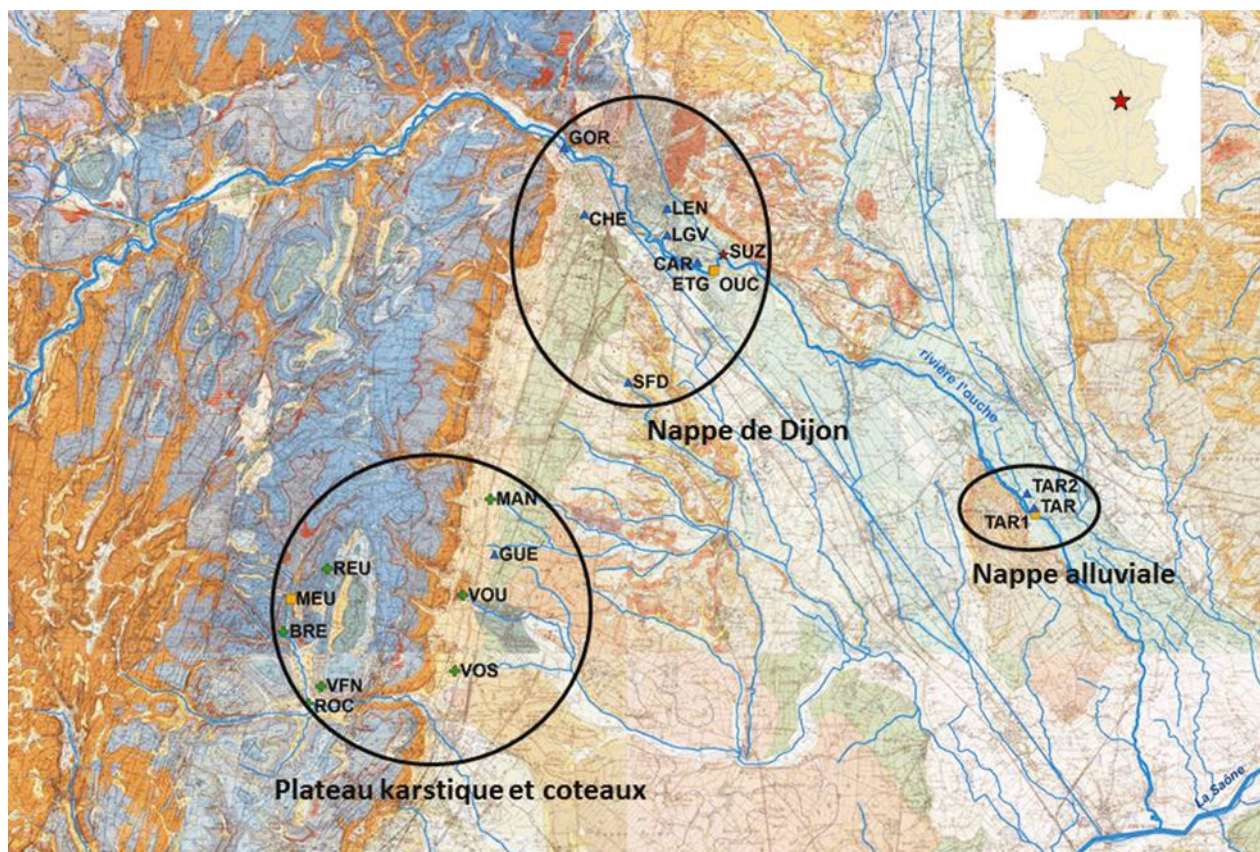


Figure 1: Carte géologique du secteur étudié et localisation des points prélevés.

II.3. Approche microbiologique

Les objectifs ont été de suivre simultanément la concentration en *E. coli* totaux (indicateur de contamination fécale) dans les eaux de surface, les eaux de nappe et les sources, et de détecter la présence au sein de ces population d'*E. coli* de souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) qui produisent une BLSE. La recherche de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques dans les eaux souterraines ou les sources est une originalité forte de ce travail. Les souches résistantes aux C3G ont été mises en évidence sur des milieux sélectifs supplémentés par une C3G, le céftaxime. Ces souches ont ensuite été caractérisées génétiquement pour les comparer aux souches cliniques retrouvées dans les infections humaines (isolées au CHU de Dijon, laboratoire de bactériologie) sur la même période.

III. OUTILS ET MÉTHODES

III.1. Chimie des eaux

III.1.1. Analyses des éléments inorganiques

Les eaux prélevées ont été filtrées à 0,45 µm sur des filtres PVDF et conditionnées avant analyse. Les échantillons destinés à l'analyse des cations, des éléments traces et des terres rares ont été acidifiés avec HNO₃ (suprapur) puis conservés à 4° C. L'analyse des cations majeurs a été effectuée par ICP-AES (incertitude analytique à 5 %), les éléments traces et les terres rares ont été dosés par ICP-MS (incertitude analytique à 5 %) après une étape de préconcentration sur résine en raison des faibles concentrations

dans les eaux. Le dosage des anions a été réalisé par chromatographie ionique (HPLC, incertitude analytique entre 5-10 %). Le dosage de l'alcalinité a été réalisé sur eau filtrée dans les 24 h par la méthode de Gran.

III.1.2. Analyses des substances pharmaceutiques

L'analyse de plusieurs composés pharmaceutiques a été choisie afin d'utiliser ces substances comme marqueurs de l'origine des eaux notamment des eaux usées. La présence de certains de ces composés pourrait également être associée à la présence de résidus antibiotiques. Ainsi, dans les échantillons prélevés les marqueurs suivants ont été analysés : caféine, carbamazépine, ibuprofène et paracétamol.

Les eaux prélevées ont été filtrées à 0,45 µm sur filtres PVDF et congelées avant analyse. Les composés sont ensuite analysés par SPE en ligne associée à un chromatographe en phase liquide et une détection par spectromètre de masse de type triple quadripôle [Togola, 2013].

III.1.3. Isotopes stables de l'eau

Les isotopes stables de l'eau comprennent ceux de l'oxygène (O) et de l'hydrogène (H). L'isotope oxygène-16 (¹⁶O) est le plus abondant (99.762 %), suivi du ¹⁸O (0.200 %) puis de l'¹⁷O (0.038 %). L'hydrogène consiste en deux isotopes stables, ¹H et ²H. Le rapport isotopique traduit le rapport entre la quantité d'isotope « lourd » par rapport à l'isotope « léger » d'un même élément, ce rapport étant normé par rapport à un standard de référence, exprimé en unité delta de déviation par rapport à ce standard.

On utilise la notation δ exprimée en parts pour mille (‰) avec : $\delta (\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \right] \times 1000$ où

R est le rapport isotopique, isotope lourd sur isotope léger (e.g. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$). Le standard de référence est le SMOW (Standard Mean Ocean Water) qui est une eau de mer moyenne, pris à 0 ‰.

Les analyses ont été réalisées par spectrométrie de masse. La précision des mesures est de +/- 0,1 ‰ pour l'oxygène, et de +/- 0,8 ‰ pour l'hydrogène.

III.2. *E. coli* et souches résistances aux antibiotiques

Au préalable, plusieurs protocoles d'échantillonnage des eaux souterraines ont été testés (filtration sur site ou en laboratoire). Compte-tenu de ces comparaisons, la filtration au laboratoire a été retenue sur la base du prélèvement d'eau brute de 5 L dans un récipient stérile. Les échantillons d'eau sont filtrés au laboratoire sur membrane Millipore HAWP 045 micro mètre à l'aide d'une rampe à vide dans les 24 h suivant le prélèvement. Les filtrats sont remis en suspension dans 3 ml de TS (tryptone 1g NaCl 8g par litre) et étalés sur milieu TBX (*E. coli*) ou TBX supplémenté par 1 ou 4 mg/l de cefotaxime (*E. coli* productrice de BLSE). En parallèle, le dénombrement d'*E. coli* a également été réalisé par le laboratoire Départemental de la Côte d'Or selon la méthode normalisée ISO 9308-1:2014(fr), méthode NPP miniaturisée.

Les profils de résistance des souches isolées sont ensuite caractérisés par diffusion en milieu gélosé. La production d'une BLSE est recherchée par le test de synergie. Il consiste à déposer côte à côte un disque contenant un inhibiteur (acide clavulanique) et des disques contenant une céphalosporine de troisième génération (céfotaxime, ceftazidime). La présence d'une synergie signe la production d'une BLSE.

Les souches d'*E. coli* présentant le phénotype BLSE sont ensuite caractérisées par MLST (Multi locus sequence typing) selon la méthode de référence [Wirth *et al.*, 2006].

Dans ces souches, les gènes $\text{bla}_{\text{CTX-M}}$ sont détectés et amplifiés par PCR puis séquencés pour définir leur appartenance aux différents groupes CTX-M.

Une collection de 50 souches cliniques d'*E. coli* résistant aux C3G et produisant une BLSE (Laboratoire de Bactériologie CHU Dijon) ont été caractérisées en utilisant les mêmes techniques.

IV. RÉSULTATS

A partir des résultats issus de la campagne d'échantillonnage réalisée en mars, il a été possible de localiser les occurrences en *E. Coli* et BLSE dans les eaux souterraines et les eaux de surface. La période d'échantillonnage correspond à une période de hautes-eaux.

IV.1. Chimie des eaux

L'analyse de la composition des eaux montre que l'ensemble des eaux présente un faciès carbonaté calcique (Figure 2). Certaines eaux karstiques montrent un faciès plus magnésien ce qui indique des interactions avec la roche mettant en œuvre la dissolution de dolomite ou de calcite magnésienne. Dans le secteur de Longvic, deux points d'eaux de surface (ETG et SUZ) présentent un enrichissement en chlorures.

Les isotopes de la molécule d'eau ($\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^2\text{H}$) sont des traceurs intrinsèques de la molécule d'eau qui permettent de tracer son origine et son histoire. En l'absence d'évaporation ou d'échange avec des gaz dissous, les isotopes stables de la molécule d'eau se comportent comme des traceurs conservatifs et reflètent la recharge, ou le mélange des différentes recharges, ayant alimenté les eaux souterraines considérées.

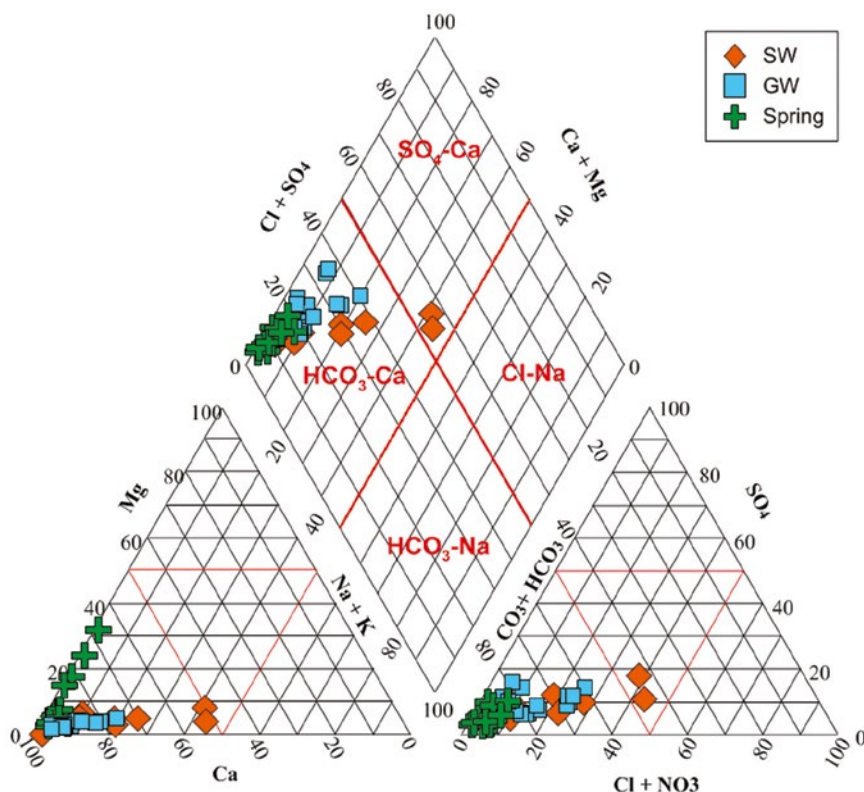


Figure 2 : Diagramme de Piper (GW : eau de la nappe, SW : cours d'eau, Spring : source karstique).

Les rapports isotopiques acquis dans le cadre de cette étude permettent de discriminer les eaux prélevées sur le plateau karstique, proches du signal des eaux météoriques tandis que les eaux de la plaine alluviale ainsi que les sources prélevées sur les coteaux et les eaux de surface sont influencées par l'évaporation.

IV.2. Traceurs des eaux usées

Les eaux échantillonnées présentent des signatures traduisant différentes pressions anthropiques. Ainsi on note des eaux souterraines principalement contaminées par des nitrates (jusqu'à 53 mg/l pour SFD) traduisant une pression agricole et des eaux plus concentrées en bore dans les eaux de surface collectant les rejets de STEU (Le Suzon, SUZ) et à proximité (ETG). Les autres points d'eau présentent une corrélation entre nitrates et bore (Figure 4).

Les concentrations en terres rares ont été normalisées avec celles d'un matériau de référence le « north american shale composite (NASC) ». Les anomalies sont quantifiées en calculant le rapport entre la concentration normalisée de l'élément de l'échantillon et la concentration normalisée que devrait avoir cet élément dans le cas où il n'y a pas d'anomalie. Il existe différentes méthodes pour estimer cette concentration. La méthode retenue moyenne les concentrations des plus proches voisins (Eu et Tb). Le bore et la carbamazépine (Figure 5 et Figure 4) permettent d'illustrer clairement l'influence des eaux usées issues des rejets de STEU dans les eaux de surface (SUZ, ETG) ainsi que dans la rivière l'Ouche en amont de la STEU de Longvic (OUC) et en zone alluviale à Tart-le-Bas (TAR). L'anomalie en gadolinium est observée dans les eaux de surface ainsi que sur plusieurs forages de la plaine de Dijon en association avec la présence de carbamazépine (Figure 5).

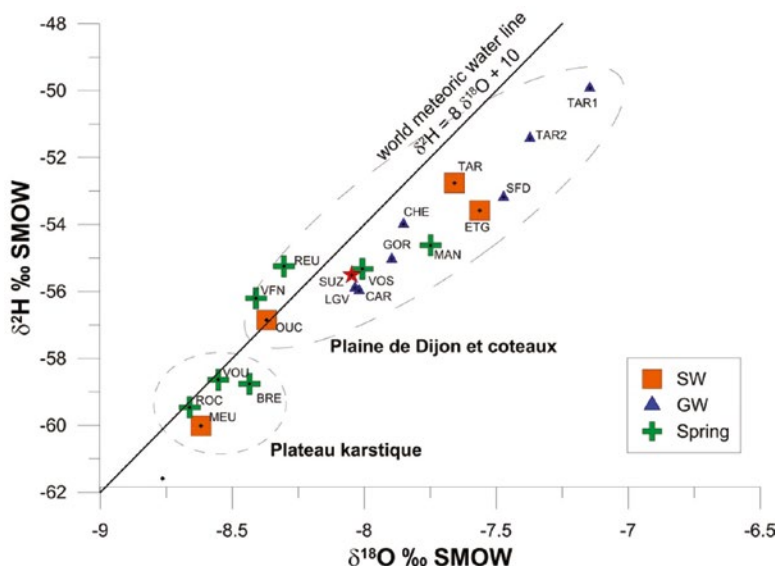


Figure 3 : Isotopes stables de l'eau.

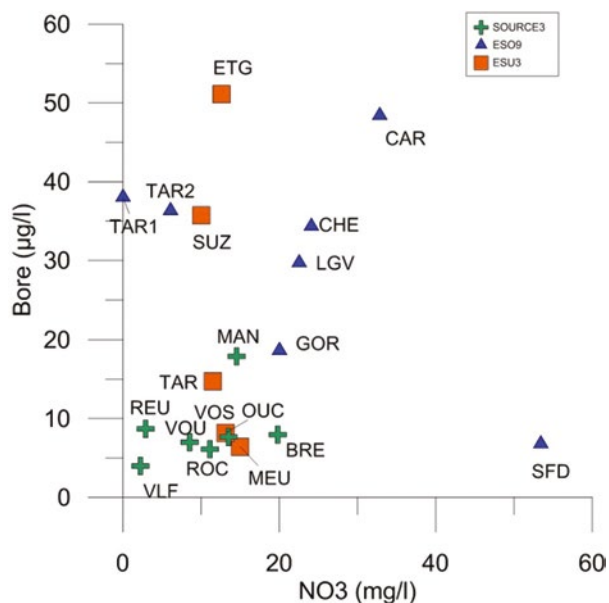


Figure 4 : Bore (µg/l) vs. Nitrates (mg/l).

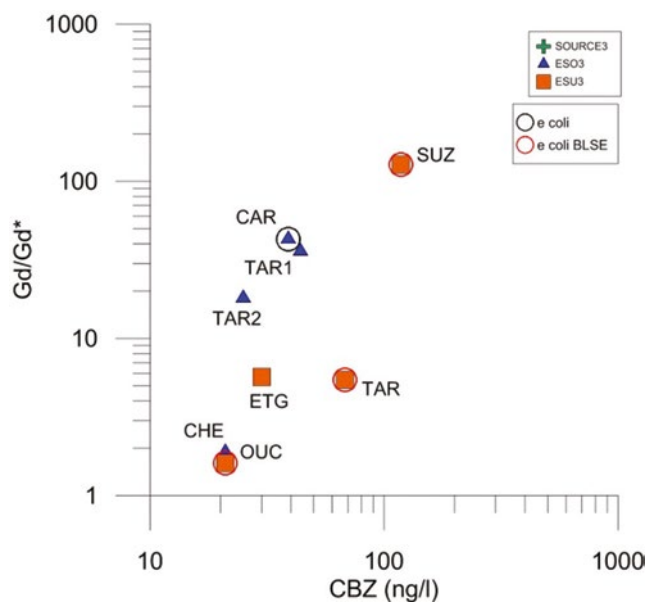


Figure 5 : Anomalie en Gadolinium vs. carbamazépine.

Associée à ces marqueurs, la présence de caféine, de paracétamol et d'ibuprofène est également observée dans les eaux de surface (Ouche et Suzon). Ces substances sont retrouvées uniquement dans les eaux de surface en raison de leur persistance relativement faible dans le milieu. La carbamazépine associée à ces molécules dans les eaux de surface est quant à elle également détectée seule dans les eaux souterraines en raison d'une meilleure stabilité. La carbamazépine comparée aux autres marqueurs permet d'appréhender les temps de résidence de ces eaux. En périodes de hautes eaux, on note que les sources karstiques ne présentent pas d'anomalie en gadolinium et les substances pharmaceutiques sont inférieures aux limites de détection, en lien avec le phénomène de dilution.

IV.3. Présence de *E. coli* et *E. coli* productrices de BLSE

Les premiers résultats montrent la présence d'*E. coli* sur les trois secteurs étudiés avec dans certains cas la présence de souche résistantes aux antibiotiques (*E. coli* produisant des BLSE).

E. coli productrices de BLSE et *E. coli* sont présents dans les eaux du SUZON (SUZ) drainant la STEU de Longvic ainsi que dans les eaux de la rivière l'Ouche (OUC, TAR, ETG). En combinant les traceurs chimiques à la présence d'*E. coli* et de *E. coli* BLSE, il est possible d'identifier les points d'eau contaminés par des eaux usées issues de STEU. Ainsi, on note une association entre la présence des souches *E. coli* et les eaux affectées par une contamination par des eaux usées marquées par la présence de bore, par

une anomalie en Gadolinium et Carbamazépine (Figure 4 et Figure 5).

L'absence de *E. coli* dans les eaux souterraines dans la nappe alluviale (TAR2, CAR) suggère, dans l'hypothèse d'une alimentation de la nappe par la rivière, que la filtration sur berges de la rivière est en mesure de retenir *E. coli* tandis que la CBZ et le Gd migrent vers les eaux souterraines. TAR1 est légèrement affectée par des *E. coli* mais pas de type BLSE.

Dans la zone karstique (Figure 6), *E. coli* et *E. coli* BLSE sont présents dans l'eau des sources (VOU, BRE) ainsi que dans le cours d'eau (MEU). Ces eaux ne semblent visiblement pas affectées par des eaux usées de STEU compte-tenu des concentrations en carbamazépine et en bore qui sont de bons indicateurs dans le secteur de Dijon. Dans ce contexte, on peut supposer que la source d'*E. coli* est différente des eaux usées de STEU. Néanmoins, en considérant la superficie du bassin versant concerné et le nombre d'habitant, il est possible que la CBZ ne soit pas un bon marqueur. De fait, une campagne complémentaire réalisée en basses-eaux permettra de compléter cette analyse.

En secteur alluvial et dans le secteur de Longvic, les échantillons d'eau contaminés par *E. coli* BLSE présentent, en association à cette contamination, des concentrations en carbamazépine mais également de la caféine, du paracétamol et l'ibuprofène. Cette association pourrait souligner le rôle du temps de séjour des eaux dans le système. De par leur persistance, les produits pharmaceutiques et *E. coli* sont identifiés dans le milieu lorsque le temps de séjour est court. Pour les eaux souterraines, il est nécessaire d'évaluer ces

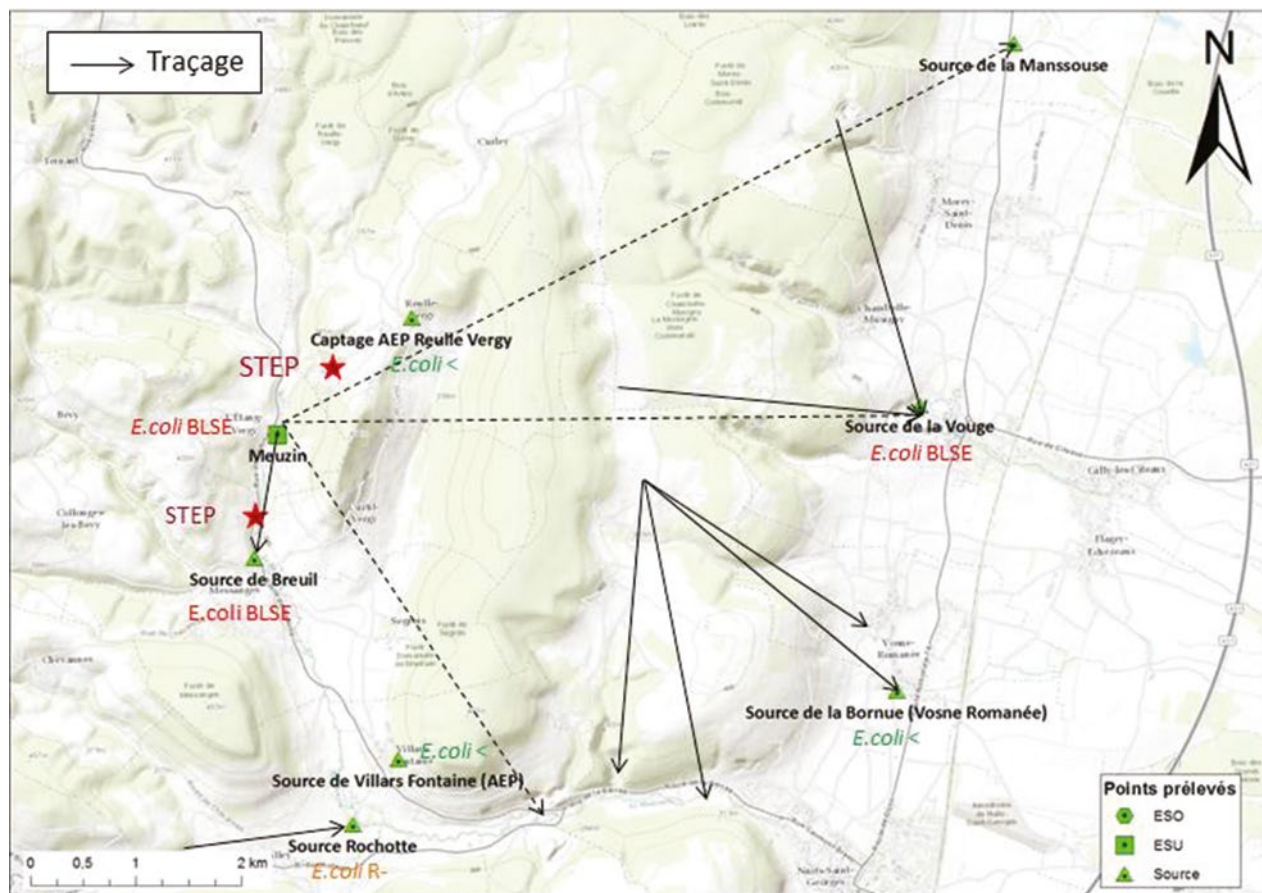


Figure 6 : Localisation des points d'échantillonnage des sources karstiques et cours d'eau.

temps de séjour pour distinguer s'il s'agit d'une atténuation naturelle contrôlée par le temps de séjour en lien avec le fonctionnement hydrogéologique ou bien par une filtration naturelle notamment aux niveau des berges et du sol.

IV.4. Caractérisation génétique des *E. coli* productrices de BLSE

Environ 50 souches d'*E. coli* productrices de BLSE ont été caractérisées par MLST. La présence d'un gène codant pour une BLSE a été recherchée dans l'ensemble des souches et ces gènes ont été séquencés pour déterminer leur identité. Au sein des 50 souches étudiées, 26 types de séquences (ST) ont été retrouvées grâce à l'analyse MLST, ce qui montre une forte diversité génétique des souches d'*E. coli* productrices de BLSE d'origine aquatique. Les génotypes dominants sont les ST10, ST349, ST131 et ST88. On notera que le génotype ST131 est connu comme un génotype retrouvé fréquemment dans les infections cliniques humaines de nature épidémique. Au moins 30 souches portent un gène blaCTX-M du groupe d'identité 1 (CTX-M groupe 1) qui est présent également majoritairement dans les souches cliniques. Environ 18 souches portent un gène blaCTX-M du groupe d'identité 9 (CTX-M groupe 9). Les séquençages complets des gènes sont en cours. Les génotypes ST 131, ST10 et ST88 sont bien représentés dans les souches cliniques collectées au CHU de Dijon. On note donc une similarité entre les génotypes d'*E. coli* environnementaux (issus de l'eau) et les souches cliniques collectées au CHU de Dijon sur le premier semestre de l'année 2014. Les ressources en eau pourraient donc constituer un réservoir pour ces souches et constituer une source de contamination potentielle pour l'Homme.

L'analyse des phénotypes de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* productrices de BLSE révèle de plus que ces bactéries sont multirésistantes (voir Figure 5) : en effet 94% de ces souches sont résistantes à au moins un autre antibiotique et pour certaines jusqu'à 11 autres antibiotiques en plus de la résistance aux C3G. Les eaux de surface et les eaux de nappes constituent donc un réservoir de *E. coli* multirésistantes.

V. CONCLUSIONS

La présence d'*E. coli* productrices de CTX-M dans les ressources en eaux souterraines et en particulier la persistance des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) tels que bla_{CTX-M} pourrait constituer un risque pour la santé. Ainsi à partir de l'analyse de la présence ou l'absence d'*E. coli* productrices de CTX-M, nous avons tenté de discriminer une typologie des secteurs contaminés et identifier les sources et les vecteurs de contamination de l'eau.

Une vingtaine de prélèvement d'eau de surface (rivière) et souterraine (source, captage, puits) ont été réalisés. Les premiers résultats montrent la présence d'*E. coli* sur ces trois secteurs associés à des contextes différents en termes de pressions et de vulnérabilité des ressources en eau (système karstique, nappe alluviale peu profonde, régime hydrologique des cours d'eau).

Les résultats montrent une contamination importante des eaux de surface (Ouche, Suzon) par *E. coli* et *E. coli* productrices de CTX-M. Dans ces secteurs, cette dissémination est associée au rejet des eaux usées dans le milieu. Ceci est confirmé par les marqueurs chimiques indiquant une contamination des eaux de surface et souterraines par des eaux usées (anomalie gadolinium, caféine, pharmaceutiques). On note cependant qu'au niveau de la nappe alluviale le transfert d'*E. coli* est nul à faible et que celui des *E. coli* BLSE est nul. Dans ce contexte, la filtration des eaux de surface par les berges et potentiellement les temps de transfert jouent en faveur de l'atténuation naturelle des *E. coli* qui sont éliminées des eaux.

En secteur karstique, on note la présence d'*E. coli* BLSE dans les eaux prélevées au niveau des sources karstiques. Contrairement aux eaux de la nappe alluviale qui sont marquées par les eaux usées (Anomalie Gd, caféine, pharmaceutiques), les eaux karstiques ne présentent pas de marqueurs des eaux usées. Ceci semblerait donc indiquer une contamination par *E. coli* ayant une autre origine. Néanmoins des marqueurs tels que le Gd et la CBZ peuvent se révéler moins pertinents sur de petits bassins versants, de plus la période de hautes-eaux peut contribuer à la dilution de ces

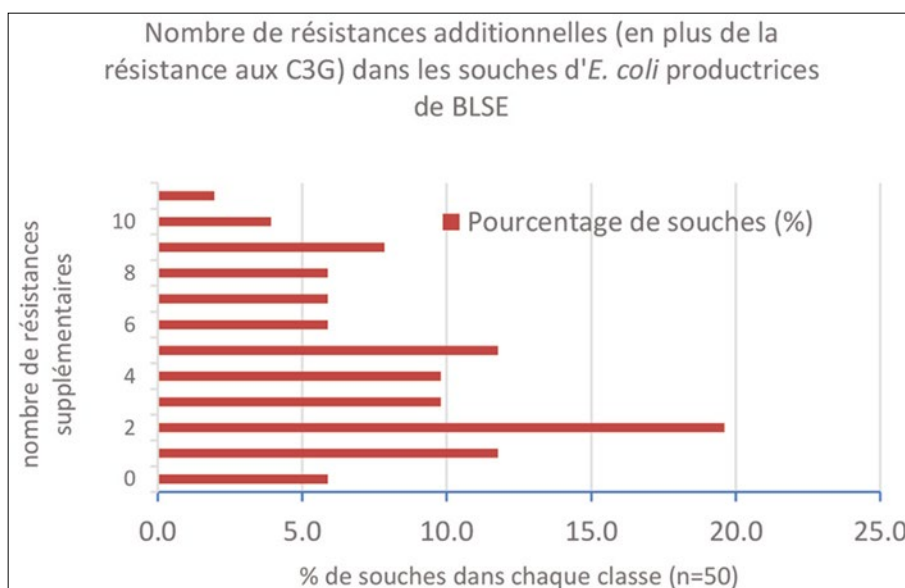


Figure 7 : Nombre de résistances additionnelles (en plus de la résistance aux C3G) dans les souches d'*E. coli* productrices de BLSE.

marqueurs. Une campagne de basses-eaux sera réalisée afin de poursuivre les investigations sur ce secteur.

Cette approche permet de mieux connaître la dissémination de ces souches dans l'hydrosystème au sein des cours d'eau, dans les systèmes karstiques mais également potentiellement vers la nappe alluviale en cas d'échange nappe-rivière selon les processus de filtration susceptibles de se mettre en place dans la zone hyporhéique (interface nappe-rivière) [Fotten *et al.* 2006]. Néanmoins la migration des bactéries dans le sol et les aquifères à l'échelle porale est un processus complexe du fait des interactions avec le milieu (rétention, sorption, complexation, dégradation) [Chen *et al.* 2008; Fotten *et al.* 2008]. Ainsi le couplage avec des marqueurs ayant des persurances différents dans le milieu permettent de contribuer à l'interprétation de ces données.

VI. REMERCIEMENTS

Ce travail est réalisé dans le cadre du projet collaboratif CIREC financé par l'ANSES dans le cadre du PNR EST 2013 (Programme national de recherche Environnement-Santé Travail).

VII. RÉFÉRENCES

- BAU M. AND DULSKI P. (1996) — Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river water. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **143** : 245-255.
- COLEMAN BL., LOUIE M., SALVADORI MI., MCEWEN SA., NEUMANN N., SIBLEY K., IRWIN RJ., JAMIESON FB., DAIGNAULT D., MAJURY A., BRAITHWAITE S., CRAGO B., MCGEER AJ. (2013) — Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant. *Escherichia coli*. *Water Res.*, **47** : 3026–3036.
- FOPPEN J. W. A. AND SCHIJVEN J. F. (2006) — Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. *Water Research*, **40** : 401-426.
- FOPPEN J. W. A., VAN HERWERDEN M., KEBTIE M., NOMAN A., SCHIJVEN J. F., STUYFZAND P. J., AND UHLENBROOK S. (2008) — Transport of *Escherichia coli* and solutes during waste water infiltration in an urban alluvial aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, **95** : 1-16.
- LAWRENCE M. G. AND BAREL D. G. (2010) — Tracing treated wastewater in an inland catchment using anthropogenic gadolinium. *Chemosphere*, **80** : 794-799.
- MACLER B.A., MERKLE J.C. (2000) — Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control. *Hydrogeol. J.*, **8** : 29 : 40.
- MCKEON D. M., CALABRESE J. P., AND BISSONNETTE G. K. (1995) — Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. *Water Research*, **29** : 1902-1908.
- PETELET-GIRAUD E., KLAVER G., AND NEGREL P. (2009) — Natural versus anthropogenic sources in the surface- and groundwater dissolved load of the Dommel river (Meuse basin): Constraints by boron and strontium isotopes and gadolinium anomaly. *Journal of Hydrology*, **369** : 336-349.
- RABIET M., TOGOLA A., BRISSAUD F., SEIDEL J. L., BUDZINSKI H. AND ELBAZ-POULICHET F. (2006) — Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment. *Environ. Sci. Technol.*, **40** : 5282-5288.
- TOGOLA A., N. BARAN AND C. COUREAU (2013) — Advantages of online SPE coupled with UPLC/MS/MS for determining the fate of pesticides and pharmaceutical compounds. *Anal Bioanal Chem.*, **406** : 1181-1191.
- WIRTH T., FALUSH D., LAN R., COLLES F., MENSA P., WIELER L.H., KARCH H., REEVES P. R., MAIDEN M. C., OCHMAN H., AND ACHTMAN M. (2006) — Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.*, **60(5)** : 1136-1151.