



**HAL**  
open science

# Approche One-Health et épidémiologie sanitaire pour l'étude de la dynamique de la dissémination environnementale de la résistance aux antibiotiques en Guadeloupe

Mélanie Pimenta

► **To cite this version:**

Mélanie Pimenta. Approche One-Health et épidémiologie sanitaire pour l'étude de la dynamique de la dissémination environnementale de la résistance aux antibiotiques en Guadeloupe. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2024. Français. NNT : 2024LIMO0014 . tel-04560419

**HAL Id: tel-04560419**

**<https://theses.hal.science/tel-04560419>**

Submitted on 26 Apr 2024

**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.

**Université de Limoges**  
**ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)**  
**UMR Inserm 1092 RESINFIT**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Santé publique, épidémiologie, environnement et sociétés

Présentée et soutenue par  
**Mélanie PIMENTA**

Le 26 mars 2024

**Approche One-Health et épidémiologie sanitaire pour l'étude de la  
dynamique de la dissémination environnementale de la résistance aux  
antibiotiques en Guadeloupe**

Thèse dirigée par Christophe DAGOT et Marie-Cécile PLOY

**JURY :**

Président du jury

M. Didier Hocquet, PU-PH, UMR CNRS 6249, Université de Franche-Comté

Rapporteurs

Mme. Sabine Favre-Bonté, MCU, UMR CNRS 5557, Université Claude Bernard Lyon 1

M. Didier Hocquet, PU-PH, UMR CNRS 6249, Université de Franche-Comté

Examineurs

Mme. Charlotte Arnal, Experte R&D, Veolia Recherche et Innovation

M. Xavier Bellanger, MCU, UMR 7564, Université de Lorraine

Mme. Marie-Cécile Ploy, PU-PH, UMR Inserm 1092, Université de Limoges

M. Christophe Dagot, PR, UMR Inserm 1092, Université de Limoges





À mes parents

*Le sentiment de mystère est le plus beau qu'il nous soit donné d'éprouver. Il est la source de tout art et de toute science véritable.*  
**Albert Einstein**

## Remerciements

---

Je remercie tout d'abord la Docteure Sabine Favre-Bonté et le Professeur Didier Hocquet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également la Docteure Charlotte Arnal et le Docteur Xavier Bellanger d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant qu'examineurs.

À mes directeurs de thèse, la Professeure Marie-Cécile Ploy et le Professeur Christophe Dagot, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir encadré sur ce beau projet. Merci de m'avoir fait grandir, autant personnellement que professionnellement, pendant ces trois années. J'ai beaucoup appris à vos côtés, vous m'avez donné de précieux conseils tout au long de ma thèse. Grâce à vous j'ai aussi eu l'opportunité de beaucoup voyager et présenter mon projet dans plusieurs congrès, des expériences très enrichissantes. C'était un réel plaisir de travailler avec vous pendant ces trois années.

Merci à tous nos collaborateurs, incluant les membres des équipes de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe, de l'Institut Pasteur de Paris et de l'université de Dresden de m'avoir accueilli au sein de vos équipes lors de mes déplacements. Merci Maria de m'avoir aidé à mieux comprendre et plus apprécier les statistiques. À toi Degrâce, on a commencé en même temps et on finit quasiment en même temps, à quelques jours près. Merci pour tous ces bons moments partagés lors de mes séjours en Guadeloupe. Je te souhaite pleins de belles choses pour la suite.

Je remercie également l'équipe de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance du CHU de Limoges pour votre accueil et votre aide pour les expériences d'exposome. Je tiens à remercier particulièrement Sylvain Dulaurent, pour avoir passé beaucoup de temps à me transmettre vos connaissances sur la LC-MS.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'UMR 1092. Merci pour votre accueil au sein de l'équipe et pour tous les moments conviviaux passés ensemble. Je vous remercie également pour vos encouragements sur cette fin de thèse. Merci Margaux pour m'avoir transmis tes connaissances et tes compétences sans lesquelles la réalisation de ma thèse n'aurait pas été possible. Merci Thibault pour ton implication dans mon travail depuis ton retour au laboratoire. Geoffrey, c'était un plaisir de passer beaucoup de temps à me moquer de toi, mais on a quand même quelques points en communs, notamment notre humour et nos goûts pour les mélanges culinaires un peu exotiques !

Je souhaite également une bonne fin de thèse à tous les doctorants, Sylvain, Morgane, Anne-Laure, Claire, Alain et Maxime.

Mathilde Hontaas, c'était un plaisir de t'encadrer au laboratoire pendant ton stage de Master 1. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

À mes co-bureaux, Morgane, Anne-Laure et Manon qui nous a rejoint, merci d'avoir rendu cette fin de thèse beaucoup plus agréable. C'était toujours un plaisir de vous retrouver tous les matins. Merci Anne-Laure pour ta bonne humeur constante, ton humeur égale, d'avoir toujours rigoler à mes blagues pas toujours drôles et pour toutes ces discussions parfois très absurdes. Manon, malgré qu'on ait des goûts très différents en matière de nourriture (tu n'aimes rien...), ta présence ces deux derniers mois a grandement participé à rendre cette fin de thèse plus joyeuse, merci de m'avoir surtout fait rire avec tes imitations presque réalistes. Morgane, je tiens particulièrement à t'exprimer ma profonde gratitude pour ton soutien infaillible depuis ton arrivée au labo. Tu es bien plus qu'une co-bureau, je suis heureuse d'avoir pu faire ta connaissance et d'avoir partagé tous ces moments à tes côtés et ça ne s'arrêtera pas là. Tu as été une binôme en or. Vous allez toutes me manquer et je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Un grand merci à ma famille, ma belle-famille et mes amis, qui, de près ou de loin, ont toujours su avoir les mots justes et m'ont toujours encouragé. Un grand merci à mes parents, pour m'avoir toujours soutenu malgré la distance qui nous a séparé pendant ces trois années. Vous avez toujours fait en sorte que j'ai les moyens de faire ce que je veux et d'aller le plus loin possible. Je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté, appris, et pour tout l'amour que vous m'avez donné. Sans vous, tout ce chemin parcouru n'aurait pas été possible.

À toi Ben, même si ça n'a pas toujours été facile d'être ta sœur, je suis fière d'avoir grandi en t'ayant comme modèle, d'avoir marché dans tes pas, c'est ce qui m'a mené jusqu'ici, et maintenant l'élève a dépassé le maître. Et merci d'avoir apporté dans la famille Clémentine et maintenant Marcelin, qui suivra, je l'espère, les traces de sa tante.

Merci Anne, Cyril, Gaëlle, Laurent, Calliopé, Jean-Luc, Thérèse et Jean-Marie pour m'avoir accueilli au sein de votre famille et m'avoir toujours encouragé dans mon projet. Et je remercie aussi tous ceux qui seront présents (Nguyen, François, Michelle et Louis), merci pour votre présence et votre soutien.

Damien, mon amour, tu ne le voulais pas mais tu auras quand même ton paragraphe dans mon mémoire puisque c'est principalement grâce à toi que j'en suis arrivée à bout. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, de m'avoir apporté tout ton soutien et d'avoir été aux petits soins tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir redonné confiance et d'avoir été là dans les moments où

j'en avais le plus besoin. Tu as fait de chaque moment partagé ensemble des moments de pur bonheur, qui m'ont permis de penser un peu à autre chose que la thèse. Tu as été mon pilier du début à la fin, sans toi je n'y serai pas arrivé. Merci pour tout, je t'aime !

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Introduction .....	17
A. Revue de la littérature .....	19
I. Les antibiotiques et la résistance aux antibiotiques .....	20
I.1. Définition et découverte des antibiotiques .....	20
I.1.1. Les mécanismes d'action des antibiotiques .....	21
I.2. Résistance naturelle et résistance acquise.....	24
I.2.1. Résistance par mutation .....	24
I.2.2. Transferts horizontaux de gènes.....	24
I.2.3. Diversité des éléments génétiques mobiles.....	26
I.3. Les mécanismes de résistance bactériens aux antibiotiques.....	31
II. Les voies de transmission de la résistance selon le concept One-Health.....	35
II.1. Le concept One-Health.....	35
II.2. La résistance aux antibiotiques chez l'Homme et l'animal.....	36
II.2.1. Consommation et résistance chez l'Homme .....	36
II.2.2. Consommation et résistance chez les animaux .....	42
II.3. Les voies de transmission de la résistance dans les compartiments One Health.....	45
II.3.1. Transmission entre Homme .....	45
II.3.2. Transmission entre animaux.....	47
II.3.3. Transmission Homme – Animal .....	48
II.3.4. Transmission Homme – animal et environnement.....	50
II.3.4.1. Les stations de traitement des eaux usées .....	51
II.3.4.3. L'épandage des boues de STEU .....	56
II.3.4.4. L'épandage du fumier et du lisier .....	57
II.4. Évaluation du risque : les indicateurs et suivis environnementaux .....	61
III. Les facteurs environnementaux liés à la dissémination des gènes de résistance : le rôle de l'exposome .....	65
III.1. Définition de l'exposome.....	65
III.2. Antibiotiques et molécules pharmaceutiques non-antibiotiques.....	65
III.3. Les biocides .....	69
III.4. Les métaux lourds .....	72
IV. Travaux précédents.....	76
Objectifs .....	77
B. Matériels et Méthodes .....	79
I. Les campagnes d'échantillonnage en Guadeloupe.....	80
I.1. Continuum CHUG – STEU de Jarry .....	81
I.2. Continuum touristique et non-touristique.....	82
II. Extraction d'ADN.....	84
III. Analyse de l'exposome.....	84
III.1. Molécules antibiotiques, non-antibiotiques et biocides .....	84
III.1.1. Extraction en phase solide.....	85
III.1.2. Méthode de LC-MS pour la détection des molécules de l'exposome.....	85
III.2. Métaux lourds .....	87
IV. Analyse du microbiome par séquençage de l'ARNr 16S .....	87
V. Analyse du résistome par Fluidigm PCR .....	88
VI. Détermination du risque de l'exposome sur la résistance.....	89
VII. Analyses biostatistiques.....	90
C. Résultats.....	91

I.	Caractérisation de l'exposome, du microbiome et du résistome de la Guadeloupe.....	92
I.1.	Analyse de l'exposome.....	92
I.1.1.	Continuum CHUG – STEU de Jarry .....	92
I.1.2.	Continuum touristique et non-touristique .....	98
I.2.	Analyse du microbiome.....	103
I.2.1.	Continuum CHUG – STEU de Jarry .....	103
I.2.2.	Continuum touristique et non-touristique .....	106
I.3.	Analyse du résistome.....	110
I.3.1.	Continuum CHUG – STEU de Jarry .....	110
I.3.2.	Continuum touristique et non-touristique .....	118
II.	Facteurs pouvant impacter la résistance .....	127
II.1.	Impact de la pandémie de COVID-19 sur la résistance .....	127
II.1.1.	Influence sur l'exposome.....	128
II.1.2.	Influence sur le microbiome .....	129
II.1.3.	Influence sur le résistome .....	131
II.2.	Influence de la saisonnalité sur la résistance.....	133
II.2.1.	Influence sur l'exposome.....	134
II.2.2.	Influence sur le microbiome .....	136
II.2.3.	Influence sur le résistome .....	137
II.3.	Évaluation du risque de l'exposome sur la résistance.....	139
II.3.1.	Élimination des molécules par les STEU .....	139
II.3.2.	Évaluation du risque .....	142
II.3.3.	Relations entre la présence des antibiotiques et des gènes de résistance .....	144
II.4.	Impact du tourisme.....	145
III.	L'approche One-Health pour l'évaluation des voies de transmission.....	164
III.1.	Comparaison de la composition taxonomique.....	164
III.2.	Comparaison du résistome dans les compartiments « One-Health ».....	165
D.	Discussion.....	168
I.	Caractérisation du microbiome et du résistome en Guadeloupe .....	169
	Conclusion.....	183
	Références bibliographiques .....	185
	Annexes .....	223



## Table des illustrations

---

Figure 1 : Chronologie de l'apparition en clinique des classes d'antibiotiques, colorées en fonction de leur origine .....	21
Figure 2 : Cibles et mécanismes d'action des différentes classes d'antibiotiques .....	24
Figure 3 : Représentation schématique des trois mécanismes bactériens de transfert horizontal de gènes .....	26
Figure 4 : Structure des éléments transposables impliqués dans le transfert horizontal de gènes .....	29
Figure 5 : Structure fonctionnelle d'un intégron de résistance .....	31
Figure 6 : Mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques .....	34
Figure 7 : Représentation schématique du concept One-Health .....	36
Figure 8 : Évolution de la consommation des antibiotiques en ville et en établissement de santé entre 2009 et 2021 et entre 2012 et 2021 respectivement.....	37
Figure 9 : Consommation des antibiotiques en France métropolitaine et en outre-mer en établissement de santé et en ville en 2021 .....	38
Figure 10 : Évolution des ventes globales d'antibiotiques vétérinaires en mg/PCU et des ventes de fluoroquinolones, d'autres quinolones, de céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> génération et de polymyxines, pour 25 pays de l'Union Européenne/Espace Économique Européen (UE/EEE), entre 2011 et 2018.....	43
Figure 11 : Schématisation du principe de fonctionnement d'une station de traitement des eaux usées.....	53
Figure 12 : Abondance relative des gènes de résistance sélectionnés, dans les déchets d'élevage à travers le monde .....	58
Figure 13 : Voies de transmission de la résistance aux antimicrobiens selon le concept One-Health .....	60
Figure 14 : Cartographie des lieux de prélèvements en Guadeloupe .....	80
Figure 15 : Représentation schématique du continuum Hôpital-Jarry avec les points de prélèvements.....	82
Figure 16 : Représentation schématique du continuum touristique .....	83
Figure 17 : Représentation schématique du continuum Hôpital-Jarry avec les points de prélèvements.....	93
Figure 18 : Concentration totale moyenne des résidus d'antibiotiques (en ng/L $\pm$ SD), d'AINS (en ng/L $\pm$ SD), de biocides (en ng/L $\pm$ SD) et de métaux lourds (en mg/L $\pm$ SD) mesurés dans le continuum CHUG – STEU de Jarry .....	96
Figure 19 : Représentation schématique du continuum touristique .....	98
Figure 20 : Concentration totale moyenne des résidus d'antibiotiques (en ng/L $\pm$ SD), d'AINS (en ng/L $\pm$ SD), de biocides (en ng/L $\pm$ SD) et de métaux lourds (en mg/L $\pm$ SD) dans les échantillons des continuums du Gosier et du Lamentin.....	101

Figure 21 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons d’effluents de l’hôpital, de l’entrée et de la sortie de la STEU et à la sortie de l’émissaire dans l’océan .....	104
Figure 22 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons animaux.....	106
Figure 23 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons du contenu des toilettes d’avions .....	107
Figure 24 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons du continuum de la ville du Gosier .....	109
Figure 25 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons du continuum de la ville du Lamentin .....	110
Figure 26 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$ SD) du résistome mesuré par Fluidigm PCR des échantillons collectés.....	112
Figure 27 : Abondance proportionnelle des différentes classes de gènes et EGM dans les échantillons du CHUG, de l’entrée et de la sortie de la STEU de Jarry collectés lors des trois semaines de prélèvement des campagnes 1,2,3 et 4 et des échantillons de l’océan collectés lors des campagnes 2 et 3 .....	114
Figure 28 : Heatmap représentant l’abondance relative moyenne des gènes d’intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des sites étudiés .....	115
Figure 29 : Abondance relative totale ( $\pm$ SD) des gènes de résistance détectés par Fluidigm PCR dans les échantillons animaux .....	116
Figure 30 : Abondance proportionnelle des différentes classes de gènes et EGM dans les échantillons animaux.....	117
Figure 31 : Heatmap représentant l’abondance relative moyenne des gènes d’intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des animaux étudiés.....	118
Figure 32 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$ SD) du résistome des échantillons collectés dans le contenu des toilettes d’avions lors des 4 campagnes de prélèvements .....	118
Figure 33 : Abondance proportionnelle des différentes classes de gènes et EGM dans les échantillons du contenu des toilettes des avions, collectés pendant trois semaines lors des campagnes 1,2,3 et 4 .....	119
Figure 34 : Heatmap représentant l’abondance relative moyenne des gènes d’intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes d’échantillonnage dans les avions étudiés.....	120
Figure 35 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$ SD) du résistome des échantillons collectés dans le continuum touristique de la ville du Gosier .....	121
Figure 36 : Abondance proportionnelle du résistome des échantillons collectés dans le continuum touristique de la ville du Gosier .....	122
Figure 37 : Heatmap représentant l’abondance relative moyenne des gènes d’intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des sites étudiés .....	123
Figure 38 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$ SD) du résistome des échantillons collectés dans le continuum non touristique de la ville du Lamentin .....	124
Figure 39 : Abondance proportionnelle du résistome des échantillons collectés dans le continuum non touristique de la ville du Lamentin.....	125

Figure 40 : Heatmap représentant l'abondance relative moyenne des gènes d'intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des sites étudiés .....	125
Figure 41 : Évolution des concentrations des composés de l'exposome (antibiotiques, biocides et AINS) et de l'abondance relative du résistome le long du continuum CHUG – STEU de Jarry et non touristique (Lamentin) et touristique (Gosier).....	127
Figure 42 : Analyses en composantes principales de l'exposome des échantillons de l'hôpital, de l'entrée de la STEU de Jarry et de la sortie de la STEU de Jarry, collectés lors des quatre campagnes d'échantillonnage entre 2021 et 2023.....	129
Figure 43 : Analyses en composantes principales du microbiome des échantillons de l'hôpital, de l'entrée de la STEU de Jarry et de la sortie de la STEU de Jarry, collectés lors des quatre campagnes d'échantillonnage entre 2021 et 2023.....	130
Figure 44 : Logarithme de l'abondance relative des différentes familles de gènes dans les eaux hospitalières des échantillons collectés lors des campagne 1, 2, 3 et 4.....	131
Figure 45 : Analyses en composantes principales du resistome des échantillons de l'hôpital, de l'entrée de la STEU de Jarry et de la sortie de la STEU de Jarry, collectés lors des quatre campagnes d'échantillonnage entre 2021 et 2023.....	133
Figure 46 : Analyse en composantes principales de l'exposome des échantillons collectés à l'hôpital, en entrée et en sortie de la STEU de Jarry, en entrée et en sortie de la STEU du Lamentin et dans la mangrove et dans le poste de refoulement, en entrée et en sortie de la STEU du Gosier et dans la mangrove, au cours des campagnes d'échantillonnage 3 et 4. ...	136
Figure 47 : Analyse en composantes principales du microbiome des échantillons collectés à l'hôpital, en entrée et en sortie de la STEU de Jarry, en entrée et en sortie de la STEU du Lamentin et dans la mangrove et dans le poste de refoulement, en entrée et en sortie de la STEU du Gosier et dans la mangrove, au cours des campagnes d'échantillonnage 3 et 4. ...	137
Figure 48 : Analyse en composantes principales du résistome des échantillons collectés à l'hôpital, en entrée et en sortie de la STEU de Jarry, en entrée et en sortie de la STEU du Lamentin et dans la mangrove et dans le poste de refoulement, en entrée et en sortie de la STEU du Gosier et dans la mangrove, au cours des campagnes d'échantillonnage 3 et 4. ...	138
Figure 49 : Élimination moyenne (en % $\pm$ SD) sur les quatre campagnes des composés de l'exposome mesurés dans les trois STEU (Jarry, Lamentin et Gosier).....	141
Figure 50 : Représentation des résultats de l'analyse de partitionnement de la variation sous la forme d'un diagramme de Venn montrant la contribution des composés de l'exposome (composés pharmaceutiques, biocides et métaux lourds) sur le résistome .....	144
Figure 51 : Corrélations entre l'abondance relative des gènes de résistance et la concentration des antibiotiques (en ng/L) auxquels ils confèrent une résistance .....	145
Figure 52 : Analyse en composantes principales du microbiome des échantillons collectés au CHUG, en entrée de la STEU de Jarry, dans l'océan et des échantillons animaux vivant dans (anolis, cafards, crapauds) et en dehors de la STEU (vaches).....	164
Figure 53 : Analyse en composantes principales du résistome des échantillons collectés au CHUG, en entrée de la STEU de Jarry, en sortie de l'émissaire dans l'océan et des échantillons animaux vivant dans (anolis, cafards, crapauds) et en dehors de la STEU (vaches), collectés pendant les campagnes 2 et 3, en 2022.....	165
Figure 54 : Analyse du réseau des gènes d'intérêt partagés entre les sites étudiés.....	166

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Pourcentage d'excrétion des antibiotiques par les consommateurs, ainsi que le pourcentage de leur élimination moyenne par les STEU associés à leur PNEC de sélection de résistance et leurs concentrations (en ng/μL) dans différents milieux aquatiques, selon la littérature .....	68
Tableau 2 : Pourcentage d'excrétion et pourcentage d'élimination moyenne par les STEU des molécules pharmaceutiques non-antibiotiques ainsi que leurs concentrations (en ng/L) dans différents milieux aquatiques, dans la littérature .....	69
Tableau 3 : Élimination moyenne (en %) et concentration (en ng/L) des biocides dans différents milieux aquatiques selon la littérature .....	72
Tableau 4 : CCM associées aux métaux lourds dans différents compartiments : eau, sédiment, sol et fumier.....	75
Tableau 5 : Élimination moyenne (en %) et concentration (en μg/L) de différents métaux lourds dans les milieux aquatiques, selon la littérature .....	75
Tableau 6 : Classes de gènes et gènes ciblés par la méthode Fluidigm PCR.....	89
Tableau 7 : Gamme d'étalonnage pour la méthode de SPE .....	85
Tableau 8 : Paramètres de la méthode de SPE .....	85
Tableau 9 : Paramètres de la méthode de LC-MS.....	86
Tableau 10 : Molécules ciblées ainsi que leurs temps de rétention (en min) et les transitions de quantification et de confirmation des molécules.....	87
Tableau 11 : Gènes d'intérêt sélectionnés.....	114
Tableau 12 : Concentrations moyennes des composés de l'exposome : antibiotiques, AINS, biocides (en ng/L) et métaux lourds (en μg/L), collectés lors des 4 campagnes de prélèvements dans le continuum CHUG – STEU de Jarry, entre 2021 et 2023 .....	97
Tableau 13 : Concentrations moyennes des composés de l'exposome : antibiotiques, AINS, biocides (en ng/L) et métaux lourds (en μg/L), collectés lors des 4 campagnes de prélèvements dans le continuum du Lamentin et du Gosier, entre 2021 et 2023 .....	102
Tableau 14 : Températures minimales et températures maximales moyennes, précipitation pour chacun des sites 2 jours, 1 jour avant ou le jour du prélèvement (en mm) pour les villes de Jarry, Gosier et Lamentin en campagnes 2, 3 et 4.....	134
Tableau 15 : PNEC de sélection de résistance (en μg/L), PNECenv (en μg/L), RQ à l'hôpital, en entrée et en sortie de STEU et dans l'océan/mangrove pour chacun des composés de l'exposome mesurés .....	143

## Liste des abréviations

---

ABC : ATP-binding cassette

ACP : Analyse en composante principale

ACRAS-R : AntimiCrobial Resistance trAnsmiSSion routes in Caribbean islandS : a One Health Risk analysis

ADN : Acide désoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien

ALEA : Animal Level of Exposure to Antimicrobials

AMEG : Antimicrobial Advice *Ad Hoc* Expert Group

ANMV : Agence nationale du médicament vétérinaire

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

As : Arsenic

BAC : chlorure de benzalkonium

BLSE :  $\beta$ -lactamases à spectre étendu

BRA : Bactéries résistantes aux antibiotiques

CCM : Concentration Co-sélective Minimale

Cd : Cadmium

CHUG : Centre Hospitalier Universitaire de Guadeloupe

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CSM : Concentration Sélective Minimale

Cr : Chrome

CS : Région conservée

Cu : Cuivre

DDJ : Doses Définies Journalières

DEAL : Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement

DHF : dihydrofolate

DHPS : dihydroptéroate synthétase

EEE : Espace Économique Européen

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

EGM : Élément génétique mobile

EH : Équivalent Habitants

Epic-PCR : Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR

EPS : substances polymériques extracellulaires

ESKAPE-E : *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., et *E. coli*

FAO : Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture

Gd : Gadolinium

GRA : Gène de résistance aux antibiotiques

Hg : Mercure

ICE : éléments intégratifs conjugatifs

ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

IME : éléments intégratifs mobilisables

IR<sub>L</sub> : séquence inversée répétée gauche

IR<sub>R</sub> : séquence inversée répétée droite

IS : Séquence d'insertion

ISC : intégrons sédentaires chromosomiques

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse

MATE : multidrug and toxic compound extrusion

MBL : Métallo-β-lactamase

MFS : major facilitator superfamily

MLS<sub>B</sub> : macrolide-lincosamide-streptogramine B

Ni : Nickel

OIE : Organisation mondiale de la Santé Animale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : cadre ouvert de lecture

PABA : Acide p-amino-benzoïque

PACE : proteobacterial antimicrobial compound efflux

Pb : Plomb

PCU : Population Correction Unit

PLP : protéines liant les pénicillines

PNEC : Concentration Prédite Sans Effet

QAC : composés d'ammoniums quaternaires

qPCR : PCR quantitative

RAM : Résistance aux antimicrobiens

RND : resistance-nodulation-cell division

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SMR : small multidrug resistance

SPE : Extraction en phase solide

STEPU : Station de traitement des eaux usées

THF : tétrahydrofolate

UE : Union européenne

VRE : entérocoques résistants à la vancomycine

VRSA : *S. aureus* résistant à la vancomycine

Zn : Zinc

## Introduction

---

La résistance aux antibiotiques représente depuis quelques années un problème de santé publique majeur. Elle fait partie du top 10 des défis mondiaux en matière de santé publique et des vingt premières causes mondiales de mortalité et de morbidité (WHO 2015, 2021). En 2019, les bactéries résistantes étaient responsables de 1,27 millions de morts au niveau mondial pour un coût de 1,5 milliard d'euros annuellement à l'Union Européenne (Blair et al. 2015). Les estimations prédisent 10 millions de morts causés directement ou indirectement par la résistance aux antimicrobiens d'ici 2050 (O'Neill 2016).

Cette augmentation de la résistance a engendré le passage d'une époque où les antibiotiques étaient considérés comme « miracle », permettant la guérison de nombreuses infections, à l'époque actuelle où la résistance aux antibiotiques est largement répandue et la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques réduite.

C'est par divers mécanismes que les bactéries ont développées des résistances aux antibiotiques. Outre les phénomènes de mutations, l'importance des échanges de matériel génétique par transfert horizontal ont été mis en évidence favorisant la dissémination de la résistance, notamment dans l'environnement.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène caractérisé par des interactions complexes impliquant diverses populations microbiennes et affectant *in fine* la santé humaine, animale et environnementale. L'interconnexion entre ces différents écosystèmes peut donc contribuer à la dissémination de la résistance et il est alors logique d'adopter une approche collaborative, intégrée et multidisciplinaire, "One-Health", pour aborder et résoudre la problématique de la résistance aux antibiotiques. Il s'agit notamment de prendre des mesures pour préserver l'efficacité des antimicrobiens existants en évitant leur utilisation inappropriée et en limitant la propagation des infections.

Au cours des dernières années, les pays, les uns après les autres ont mis en œuvre des plans d'actions basés sur cette approche "One-Health" et en ont démontré les avantages dans le suivi et la lutte contre la résistance aux antibiotiques.

L'augmentation de la résistance dans l'environnement est principalement liée aux activités anthropiques. Toute modification de l'environnement, par l'apport de bactéries résistantes ou par la pollution causée par les antibiotiques qui ne sont pas totalement métabolisés par les organismes humains et animaux et d'autres composés tels que les biocides et les métaux lourds, peut influencer la structure des populations bactériennes et avoir une incidence sur la propagation de la résistance dans l'environnement et vers les deux autres écosystèmes. Dans cette problématique de dissémination de la résistance, les stations de traitement des eaux usées ont notamment un grand rôle à jouer puisqu'elles sont considérées comme des « hotspots » pour la dissémination de bactéries résistantes et de gènes de résistance dans l'environnement. Dans ce contexte, la surveillance des eaux usées s'est développée et permet l'analyse de biomarqueurs de la résistance afin d'obtenir des informations sur la santé de la communauté. Dans ce sens, les nouvelles réglementations européennes imposent la surveillance de la résistance aux antimicrobiens à la sortie des stations d'épuration pour les agglomérations de plus de 100 000 équivalents habitants.

Outre la transmission plutôt locale entre ces trois compartiments interconnectés, la transmission de bactéries résistante pourrait se produire à une échelle plus large, voire mondiale, notamment depuis l'accélération de la mondialisation et l'essor des voyages internationaux, ce qui nécessiterait des actions coordonnées en matière de santé mondiale.



Les objectifs de cette thèse sont d'étudier les voies de dissémination de la résistance aux antibiotiques et l'impact de facteurs sociétaux et environnementaux sur cette dissémination spécifique à la Guadeloupe à partir de la surveillance des eaux usées et de la comparaison de l'exposome, du microbiome et du résistome de différents continuums locaux.

Ce mémoire de thèse est divisé en trois grands chapitres. Dans une première partie, une synthèse de la littérature rapporte les généralités concernant les antibiotiques et les mécanismes de résistance bactériens, les voies de transmission de la résistance au travers d'une approche One-Health et l'évaluation du risque associé à celle-ci. Cette partie décrit également les composés contaminant l'environnement et leurs concentrations.

La deuxième partie décrit les différents Matériels et Méthodes utilisés dans cette étude, les lieux de l'étude et les campagnes d'échantillonnage réalisées, ainsi que les méthodologies d'analyse de l'exposome, du microbiome et du résistome.

Dans une troisième partie, les différents résultats sont présentés, tout d'abord par la description de l'exposome, du microbiome et du résistome des différents continuums, puis de différents facteurs pouvant influencer leurs caractéristiques. Un article soumis à la revue *Journal of Travel Medicine* ; présentera spécifiquement l'influence du tourisme sur la dissémination de la résistance aux antibiotiques par une approche de surveillance des eaux usées.

Tous ces résultats seront discutés dans une dernière partie suivie d'une conclusion générale synthétisant les principaux résultats ainsi que les perspectives à ce travail.

# A. Revue de la littérature

## I. Les antibiotiques et la résistance aux antibiotiques

---

### I.1. Définition et découverte des antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules permettant soit d'empêcher la croissance bactérienne (antibiotique bactériostatique) soit de tuer les bactéries (antibiotique bactéricide). Ils peuvent être d'origine naturelle, produits par un microorganisme, synthétiques, produits chimiquement, ou semi-synthétiques, développés en modifiant une molécule antibiotique naturelle. La majorité des antibiotiques utilisés en médecine humaine sont issus des actinobactéries et des champignons (Hutchings, Truman, and Wilkinson 2019).

La découverte de ces molécules antibiotiques a été l'une des plus grandes avancées du 20<sup>ème</sup> siècle, elle a rendu le traitement de nombreuses infections possible et a permis de réduire drastiquement la mortalité par infection bactérienne. Mais déjà 2000 ans en arrière, du pain moisi était utilisé en Serbie, en Chine, en Grèce et en Égypte, afin de soigner des plaies ouvertes. C'est ensuite plus largement au 19<sup>ème</sup> siècle que différentes observations d'inhibition de bactéries ont été faites, et qui ont donné lieu à l'apparition du terme « antibiose », mais aucune molécule n'a été purifiée à cette époque (Durand, Raoult, and Dubourg 2019).

C'est Paul Ehrlich qui, en 1909, a développé un premier médicament, le salvarsan, utilisé pour traiter la syphilis. S'en suit la découverte du Prontosil en 1930 par Gerhard Domagk, de la famille des sulfamides. Ce sont les sulfamides qui sont considérés comme étant les premiers vrais antibiotiques efficaces et utilisés en clinique (Hutchings, Truman, and Wilkinson 2019).

En 1928, arrive la découverte fortuite de la pénicilline par Alexander Fleming lorsqu'il travaillait sur *Staphylococcus*. Après avoir laissé ses cultures bactériennes dans son laboratoire, il observe des contaminations, notamment un champignon (*Penicillium notatum*) autour duquel les colonies de *Staphylococcus* étaient inhibées (Fleming 1929). Mais il a fallu attendre 1942 pour que la première pénicilline soit purifiée par Ernst Chain et Howard Florey et c'est ensuite en 1946 que cette pénicilline a été largement commercialisée (Lobanovska and Pilla 2017).

C'est entre les années 1940 et 1960 que la plupart des antibiotiques, encore utilisés aujourd'hui, sont découverts, c'est une période que l'on nomme l'âge d'or. La découverte des antibiotiques a encore continué jusqu'aux années 1990 (Salam et al. 2023). Depuis cette période peu de nouvelles molécules antibiotiques ont été découvertes tandis que la résistance aux antibiotiques n'a cessé d'augmenter.

Peu après l'introduction des antibiotiques des phénomènes de résistance étaient observés. Par exemple, dans le cas des sulfamides, découverts dans les années 1930, les premières résistances ont été identifiées à la fin de cette même décennie. Le même constat a été fait pour la pénicilline, en 1940, seulement 12 ans après sa découverte et quelques années avant sa réelle commercialisation, des pénicillinases ont été observées, conférant la résistance à cet antibiotique (Davies and Davies 2010).

La chronologie de la découverte des antibiotiques ainsi que les résistances associées sont illustrées en **Figure 1**.

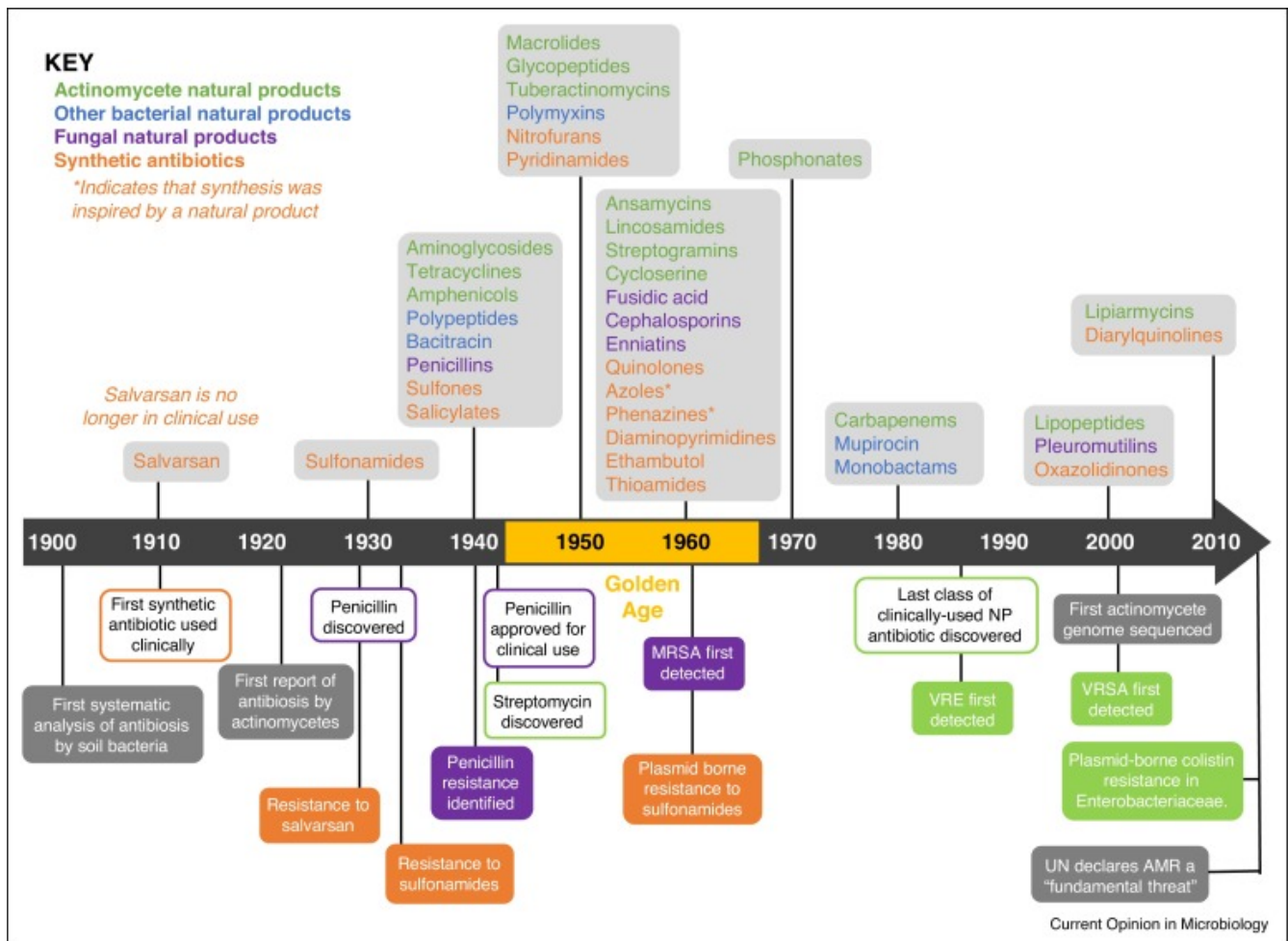


Figure 1 : Chronologie de l'apparition en clinique des classes d'antibiotiques, colorées en fonction de leur origine : en vert les actinomycètes, en bleu les autres bactéries, en violet les champignons et en orange les antibiotiques d'origine synthétique. En-dessous de la frise les dates clés de la découverte des antibiotiques et des résistances, ainsi que la découverte de souches résistantes. MRSA = *S. aureus* résistant à la méthicilline, VRE = entérocoques résistants à la vancomycine et VRSA = *S. aureus* résistant à la vancomycine (Hutchings, Truman, and Wilkinson 2019).

### I.1.1. Les mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ont différents mécanismes d'action. Ils peuvent provoquer i) l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, ii) la dénaturation de la membrane, iii) l'inhibition de la synthèse de l'ADN, iv) l'inhibition de la synthèse protéique et v) le blocage de la synthèse des folates (Figure 2).

#### i) Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

La paroi cellulaire est majoritairement composée de peptidoglycane, polymère donnant à la bactérie sa rigidité ainsi que sa forme. La fosfomycine, les bêta-lactamines, les glycopeptides et la bacitracine sont des antibiotiques ayant une action sur la synthèse de la paroi bactérienne.

- Pour être active, la fosfomycine doit entrer à l'intérieur de la cellule bactérienne via un transport actif. Cet antibiotique agit lors de la première étape de la synthèse du peptidoglycane en inhibant l'enzyme MurA (UDP-N-acetylglucosamine-enolpyruvyltransferase) ce qui empêche la formation d'acide UDP-N-acétylmuramique, un précurseur du peptidoglycane.

- Les bêta-lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés (Bush and Bradford 2016) et sont plus efficaces sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Il existe 4 sous-types de bêta-lactamines : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, elles sont toutes constituées d'un noyau bêta-lactame.

Les bêta-lactamines permettent l'inhibition de la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane car elles possèdent une structure semblable à celle du D-alanyl-D-alanine, qui leur permet de se lier au niveau du site actif des protéines liant la pénicilline (PLP), situées sur la surface de la membrane cytoplasmique. Cette liaison empêche la transpeptidation de la couche de peptidoglycane, donc perturbe la synthèse de la paroi et entraîne finalement la lyse bactérienne.

- Les glycopeptides sont uniquement actifs sur les bactéries à Gram positif car de par leur grande taille ils sont incapables de passer à travers les porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ils agissent en se fixant au niveau d'un des précurseurs du peptidoglycane, le peptidyl-D-Ala-D-Ala, ce qui engendre une inhibition de la transglycosylation et de la transpeptidation et donc provoque l'arrêt de la croissance bactérienne puis la mort des cellules.

- La bacitracine est active contre les bactéries à Gram positif. Elle permet l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane par son action sur l'undécaprénylphosphate qui sert de translocateur des précurseurs du peptidoglycane.

## ii) Dénaturation de la membrane

Les polymyxines et la daptomycine sont tous les deux des antibiotiques ayant une action sur la membrane bactérienne.

- Les polymyxines ont pour cible un des constituants de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, le lipopolysaccharide, qui est notamment composé d'un lipide A sur lequel va se fixer la polymyxine. Cette interaction va causer la désorganisation de la membrane externe par le déplacement des cations permettant de stabiliser la membrane, tels que  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ , et entraîner la mort cellulaire.

- La daptomycine est active sur les bactéries à Gram positif. Cet antibiotique s'insère dans la membrane cytoplasmique et conduit à la dépolarisation de celle-ci et à la perte de composés intracellulaires, tels que  $K^+$ , suite à la formation de canaux.

## iii) Inhibition de la synthèse de l'ADN

La synthèse de l'ADN peut être inhibée par l'action des quinolones ou encore des furanes.

- Les quinolones sont des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN grâce à leur action sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN.

- Pour être actifs, le groupement -nitro des furanes doit être réduit, cette réduction est catalysée par des enzymes bactériennes, les nitroréductases. Une fois actifs, ils peuvent causer des dommages à l'ADN.

#### iv) Inhibition de la synthèse protéique

Les aminosides, les tétracyclines, les macrolides, les phénicolés et les streptogramines ont une action sur la synthèse protéique.

- Après avoir pénétré dans le cytoplasme grâce à la force proton-motrice et aux enzymes de la chaîne respiratoire, les aminosides vont se fixer à la sous-unité 30S des ribosomes, plus précisément au niveau du site A. Cette liaison entraîne des erreurs de traduction résultant à une altération de la membrane.

- Les tétracyclines doivent traverser la paroi grâce à des porines ou par diffusion selon l'affinité des molécules, puis traverser la membrane cytoplasmique à l'aide d'un transport actif. Ensuite, les tétracyclines se fixent également à la sous-unité 30S des ribosomes empêchant la fixation de l'amino-acyl-ARNt sur le ribosome, entraînant un arrêt de la phase d'élongation.

- La pénétration des macrolides dans la cellule bactérienne se fait par diffusion passive. Tout comme les phénicolés et les streptogramines, ils agissent par fixation à la sous-unité 50S du ribosome en empêchant la peptidyltransférase d'ajouter les acides aminés suivant lors de l'élongation de la chaîne peptidique, empêchant donc la traduction de l'ARNm.

#### v) Blocage de la synthèse des folates

Les sulfamides et le triméthoprim agissent dans des étapes successives de la synthèse des folates, impliqués dans la production des bases nucléiques. Les folates sont constitués d'un noyau ptérine, d'acide para-amino-benzoïque lié à du glutamate. Le dihydrofolate (DHF) et le tétrahydrofolate (THF) sont les formes réduites et actives des folates nécessaires à l'activité biologique.

- Les sulfamides agissent en inhibant la dihydroptéroate synthétase (DHPS), enzyme importante dans la production de folates. Du fait de leur homologie structurale avec l'acide p-amino-benzoïque (PABA) les sulfamides le remplacent dans la DHPS et inhibent donc la synthèse des folates, qui sont essentiels dans la production d'ADN.

- Le triméthoprim est utilisé en association avec les sulfamides, il permet d'inhiber la dihydrofolate réductase bloquant ainsi la réduction du DHF en THF.

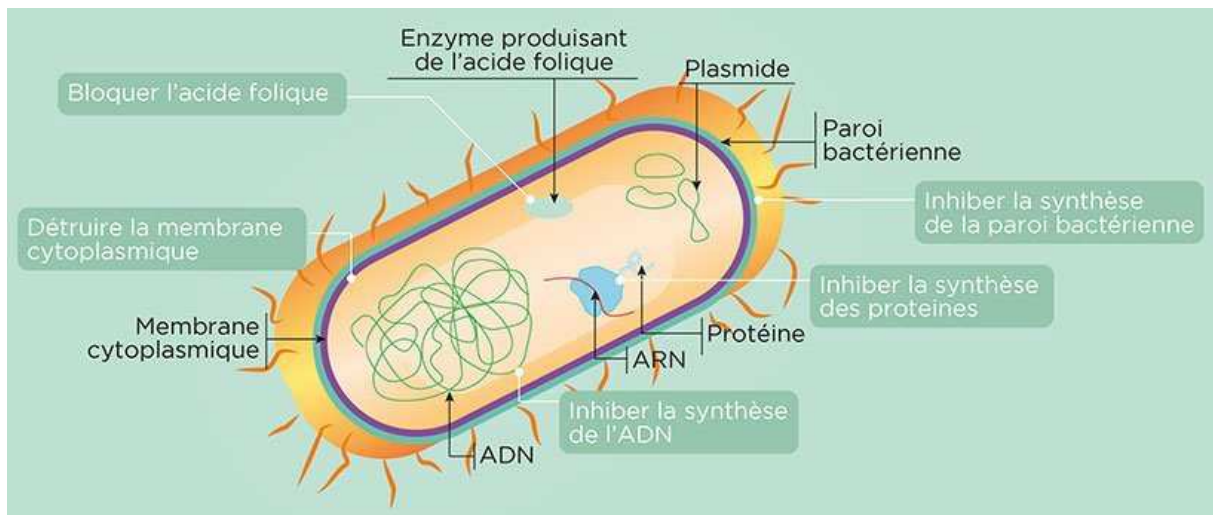


Figure 2 : Cibles et mécanismes d'action des différentes classes d'antibiotiques (www.inserm.fr)

## I.2. Résistance naturelle et résistance acquise

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut-être soit naturelle soit acquise.

La résistance naturelle est due aux propriétés intrinsèques de la bactérie. Dans ce cas, la résistance est portée par le chromosome et peut alors se transmettre de façon verticale à la descendance de la bactérie lors de la division cellulaire.

La résistance acquise représente le fait qu'une bactérie sensible devienne résistante grâce à l'acquisition de mécanismes de résistance soit par mutation soit par transfert horizontal de gènes (Holmes et al. 2016). Elle se transmet de façon verticale ou par transfert horizontal via des éléments génétiques mobiles.

### I.2.1. Résistance par mutation

Les mutations sont des événements peu fréquents et aléatoires (Grehs et al. 2021). Elles sont la conséquence d'erreurs de répllication ou encore d'une mauvaise réparation de l'ADN. Ces mutations seront majoritairement néfastes pour la bactérie et coûteuses mais elles peuvent induire la résistance à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques. Cela arrive généralement lorsqu'elles ont lieu dans les gènes codant la cible de l'antibiotique, codant des enzymes permettant l'inactivation des antibiotiques ou encore dans les gènes de régulation des transporteurs ou directement dans les gènes codant ces transporteurs (Reygaert 2018). Par exemple, chez *Escherichia coli*, la résistance aux quinolones résulte de mutations dans le gène *gyrA* codant pour une gyrase, cible des quinolones (Grehs et al. 2021).

Mais la résistance acquise par mutation se transmet de la cellule mère à la descendance et en clinique, seul 20% des résistances correspondent à des mutations (FH 2022).

### I.2.2. Transferts horizontaux de gènes

Il existe 3 mécanismes de transfert horizontal de gènes : la transformation, la transduction et la conjugaison (**Figure 3**).

Afin d'être conservés dans la bactérie receveuse, les gènes transférés doivent lui apporter un avantage sélectif (Soucy, Huang, and Gogarten 2015).

- La transformation :

La transformation correspond à l'intégration d'ADN libre provenant de l'environnement de la bactérie. Peu de bactéries sont naturellement transformables, mais parmi elles, certains pathogènes importants tels que *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae* et *Streptococcus pneumoniae* (Blokesh 2016).

La majorité des bactéries compétentes peuvent intégrer n'importe quel ADN mais pour qu'un transfert soit fructueux, il est préférable qu'il intervienne entre deux organismes proches phylogénétiquement. En effet, une similarité entre les génomes de deux organismes permet une recombinaison homologue et l'intégration de l'ADN libre dans le génome de la bactérie receveuse (Soucy, Huang, and Gogarten 2015).

- La transduction :

La transduction permet le transfert de matériel génétique entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse par l'intermédiaire d'un bactériophage. À la fin du cycle de réplication, la cellule hôte est lysée et l'ADN fragmenté de son génome peut être encapsidé à l'intérieur de particules infectieuses phagiques. Cet ADN peut ensuite être injecté dans une autre cellule (Daubin and Szöllösi 2016).

Il existe 2 types majeurs de transduction, la transduction généralisée et la transduction spécialisée. Dans le cas de la transduction généralisée le phage peut encapsider par erreur et aléatoirement n'importe quelle partie du génome bactérien hôte pendant la lyse cellulaire. En revanche, lors de la transduction spécialisée, le phage n'encapside que certains gènes de la bactérie hôte lors de son excision, situés proche de l'ADN phagique qui était intégré (Chiang, Penadés, and Chen 2019).

- La conjugaison :

Décrit pour la première fois par Lederberg et Tatum en 1946 (Tatum and Lederberg 1947), il s'agit d'un mécanisme de transfert horizontal très efficace, avec une fréquence allant de  $10^{-5}$  à  $10^{-2}$  (He et al. 2020). Il a été décrit chez la majorité des genres bactériens mais est le plus souvent décrit chez les bactéries à Gram négatif. Lors du mécanisme de conjugaison, le transfert de matériel génétique s'effectue d'une bactérie à une autre par contact direct entre les deux grâce à un pilus. A travers ce pilus un plasmide est transféré de la bactérie donneuse à la bactérie receveuse (Christaki, Marcou, and Tofarides 2020).



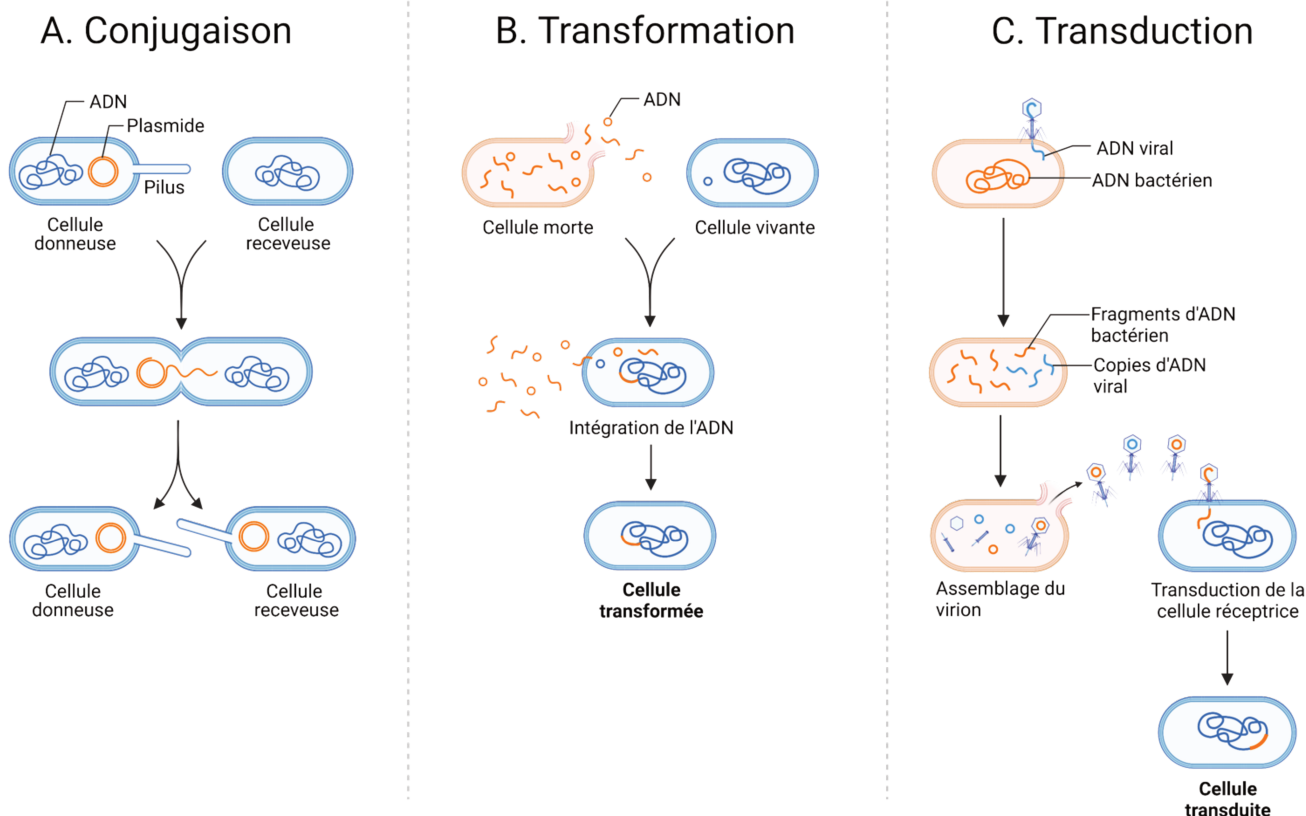


Figure 3 : Représentation schématique des trois mécanismes bactériens de transfert horizontal de gènes : la conjugaison (A), la transformation (B) et la transduction (C) (Source BioRender).

### I.2.3. Diversité des éléments génétiques mobiles

Le transfert horizontal de gènes est généralement médié par des éléments génétiques mobiles (EGM) qui vont permettre la mobilité intracellulaire et intercellulaire (Grehs et al. 2021).

#### Les plasmides

Les plasmides sont des fragments d'ADN double brin, extra-chromosomiques, le plus fréquemment circulaires avec une taille allant du kilobase à plusieurs mégabases. Ils sont présents chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et sont d'importants éléments porteurs d'autres EGM et potentiellement de gènes de résistance aux antibiotiques (Shintani, Sanchez, and Kimbara 2015).

Certains plasmides sont dits à spectre d'hôte étroit lorsqu'ils sont seulement maintenus chez des bactéries proches taxonomiquement, à l'inverse ils sont dits à spectre large lorsqu'ils sont retrouvés chez divers genres bactériens (Partridge et al. 2018).

Ils possèdent le matériel nécessaire à leur réplication et sont donc autoréplicatifs. La réplication commence à l'origine de réplication, *ori*, et est initiée par la liaison de la protéine Rep. Les plasmides codent pour l'initiation de leur réplication mais se servent de la machinerie cellulaire

de la bactérie hôte pour synthétiser l'ADN, par exemple l'hélicase, la primase ou encore la polymérase (Partridge et al. 2018).

Ils peuvent avoir des fonctions de conjugaison et de mobilisation qui leur permettent d'être transmis horizontalement. A ces fonctions de conjugaison et de mobilisation peuvent s'ajouter des gènes accessoires pouvant être des gènes de résistance et d'autres EGM, tels que des séquences d'insertion (IS), des transposons ou encore des intégrons (Partridge et al. 2018).

Les plasmides jouent un grand rôle dans la résistance aux antibiotiques puisque la majorité des résistances acquises (environ 80%) sont des résistances plasmidiques, ce qui en fait le mécanisme le plus le plus courant ([www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/](http://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/)).

Les plasmides conjugatifs sont les plus impliqués dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (GRA), grâce à leur taille, en moyenne de 90 kb, ils sont capables de porter beaucoup de gènes de résistance mais également des gènes codant des toxines-antitoxines permettant d'assurer leur maintien chez l'hôte (McInnes et al. 2020).

Les plasmides mobilisables quant à eux sont moins fréquents et plus petits que les plasmides conjugatifs. Ils ne possèdent pas les éléments permettant leur transfert horizontal comme les plasmides conjugatifs mais ils peuvent tout de même être transférés avec ceux-ci grâce à la présence d'une relaxase et d'un gène *oriT*.

Plusieurs classifications existent pour les plasmides. L'une d'elle classe les plasmides en groupes d'incompatibilité (Novick 1987), cette méthode de classification se base sur le fait que deux plasmides ayant le même système de réplication ne peuvent pas se trouver dans la même cellule bactérienne. Actuellement il existe plus de 23 groupes d'incompatibilité (B, C, D, E, FI, FII, FIII, FIV, H, Ia, I2, Iγ, Iδ, Iζ, J, K, M, N, P, T, V, W et X). Parmi ces groupes les plasmides de type IncF, sont fréquemment décrits chez *E. coli*. Ces plasmides sont le plus souvent porteurs de gènes de β-lactamases à spectre étendu (BLSE), de gènes de résistance aux carbapénèmes, aux quinolones et aux aminoglycosides. Les plasmides de ce groupe sont notamment à l'origine de la dissémination du gène *blaCTX-M-15* (Rozwandowicz et al. 2018).

### Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) et éléments intégratifs mobilisables (IME)

Les ICE aussi appelés transposons conjugatifs sont des éléments mobiles très répandus et plus nombreux que les plasmides, retrouvés à la fois chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ils ont une taille allant de 18 kb à plus de 500 kb, leur taille étant corrélée au nombre de gènes cargo qu'ils portent, pouvant aller d'un seul gène codant pour la résistance à la tétracycline comme chez le transposon Tn916 à un très grand nombre comme dans l'élément PAISt (Johnson and Grossman 2015; Bellanger et al. 2014).

Ces éléments ont à la fois des capacités de transmission autonome par conjugaison et d'intégration et excision dans le chromosome de l'hôte mais ils ne sont pas capables de s'auto-répliquer (Partridge et al. 2018). L'intégration dans le chromosome se fait par recombinaison entre des séquences spécifiques situées sur l'ICE et des séquences spécifiques chez l'hôte grâce à une intégrase qui est aussi impliquée dans l'excision et la formation de l'intermédiaire circulaire qui sera transféré par conjugaison (Botelho and Schulenburg 2021). Ils peuvent donc être aussi bien transmis verticalement qu'horizontalement.

Les ICE sont fréquemment porteurs de gènes de résistance. Par exemples, chez *Pseudomonas aeruginosa*, les ICE portent souvent des gènes conférant une résistance aux carbapénèmes. Une grande famille d'ICE est retrouvée chez un grand nombre de pathogènes, comme *V. cholerae* et *Proteus spp*, et est décrite comme disséminant des gènes de résistance aux antibiotiques, il s'agit de l'ICE SXT/R391. On trouve également des ICE de type Tn916 chez les *Firmicutes*

portant des gènes codant pour des résistance à la tétracycline et à la vancomycine (Botelho and Schulenburg 2021). Ils portent également d'autres fonctions tels que la résistance aux métaux lourds ou encore des fonctions de pathogénicité (Bellanger et al. 2014).

Tout comme les ICE, les IME sont capables de s'intégrer et de s'exciser grâce à une intégrase. Afin d'être transférés, ils portent également des gènes leur permettant de détourner la machinerie de conjugaison des éléments conjugatifs (Coluzzi et al. 2017). La majorité des IME ont une taille comprise entre 5 et 15 kb, les plus grands n'excédant pas une taille de plus de 50 kb. Leur taille dépend également du nombre de gènes qu'ils portent.

Des gènes de résistance ont été retrouvés chez une grande majorité d'IME, notamment des gènes de résistance à la tétracycline ou encore fréquemment des gènes de résistance aux lincosamides. Il existe également des IME portant un grand ensemble de gènes de résistance, c'est le cas de SGI1 qui a été décrit chez *Salmonella enterica* Typhimurium DT104, dans lequel est présent un intégron de classe 1. Depuis, plusieurs variants de cet IME ont été identifiés, notamment chez des entérobactériales (Guédon et al. 2017).

### Les éléments transposables

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN capables de se déplacer au sein d'un génome (Bourque et al. 2018). Dans cette catégorie on trouve les IS, les transposons composites et les transposons simples (**Figure 4**).

#### - Les séquences d'insertion (IS)

Les séquences d'insertion sont des petits éléments mobiles d'une taille de 0,7 à 2,5 kb, composés d'un gène codant une transposase (*tnp*) et flanqués par des séquences inversées répétées (IR) nommées IR<sub>L</sub> à gauche et IR<sub>R</sub> à droite selon le sens de transcription du gène *tnp* (Partridge et al. 2018). La transposase permet le mouvement de l'IS en catalysant le clivage de l'ADN et les transferts de brins (Siguiet et al. 2015). C'est en fonction de la nature de ces transposases que la classification des IS est faite.

Certaines IS ont été décrites en association avec des GRA. Il s'agit notamment des IS6, IS4 ou encore IS1 qui sont non seulement fortement associées à divers GRA mais également très abondantes chez des pathogènes (Razavi et al. 2020).

La famille IS6 a été identifiée pour la première fois au début des années 1980, et a été décrite comme importante dans la propagation de la résistance aux antibiotiques. Dans cette famille les séquences d'insertion comme IS26, présente chez beaucoup d'isolats cliniques d'entérobactériales sur le chromosome et sur des plasmides, et IS257, présente sur les plasmides et les chromosomes des bactéries Gram à positif, ont beaucoup été étudiées en raison de leur impact clinique. En effet IS257 est impliquée dans l'expression des gènes *tetA* et *dfrA* chez *Staphylococcus aureus* et IS26 des gènes *blaSHV* et *blaKPC* par exemple et est de plus en plus retrouvé sur des plasmides d'importance clinique (Varani et al. 2021).

Ces IS peuvent permettre le mouvement de gènes de résistance en faisant partie d'un transposon composite (Partridge et al. 2018).

#### - Les transposons composites

Les transposons composites sont des séquences d'ADN bordées par deux IS pouvant se déplacer d'une région du génome à une autre. La séquence d'ADN correspond la plupart du

temps à des gènes de résistance aux antibiotiques, tel est le cas pour Tn5 portant une résistance à la kanamycine, Tn9 avec une résistance au chloramphénicol ou encore Tn10 et la résistance à la tétracycline (Merlin and Toussaint 1999).

- Les transposons simples ou non-composites

Ces transposons ne comportent pas d'IS à leurs extrémités mais des séquences répétées en orientation inverse d'environ 40pb permettant la transposition car elles sont reconnues par la transposase. Tout comme les transposons composites, ces transposons portent, en plus des fonctions de transposition, des gènes codant des résistances aux antibiotiques, c'est le cas du Tn3 (Merlin and Toussaint 1999). Différents gènes de résistance sont associés aux membres de la famille Tn3 comme par exemple les gènes de la  $\beta$ -lactamase *TEM-1*, les gènes de résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines *erm* ou encore les gènes de pompe à efflux de la tétracycline (Nicolas et al. 2015).

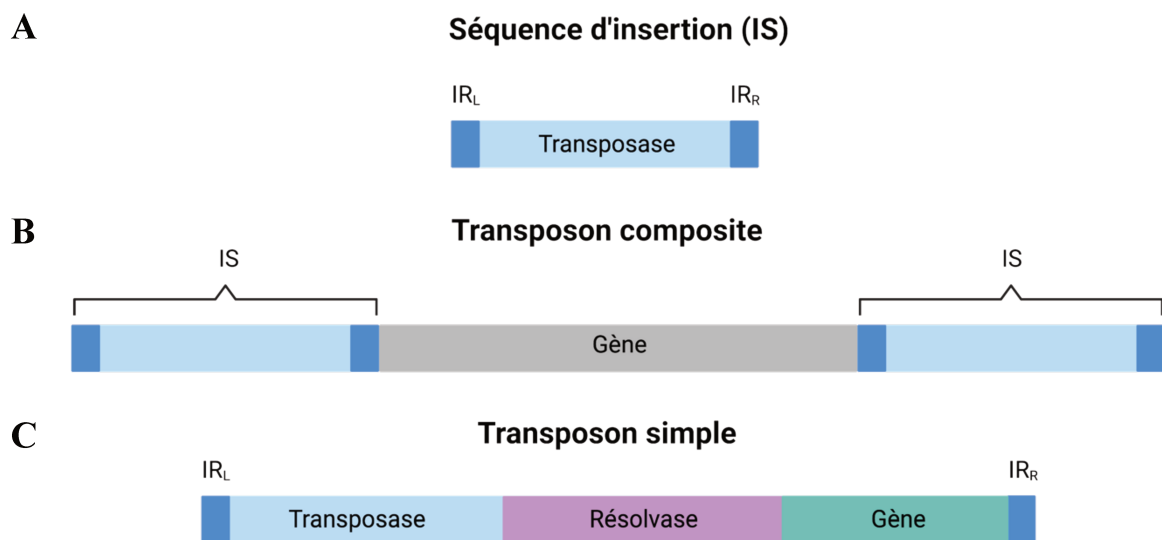


Figure 4 : Structure des éléments transposables impliqués dans le transfert horizontal de gènes : les séquences d'insertion (A), les transposons composites (B) et les transposons simples (C). IR<sub>L</sub> = séquence inversée répétée gauche et IR<sub>R</sub> = séquence inversée répétée droite.

### Les intégrons et les cassettes de gènes

Les intégrons ont un rôle majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Ce sont des éléments génétiques permettant la capture, l'intégration et l'expression de gènes que l'on appelle "gènes cassettes", gènes qui peuvent être des gènes de résistance aux antibiotiques mais également à d'autres molécules (métaux, biocides...). Ils sont constitués d'un gène codant une intégrase (*intI*), un site de recombinaison (*attI*) et un promoteur (Pc) (**Figure 5**).

Il existe deux types d'intégrons : les intégrons sédentaires chromosomiques (ISC), découverts pour la première fois chez *V. cholerae* (D. Mazel et al. 1998) et les intégrons portés par des EGM et impliqués dans la résistance aux antibiotiques, appelés ci-après intégrons de résistance. Les ISC sont portés par le chromosome, ne sont pas mobiles et peuvent porter un très grand nombre de cassettes, jusqu'à 200 codant majoritairement des protéines de fonctions inconnues. Ils sont majoritairement trouvés chez les Protéobactéries. Les intégrons de résistance, quant à eux, portent un plus petit nombre de cassettes, jusqu'à 10 (Cho et al. 2021),

codant généralement pour de la résistance aux antibiotiques (Fluit and Schmitz 2004). Leur transfert ne se fait pas de manière autonome mais ils peuvent être transférés lorsqu'ils sont situés sur des EGM tels que les transposons et les plasmides.

Il existe actuellement 5 classes d'intégrons de résistance, classés en fonction de la séquence de *intI*, les classes 1, 2 et 3 étant les plus prévalentes.

Les intégrons de classe 1 sont les plus étudiés et les plus communs notamment dans les isolats cliniques et sont également retrouvés en milieu vétérinaire et dans l'environnement, et sont majoritairement présents chez des bactéries à Gram négatif (Partridge et al. 2018; Gillings 2014). Ils sont retrouvés associés à des transposons fonctionnels ou non, dérivés de Tn402 qui peuvent être intégrés dans des transposons plus importants tels que Tn21 (Cambray, Guerout, and Mazel 2010).

Leur région 3'CS est constituée de 3 gènes, 1 gène conférant une résistance aux composés d'ammoniums quaternaires (QAC), *qacEAI*, un gène conférant une résistance aux sulfamides, *sulI*, et, *orf5* dont la fonction est inconnue (Partridge et al. 2018).

Les intégrons de classe 2 possèdent souvent une protéine IntI2 non fonctionnelle à cause d'une mutation engendrant la présence d'un codon stop ce qui a pour conséquence une diversité limitée de cassettes et donc un réseau de cassettes très conservé. On retrouve généralement 3 mêmes cassettes : *dfrA1*, *sat* et *aadA1* (Partridge et al. 2018).

On retrouve ces intégrons constamment liés aux transposons appartenant à la famille Tn7 (Didier Mazel 2006). Les Proteae semblent être un réservoir important de ces intégrons de classe 2 (Mendes Moreira et al. 2019).

Peu d'intégrons de classe 3 ont été caractérisés. Ils sont majoritairement retrouvés dans l'environnement (Bhat et al. 2023).

Les intégrons de classe 4 sont retrouvés sur le chromosome de *V. cholerae* au sein de l'ICE SXT et l'intégron de classe 5 est lui situé dans un transposon composite porté par le plasmide pRSV1 de *Alivibrio salmonicida* (Cambray, Guerout, and Mazel 2010).

Les cassettes de gènes constituent la partie variable de l'intégron et ont une taille comprise entre 500 et 1 000 pb. On les retrouve dans tous les environnements, que ce soient les sols, les sédiments, les biofilms, les surfaces végétales, ... Ces cassettes codent diverses fonctions, dont la résistance aux antimicrobiens. En effet, les intégrons de classe 1 ont été associés à plus de 130 cassettes d'intégrons comprenant des déterminants de résistance contre presque toutes les familles d'antibiotiques (Escudero et al. 2015).

Les cassettes peuvent être intégrées ou excisées par recombinaison spécifique de site par l'intégrase, ce mouvement a principalement été étudié pour les intégrons de classe 1. Sous forme libre les cassettes ont une forme circulaire et sont constituées d'un site de recombinaison (*attC*) reconnu par l'intégrase, et d'un cadre ouvert de lecture (ORF). Elles adoptent une forme linéaire lorsqu'elles sont intégrées dans un réseau de cassettes. Les mouvements des cassettes, excision ou intégration, se font grâce à l'intégrase IntI par une recombinaison site-spécifique avec les sites *attC* et *attI*. Les cassettes sont intégrées de préférence grâce à une recombinaison entre le site *attI* et le site *attC*, ce qui leur permet d'être plus proche du promoteur, alors que l'excision est en général réalisée par recombinaison entre deux sites *attC*. L'expression des cassettes est permise grâce au promoteur Pc dont la force varie selon les variants, ce qui aura un impact sur leur niveau d'expression. La position des cassettes par rapport au promoteur est aussi un facteur qui va influencer l'expression des gènes, plus la cassette est proche du promoteur plus elle sera exprimée fortement et inversement (Collis and Hall 1995). Mais des réarrangements de cassettes peuvent avoir lieu notamment lorsque la bactérie est soumise à une

pression de sélection antibiotique permettant de rapprocher des cassettes initialement peu exprimées (Escudero et al. 2015; Barraud and Ploy 2015).

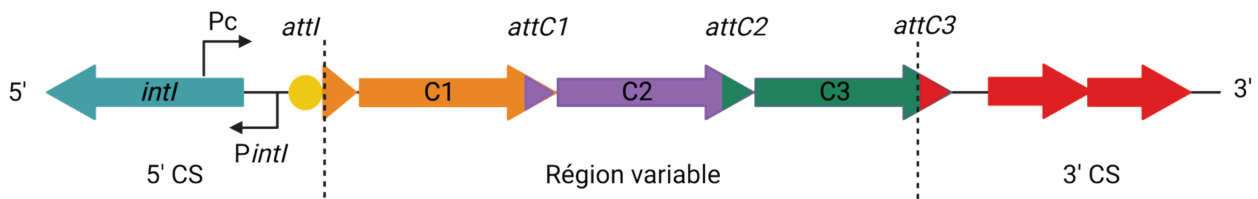


Figure 5 : Structure fonctionnelle d'un intégron de résistance. CS = région conservée, intI = gène de l'intégrase, Pc = promoteur des cassette de gènes, PintI = promoteur du gène de l'intégrase, attI et attC = site de recombinaison, C1, C2 et C3 = cassettes de gènes

### I.3. Les mécanismes de résistance bactériens aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être la conséquence de différents mécanismes. Ces mécanismes sont : l'imperméabilité limitant l'entrée des antibiotiques, l'efflux actif des antibiotiques, la modification de la cible et l'inactivation enzymatique des antibiotiques (**Figure 6**).

#### Imperméabilité et limitation de l'entrée de l'antibiotique

L'imperméabilité limite l'entrée d'antibiotique dans la cellule. De par la présence d'une membrane externe, les bactéries à Gram négatif présentent une perméabilité aux antibiotiques inférieure comparé aux bactéries à Gram positif, leur procurant une résistance naturelle à certains antibiotiques (Blair et al. 2015).

De plus certaines bactéries ne possèdent pas de paroi cellulaire, c'est le cas de *Mycoplasma*, conférant donc une résistance aux molécules antibiotiques ayant pour cible la paroi cellulaire, comme les  $\beta$ -lactamines et les glycopeptides (Reygaert 2018).

L'entrée des antibiotiques peut également se faire via des porines. Une autre façon de diminuer la perméabilité à ces antibiotiques est donc soit de diminuer le nombre de porines présentes, mécanisme retrouvé chez les entérobactérales conférant une résistance aux carbapénèmes, ou alors de changer la sélectivité de ces porines par mutation. Ces mutations ont été observés chez *Klebsiella aerogenes* ou encore chez *Pseudomonas aeruginosa* avec des mutations dans le gène *oprD*, entraînant la résistance à l'imipénème (Reygaert 2018; Kumar and Schweizer 2005).

#### Transport des antibiotiques par efflux actif

Les pompes à efflux sont des transporteurs énergie-dépendant situés sur la membrane cytoplasmique et sont présentes chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif mais également chez les eucaryotes. Elles permettent le transport actif d'une grande variété de substrats, dont les antibiotiques, à l'extérieur de la cellule. En 1980 a été décrit pour la première fois chez *E. coli* une pompe à efflux, codée par un plasmide, expulsant la tétracycline en dehors de la cellule (Ball, Shales, and Chopra 1980).

Les pompes à efflux sont soit exprimées de manière constitutive soit induites ou surexprimées dans certaines conditions. L'expression accrue des pompes à efflux à la suite de mutations peut conférer des résistances multiples aux antimicrobiens. Les gènes codant ces pompes à efflux sont généralement chromosomiques et sont conservés chez les bactéries (Blair, Richmond, and Piddock 2014). Les pompes à efflux spécifiques d'un seul substrat sont souvent codées par des EGM. Ces systèmes d'efflux spécifiques ont été majoritairement identifiés dans des résistances aux macrolides, aux lincosamides et/ou aux streptogramines, aux tétracyclines, aux  $\beta$ -lactamines, ainsi qu'au chloramphénicol chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Butaye, Cloeckert, and Schwarz 2003).

Il existe 6 familles de pompes à efflux classées selon leur structure et leur source d'énergie : ATP-binding cassette (ABC), resistance-nodulation-cell division (RND), multidrug and toxic compound extrusion (MATE), major facilitator superfamily (MFS), small multidrug resistance (SMR) et proteobacterial antimicrobial compound efflux (PACE) (Gaurav et al. 2023).

Chez les bactéries à Gram négatif ces 6 familles de pompes à efflux sont largement répandues mais les plus retrouvées cliniquement sont celles de la famille RND. Le système RND le mieux caractérisé est le système AcrAB-TolC de *E. coli*, qui est constitué de trois composants : un transporteur de la membrane interne (AcrB), un canal protéique de la membrane externe (TolC) et une protéine adaptatrice périplasmique (AcrA). Tandis que chez les bactéries à Gram positif on retrouve essentiellement les pompes de la famille MFS (Reygaert 2018; Blair, Richmond, and Piddock 2014).

### Modification de la cible

Tous les composants de la cellule qui peuvent être ciblés par les antibiotiques sont susceptibles d'être modifiés par la bactérie afin de devenir résistante. Pour chaque mécanisme d'action des antibiotiques cités précédemment il existe un exemple de résistance :

- Un exemple de modification de la cible chez les bactéries à Gram positif est la modification de la structure et du nombre de PLP impactant la fixation des  $\beta$ -lactamines sur ces protéines (Reygaert 2018). Également, par l'acquisition du gène *van*, les bactéries peuvent devenir résistantes à la vancomycine, antibiotique de la famille des glycopeptides, ce gène permet la modification de la structure des précurseurs du peptidoglycane et donc moins de liaison de l'antibiotique (Beceiro, Tomás, and Bou 2013).
- Pour les antibiotiques ciblant le ribosome, la résistance peut survenir suite à des mutations de celui-ci, une méthylation des sous-unités impliquant généralement les gènes *erm* ou encore une protection du ribosome, tous trois empêchant la fixation des antibiotiques sur le ribosome (Reygaert 2018).
- Dans le cas des fluoroquinolones, inhibant la synthèse des acides nucléiques, ce sont des modifications au niveau des gyrases et des topoisomérases IV qui ont lieu (Redgrave et al. 2014).
- Enfin, pour les antibiotiques inhibant les enzymes impliquées dans la synthèse des folates, des mutations vont avoir lieu dans ces enzymes provoquant un changement de la structure de l'enzyme, ce qui va empêcher l'antibiotique de se fixer mais pas le substrat naturel (Reygaert 2018).

### Inactivation enzymatique

Les antibiotiques peuvent être inactivés soit par dégradation soit par transfert d'un groupe chimique sur l'antibiotique. Ce sont majoritairement des groupes acétyle, phosphoryle et adényle qui sont transférés sur les antibiotiques. Les acétylations sont utilisées sur les aminosides, les phénicolés et les streptogramines, tandis que les phosphorylations et les adénylations sont faites sur les aminosides (Reygaert 2018).

Le mécanisme d'inactivation enzymatique le plus utilisé chez les bactéries à Gram négatif pour résister aux  $\beta$ -lactamines est la production de  $\beta$ -lactamases. Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes permettant l'hydrolyse des antibiotiques par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame. L'ouverture du cycle ne permet pas aux bêta-lactamines de se fixer sur les PLP et donc d'exercer leur action (Bush 2018).

L'origine de ces  $\beta$ -lactamases peut être chromosomique ou alors acquise par un plasmide. Beaucoup de bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* ont des gènes codant des  $\beta$ -lactamases sur leur chromosome. C'est aussi dans cette même famille que l'on retrouve principalement des  $\beta$ -lactamases plasmidiques (Schultsz and Geerlings 2012).

Des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ont été développés, ils possèdent une structure semblable à celle des  $\beta$ -lactames. Ils sont utilisés en association avec des  $\beta$ -lactamines, car ils n'ont pas une forte activité antimicrobienne seuls. Les associations les plus souvent utilisées sont : amoxicilline/acide clavulanique, ampicilline/sulbactam et pipéracilline/tazobactam (Reygaert 2018)

Les  $\beta$ -lactamases peuvent être classées selon leur structure, c'est le cas de la classification de Ambler (Ambler 1980) qui les regroupe en 4 classes : A, B, C et D. Un résidu sérine se trouve sur le site actif des  $\beta$ -lactamases de classe A, C et D tandis que celles de la classe B ont un ion zinc, on les nomme métallo- $\beta$ -lactamases (MBL).

Les bactéries à Gram positif vont principalement produire des  $\beta$ -lactamases du groupe A et quelques-unes du groupe B tandis que les bactéries à Gram négatif produisent des  $\beta$ -lactamases appartenant à chacun des groupes (Schultsz and Geerlings 2012).

Une autre classification de Bush et al. classe ces enzymes en fonction de leur substrat et de leurs profils d'inhibition. Trois groupes majeurs se distinguent à travers cette classification : i) les céphalosporinases du groupe 1, ii) les sérine  $\beta$ -lactamases du groupe 2, et iii) les MBL du groupe 3 (Bush and Jacoby 2010).



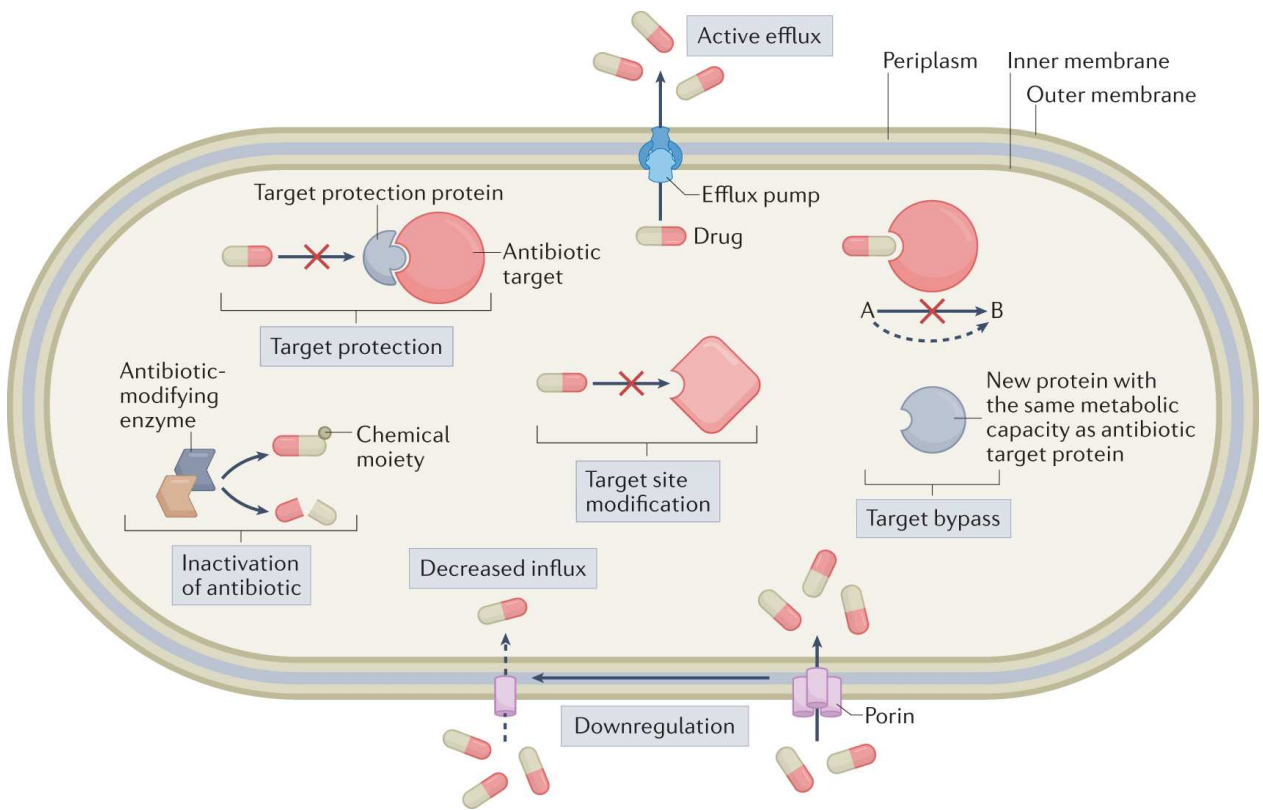


Figure 6 : Mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques (Darby et al. 2023)

## II. Les voies de transmission de la résistance selon le concept One-Health

---

### II.1. Le concept One-Health

Chaque compartiment où sont utilisés ou déversés les antibiotiques devient un potentiel réservoir de résistance, c'est donc le cas chez l'Homme, chez l'animal mais également dans l'environnement. Outre l'utilisation des antibiotiques, la présence de microorganismes producteurs d'antibiotiques, comme c'est le cas dans le sol, fait également de cet écosystème un réservoir potentiel de résistance.

De plus ces trois secteurs sont en lien étroit. C'est donc par le constat de cette interdépendance entre les compartiments humain, animal et environnemental que le concept One-Health, ou Une Seule Santé en français, a été introduit au début des années 2000. Ce concept avait été premièrement mis en avant par Rudolf Virchow dans les années 1800, décrétant qu'il n'y avait pas de frontière entre la médecine humaine et la médecine animale. Puis, c'est en 2004 que la Wildlife Conservation Society introduit cette approche lors d'un symposium et y présente les 12 principes de Manhattan consistant à utiliser une approche holistique afin d'assurer la prévention des épidémies et également conserver les écosystèmes en faveur de l'Homme et de l'animal. Enfin en 2007, l'alliance faite entre l'Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation mondiale de la Santé Animale (OIE, maintenant WOAH) adopte ce concept One-Health (Bénie Bi Vroh and Seck 2016).

Plus précisément, l'approche One Health est définie comme une approche collaborative, transdisciplinaire et multi-sectorielle visant à équilibrer et à optimiser durablement la santé des personnes, des animaux et des écosystèmes. Elle reconnaît le lien et l'interdépendance entre la santé des êtres humains, des animaux domestiques et sauvages, des plantes et de l'environnement (Panel (OHHLEP) et al. 2022) (**Figure 7**). Cette approche est utilisée dans différents secteurs, notamment pour la gestion des zoonoses ou la recherche pour la gestion des maladies à transmission vectorielle ou pour lutter contre la résistance aux antimicrobiens.

La notion de santé chez l'humain et l'animal est plutôt simple à comprendre, elle a été définie par l'OMS comme « un état de complet bien-être physique, mental et social, et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité ».

Pour l'environnement la notion de santé est plus complexe et sa définition a été proposée plus récemment. La santé de l'environnement, d'un écosystème, correspond au bon fonctionnement de celui-ci. En clair, la santé des écosystèmes est définie comme suit : « État de diversité et de fonctionnement d'un écosystème qui, en tant qu'unité écologique située dans un cadre spatio-temporel délimité, se caractérise par ses propriétés physico-chimiques et biologiques, dont sa robustesse et sa résilience, notamment au regard de stress extérieurs. Un écosystème est donc en "bonne santé" quand il préserve le maximum de ses fonctions, de ses dynamiques et de ses capacités évolutives potentielles, ainsi que celles des systèmes qu'il inclut et qui l'incluent » (Giraudoux 2022).

Les écosystèmes sont généralement dans un équilibre stable et certains facteurs peuvent perturber cet équilibre ; c'est notamment le cas du changement climatique, de certaines pratiques agricoles, de la mondialisation ou encore de la pollution anthropique. Ces facteurs donnent la possibilité aux pathogènes d'évoluer et augmente les fréquences de transmission entre les différents compartiments.

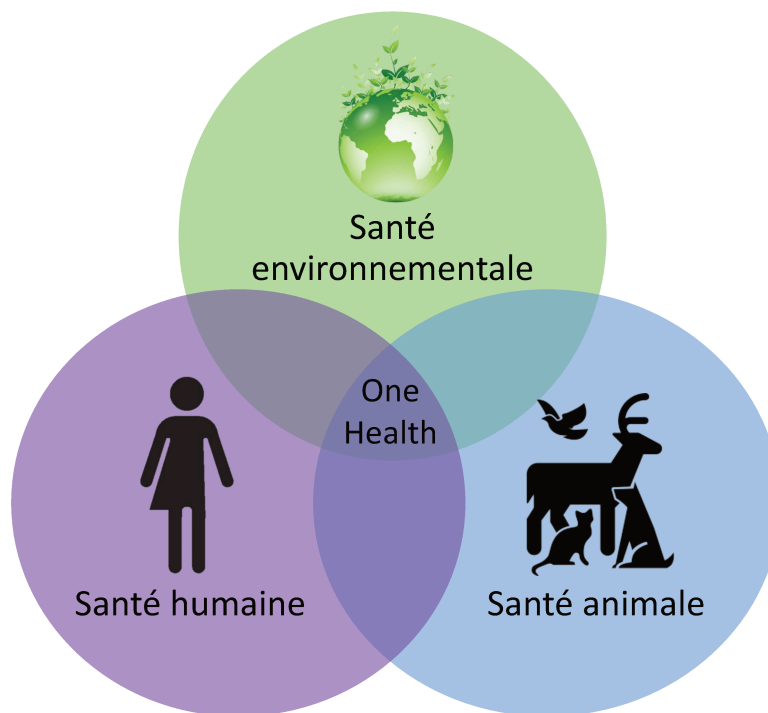


Figure 7 : Représentation schématique du concept One-Health

## II.2. La résistance aux antibiotiques chez l'Homme et l'animal

### II.2.1. Consommation et résistance chez l'Homme

L'Homme héberge une grande diversité de bactéries, le microbiote intestinal humain est notamment composé de milliards de bactéries ( $10^{14}$ ) appartenant à plus de 1500 espèces différentes (Gomaa 2020). Une partie de ces bactéries sont pathogènes opportunistes causant des infections qu'il est nécessaire de soigner et qui nécessitent donc l'utilisation d'antibiotiques. L'utilisation des antibiotiques est différente suivant les pays, que ce soient des pays à bas, moyen et haut niveau de revenus. En Europe, par exemple, la consommation d'antibiotiques diffère entre les pays du nord et du sud, avec une consommation faible à modérée dans les pays du nord et de l'est et une plus forte consommation dans le sud et l'ouest de l'Europe (Machowska and Stålsby Lundborg 2019 ; ECDC 2019).

La France est l'un des pays qui consomme le plus d'antibiotiques. En effet en 2021, à l'échelle européenne, la France était le 4<sup>ème</sup> pays ayant le plus consommé d'antibiotiques, les 3 premiers pays consommateurs étant la Grèce, la Roumanie et la Bulgarie (Santé publique France 2022a).

628 tonnes d'antibiotiques ont été vendus en France en 2020. Parmi ce tonnage, 92% de ces antibiotiques étaient prescrits par la médecine de ville tandis que 8% étaient prescrits en établissements de santé. Une diminution importante de 19% de la consommation d'antibiotiques a été constatée entre 2019 et 2020 en raison de la pandémie de Covid-19 et donc à la mise en place de confinements et des gestes barrières mais aussi le nombre de consultations qui ont diminué et qui ont donc fait chuter le nombre de prescriptions. Mais la prescription d'antibiotiques reconnus comme étant générateurs de résistances tels que l'amoxicilline-acide clavulanique, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération ou encore les fluoroquinolones, restent stable chez les adultes (ANSM 2021).

Une forte diminution de la consommation d'antibiotiques avait déjà eu lieu au début des années 2000, entre 2000 et 2004, puis la tendance s'était stabilisée les années suivantes avant qu'une baisse de 8,5% ait été observée en France entre 2016 et 2019, avec notamment une réduction de l'usage d'antibiotiques dits critiques (ANSM 2023) (**Figure 8**).

La consommation d'antibiotiques en ville en 2021 en France était de 19,0 doses définies journalières pour 1 000 habitants par jour (DDJ/1000 H/J). En Guadeloupe, lieu d'intérêt de cette étude, la consommation est inférieure, elle est de 12,9 DDJ/1000 H/J. En établissement de santé en France elle était de 282 DDJ pour 1 000 journées d'hospitalisation (DDJ/1000 JH) et en Guadeloupe de 89 DDJ/1000 JH (**Figure 9**) (Géodes 2023).

Au niveau Européen en 2019, les consommations d'antibiotiques en ville étaient de 18,0 DDJ/1000 H/J et de 1,77 DDJ/1000 H/J en établissement de santé.

Parmi les antibiotiques les plus consommés, les pénicillines sont les antibiotiques les plus utilisés à l'échelle Européenne. En France leur consommation en 2019 représentait 57% de la consommation totale d'antibiotiques en ville. En établissement de santé, l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique, l'amoxicilline et la ceftriaxone sont les trois antibiotiques principalement utilisés (HAS 2021).

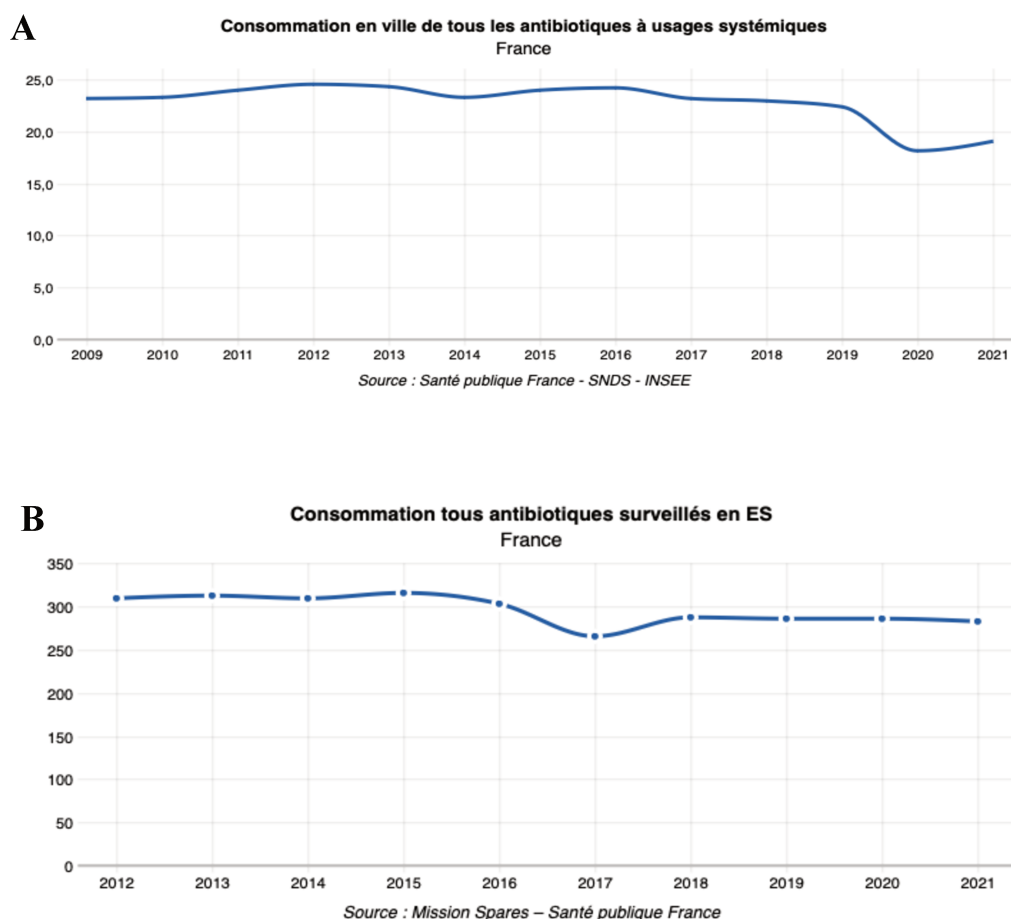
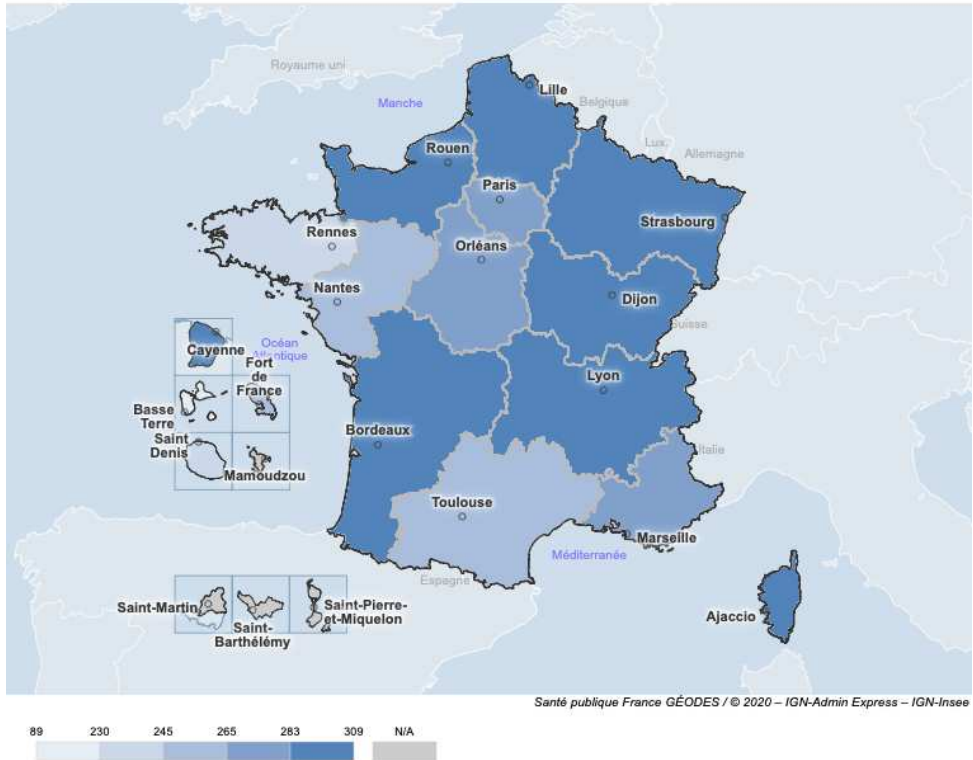


Figure 8 : Évolution de la consommation des antibiotiques en ville (en DDJ/1000 H/J) (A) et en établissement de santé (en DDJ/1000 JH) (B) entre 2009 et 2021 et entre 2012 et 2021 respectivement, en France (source Géodes)

A

Tous antibiotiques, 2021 (DDJ / 1 000 JH) - Source : Mission Spares – Santé publique France



B

Tous antibiotiques à usages systémiques - tous âges, 2021 (DDJ/1000 hab./jour) - Source : Santé publique France - SNDS - INSEE

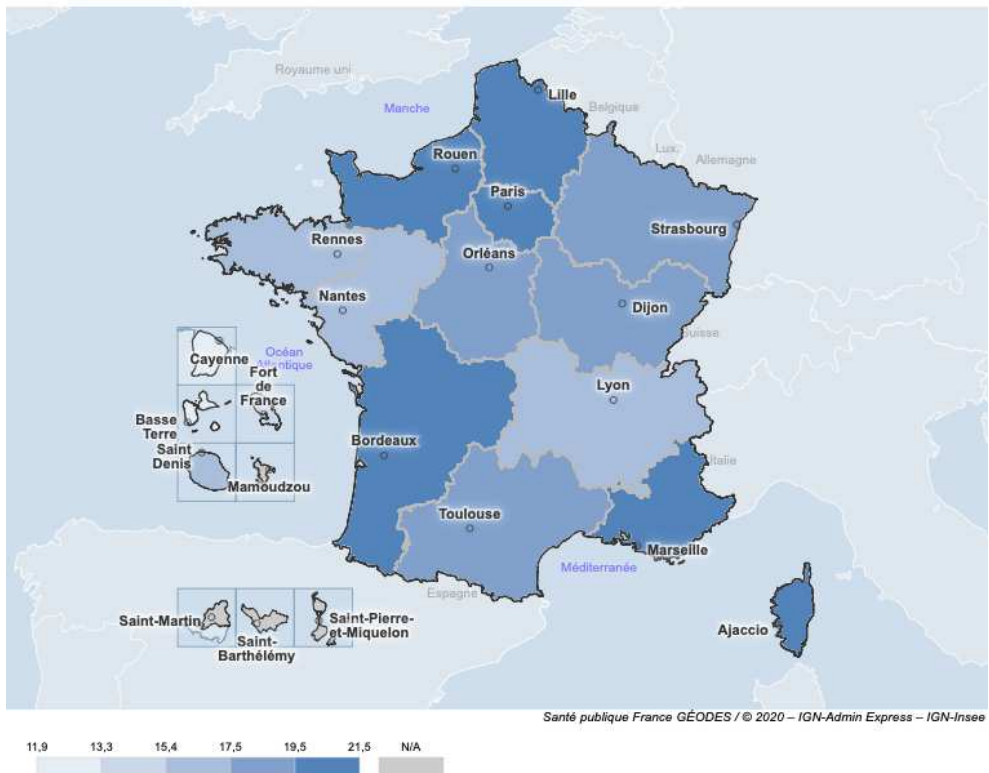


Figure 9 : Consommation des antibiotiques en France métropolitaine et en outre-mer, A – en établissement de santé (DDJ/1000 JH) et B – en ville (DDJ/1000 H/J), en 2021. En bleu foncé sont illustrés les régions les plus consommatrices, en bleu clair les régions les moins consommatrices et en gris les régions où les données ne sont pas disponibles (source Géodes)

Cette consommation excessive et abusive des antibiotiques est l'une des principales causes de la RAM. L'OMS considère l'utilisation des antibiotiques comme étant rationnelle lorsque les patients reçoivent les médicaments appropriés, pour des indications appropriées, à des doses qui répondent à leurs besoins, pendant une période adéquate, au coût le plus bas pour eux et pour la société, et avec des informations appropriées. L'usage des antibiotiques est donc considéré irrationnel si une ou plusieurs de ces conditions ne sont pas remplies (Machowska and Stålsby Lundborg 2019).

Les estimations montrent que dans 20 à 50 % des cas l'utilisation des antibiotiques est douteuse (Čižman 2003). Cette surconsommation d'antibiotiques engendre un risque accru d'effets secondaires indésirables et un taux plus élevé de résistance aux antibiotiques. Comme décrit précédemment il existe des différences entre les pays dans l'utilisation des antibiotiques.

Dans beaucoup de pays l'accès aux antibiotiques n'est pas bien régulé notamment dans les pays à faibles et moyens revenus. En Europe en 2021, près de 8% des antibiotiques ont été pris sans prescription et souvent dans des cas où il n'était pas nécessaire d'en prendre, comme par exemple lors d'infections virales (<https://europa.eu/eurobarometer/surveys/detail/2632>).

Des études ont également montré que le Vietnam et le Bangladesh sont les pays ayant la plus forte proportion de lieux sans licence où les antibiotiques sont administrés, les antibiotiques les plus importants y sont largement disponibles (Tang, Millar, and Moore 2023). Il est estimé qu'environ 10 % des médicaments dans le monde sont issus de contrefaçon ou sont de mauvaise qualité. C'est un problème qui affecte majoritairement les pays à faibles et moyens revenus à cause des manquements qu'il existe dans ces pays en terme de réglementation et de surveillance (Sulis, Sayood, and Gandra 2022).

D'autres facteurs viennent s'ajouter à cela conduisant à une utilisation accrue des antibiotiques, plus particulièrement dans les pays en développement. En effet, l'accroissement rapide de la population dans les pays à faibles et moyens revenus, les problèmes d'hygiène récurrents (peu de systèmes d'assainissement fiable), l'automédication, peuvent être des facteurs de l'augmentation de la résistance de par l'augmentation de la transmission de bactéries (Ikhimiukor et al. 2022).

Aussi, il résulte du manque d'hygiène une augmentation des infections et en conséquence une plus grande utilisation d'antibiotiques. Le manque d'accès à l'eau potable et à l'assainissement ou encore la difficulté d'accéder aux services de santé suscitent une grande préoccupation dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques dans ces pays. En effet, certaines  $\beta$ -lactamases trouvent leur origine dans ces pays, c'est le cas de NDM, du gène de résistance à la colistine *mcr-1* ou encore des BLSE responsables des résistances aux céphalosporines de 3ème génération (Rousham, Unicomb, and Islam 2018). Les pays à faibles et moyens revenus sont également soumis à d'autres problèmes qui sont moins communs dans les pays à haut revenus, comme la pauvreté et la corruption (Tang, Millar, and Moore 2023).

Le faible niveau de certaines populations encore peu sensibilisées aux bonnes pratiques d'usage des antibiotiques peuvent inciter les malades à s'automédicament, à acheter des médicaments dans des officines non réglementées, ... (Pokharel, Raut, and Adhikari 2019). Il est donc nécessaire de sensibiliser les populations. Selon des sondages, sur des personnes interrogées quant à leurs connaissances sur les antibiotiques, 57% d'entre eux ignoraient que les antibiotiques n'étaient pas efficaces contre les virus et 44% n'étaient pas avertis qu'ils n'ont pas d'effets contre le rhume ni la grippe. Cette sensibilisation de la population sur le fonctionnement est différent entre les pays, les personnes vivant dans des pays où le niveau d'éducation est plus faible et la situation économique moins bonne ayant tendance à utiliser plus d'antibiotiques (Čižman 2003).

De plus, sachant qu'environ 85% de la population vit dans ces pays à faibles et moyens revenus, dont presque la moitié habite dans seulement 5 pays : Brésil, Russie, Inde, Chine et Afrique du Sud, cela conduit à une augmentation du risque de développer des résistances aux antibiotiques. Il est estimé que ces pays à faibles et moyens revenus représenteront 80% des 10 millions de morts prévus en conséquence de la résistance aux antimicrobiens (Sulis, Sayood, and Gandra 2022).

Avec la variation de l'utilisation des antibiotiques en fonction des pays, varient également les taux de résistance. Il est estimé qu'en 2019, c'était en Afrique subsaharienne que les taux de RAM étaient les plus élevés tandis que c'est en Australie que ces taux sont les moins élevés (Murray et al. 2022). Ainsi, le pourcentage de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes varie énormément à travers l'Europe. Il est très faible dans plusieurs pays tels que la Croatie, l'Islande, L'Estonie, la Norvège, le Luxembourg et la Slovénie tandis qu'il atteint plus de 64% en Grèce (Machowska and Stålsby Lundborg 2019).

L'un des principaux défis de la lutte contre la résistance aux antimicrobiens est de comprendre le véritable poids de la résistance, notamment dans les endroits où la surveillance est faible et où les données sont rares, c'est le cas dans les pays à faibles et moyens revenus (Murray et al. 2022). C'est pourquoi des plans de surveillance ont été mis en place. En France, 48 programmes de surveillance existent et s'intéressent à la résistance aux antibiotiques, l'utilisation des antibiotiques et les résidus d'antibiotiques, dont 35 concernent l'Homme. La majorité de ces programmes couvrent le territoire national et une partie inclue également les départements et régions d'outre-mer (Collineau et al. 2023).

L'OMS a établi une classification des antibiotiques en 3 groupes selon deux critères afin de garantir une utilisation prudente des antibiotiques en médecine humaine et en médecine vétérinaire pour aider dans la gestion de la résistance aux antimicrobiens. Les 3 groupes de cette classification sont : Importance critique, Hautement important et Important.

Le premier critère correspond aux antimicrobiens qui sont les seuls ou un des seuls permettant de traiter des infections graves chez l'Homme. Le second critère se rapporte aux antimicrobiens utilisés pour soigner les infections chez l'Homme, causées soit par des bactéries susceptibles d'être transmises à l'homme par des sources non humaines soit des bactéries pouvant acquérir des gènes de résistance à partir de sources non humaines.

Les antibiotiques sont classés dans la catégorie Importance critique lorsqu'ils croisent à la fois le premier et le second critère. On retrouve dans cette catégorie par exemple les antibiotiques de la classe des aminosides, des carbapénèmes, des céphalosporines de dernière génération, les polymyxines ou encore les quinolones. Pour être classés comme Hautement important, les antibiotiques doivent répondre soit au critère 1 soit au critère 2, c'est le cas de certaines pénicillines, des streptogramines, des sulfamides ou encore des tétracyclines. Enfin, les antibiotiques sont classés Important lorsqu'ils ne répondent à aucun de ses 2 critères, on retrouve ici la bacitracine ou encore des dérivés de nitrofuranes (WHO, 2019).

Les infections causant le plus de décès à cause ou associés à la résistance sont les pneumonies, les bactériémies et les infections intra-abdominales. Ces infections représentaient en 2019 plus de 78% des décès attribuables à la RAM, les infections des voies respiratoires inférieures étant les plus prévalentes (Murray et al. 2022). De plus, ce sont les bactéries *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* qui sont les principaux pathogènes à l'origine des décès associés à la résistance avec ici aussi des différences en fonction des pays (Murray et al. 2022). Dans les régions à revenus élevés, deux pathogènes sont responsables de quasiment la moitié des décès liés à la RAM, ces deux pathogènes sont *S. aureus* et *E. coli*. En revanche, en Afrique

subsaharienne ce sont les pathogènes *S. pneumoniae* et *K. pneumoniae* qui sont majoritairement responsables des décès liés à la RAM (Murray et al. 2022).

La majeure partie de ces bactéries appartient notamment au groupe des ESKAPE-E (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., et *E. coli*). Ce groupe représente les principales causes d'infections nosocomiales dans le monde. Mais le réservoir des ESKAPE-E ne se restreint pas au milieu hospitalier, ces bactéries ont également été retrouvées dans des réservoirs extra-hospitaliers, tels que le sol, la nourriture, diverses sources d'eau, les plantes ou encore les eaux usées (Denissen et al. 2022).

L'OMS a établi une liste de pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques, dont les ESKAPE-E. Ces bactéries sont des pathogènes considérés comme étant une menace pour la santé humaine, plus particulièrement des bactéries à Gram négatif résistantes à plusieurs antibiotiques. Trois catégories sont distinguées : critique, élevé et médium :

- Priorité 1 : critique

- *Acinetobacter baumannii*, résistant aux carbapénèmes
- *Pseudomonas aeruginosa*, résistant aux carbapénèmes
- *Enterobacteriaceae*, résistants aux carbapénèmes, producteurs de BLSE

- Priorité 2 : élevé

- *Enterococcus faecium*, résistant à la vancomycine
- *Staphylococcus aureus*, résistant à la méthicilline, intermédiaire et résistant à la vancomycine
- *Helicobacter pylori*, résistant à la clarithromycine
- *Campylobacter* spp., résistant aux fluoroquinolones
- *Salmonella*, résistant aux fluoroquinolones
- *Neisseria gonorrhoeae*, résistant aux céphalosporines, résistant aux fluoroquinolones

- Priorité 3 : médium

- *Streptococcus pneumoniae*, non sensible à la pénicilline
- *Haemophilus influenzae*, résistant à l'ampicilline
- *Shigella* spp., résistant aux fluoroquinolones

En 2022, 7,5 % des entérobactérales étaient productrices de BLSE, aussi, la fréquence de la résistance à la méthicilline chez les souches de *S. aureus* était de 12,0 %. *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* complexe représente à eux seuls 92,4 % des entérobactérales productrices de BLSE (Santé Publique France, 2022b).



## II.2.2. Consommation et résistance chez les animaux

Face à l'augmentation de la population mondiale et à la mondialisation croissante, la demande de sources alimentaires d'origine animale augmente également et a donc entraîné une croissance massive de la production alimentaire animale ces dernières années (Zhao et al. 2021).

Toutefois, tout comme chez les humains, les animaux sont sujets à des infections qui doivent être traitées. Les antibiotiques sont utilisés à la fois chez les animaux destinés à la consommation humaine et chez les animaux de compagnie. Il est estimé que 95% des antibiotiques sont donnés aux animaux destinés à la consommation humaine tandis que 5% sont utilisés chez les animaux de compagnie (Santé Publique France 2017). Mais ces antimicrobiens sont utilisés différemment chez ces deux types d'animaux. Chez les animaux de compagnie ils sont utilisés pour traiter des infections tandis que chez les animaux destinés à la consommation humaine ils sont utilisés pour traiter les infections et prévenir des maladies chez des animaux sains (prophylaxie et métaphylaxie), mais également dans certains pays en tant que promoteur de croissance. Même si depuis 2006, l'utilisation des antibiotiques comme promoteur de croissance a été banni dans l'Union Européenne (Directive 96/22/EC amended by Directives 2003/74/EC and 2008/97/EC), elle est toujours autorisée en Amérique du Nord et du Sud et en Asie (Chardon et Brugere 2014). Des alternatives peuvent être utilisées en tant que promoteur de croissance ou additifs alimentaires afin d'améliorer la santé animale, comme par exemple les probiotiques ou les prébiotiques, les acides organiques, les minéraux ou encore les vitamines (Ikhimiukor et al. 2022).

Les antibiotiques ont été utilisés en agriculture pour la première fois en 1938, il s'agissait d'un antibiotique de la famille des sulfamides, le Prontosil (Kirchhelle 2018). Depuis, la consommation des antibiotiques a augmenté au fil des années. Dans les pays de l'Union Européenne/Espace Économique Européen, 371 tonnes d'antibiotiques ont été vendus en médecine vétérinaire en 2021, un chiffre presque quatre fois moins important qu'en 1999 où le volume des ventes s'élevait à 1311 tonnes, soit une diminution de 72% (**Figure 10**). Parmi les antibiotiques vendus, 88% du volume total est représenté par cinq familles, il s'agit des tétracyclines, des pénicillines, des sulfamides, des macrolides et des aminoglycosides. Les antibiotiques tels que les céphalosporines de dernière génération et les fluoroquinolones, considérés comme antibiotiques d'importance clinique représentaient, en 2021, 0,2% du volume total (ANSES 2022).

En France, l'exposition des animaux producteurs de denrées alimentaires aux antibiotiques a baissé lors des 10 années précédentes, la diminution varie selon l'espèce concernée, chez les bovins on observe une baisse de 23%, 44,7% pour les lapins, 58,5% pour les porcs et 67,9% pour les volailles tandis que chez les animaux de compagnie (chats et chiens) l'exposition reste semblable à celle de 2011. La part du volume total d'antibiotiques vendu pour traiter ces animaux de compagnie est d'environ 12% (ANSES 2022).

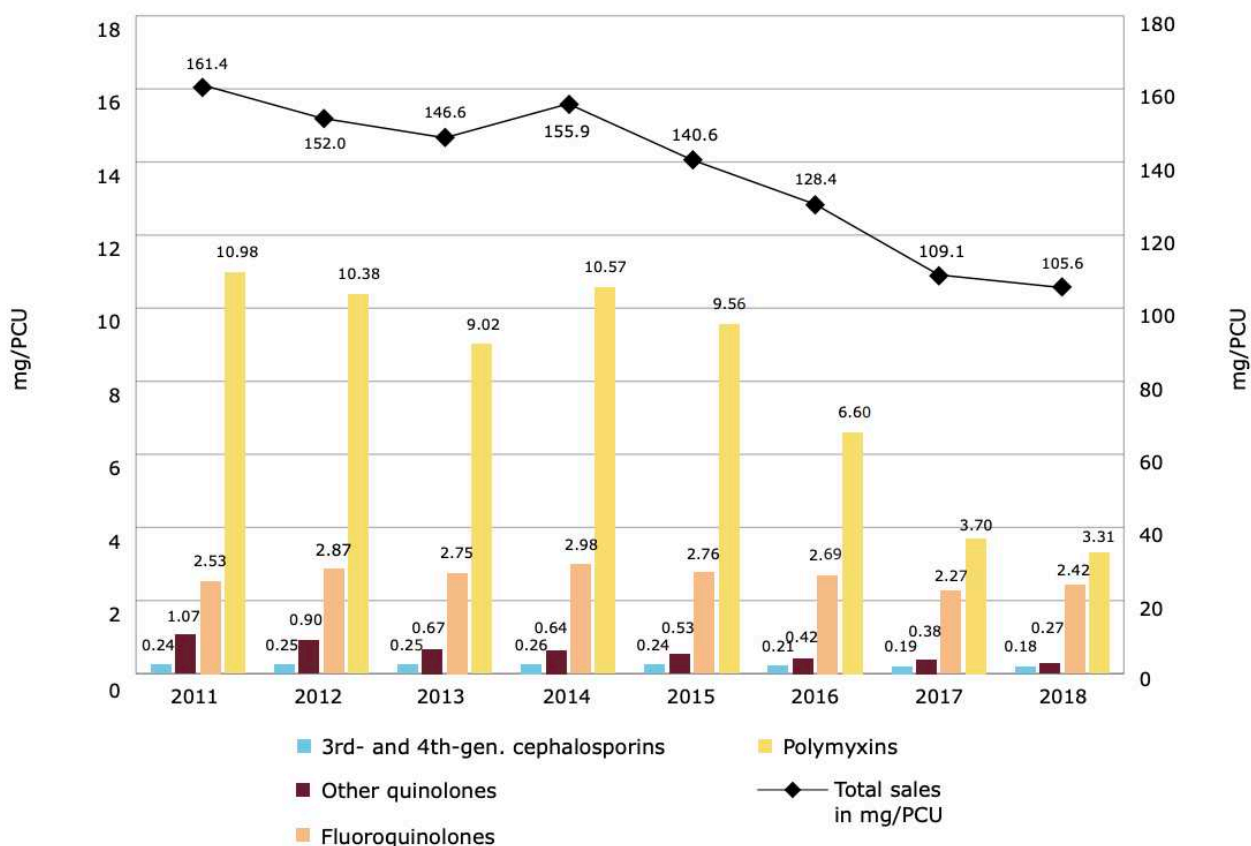


Figure 10 : Évolution des ventes globales d'antibiotiques vétérinaires en mg/PCU et des ventes de fluoroquinolones, d'autres quinolones, de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération et de polymyxines, pour 25 pays de l'Union Européenne/Espace Économique Européen (UE/EEE), entre 2011 et 2018. PCU = Population Correction Unit (European Medicines Agency, 2020).

Certains antibiotiques sont uniquement réservés à un usage vétérinaire notamment de par leur toxicité pour l'Homme, tel est le cas par exemple des flavophospholipols et des ionophores. Mais une grande majorité des antibiotiques restent encore utilisés à la fois chez l'Homme et chez les animaux (McEwen and Collignon 2018).

Une catégorisation des antibiotiques a été établie à l'échelle européenne en 2019 par l'Antimicrobial Advice *Ad Hoc* Expert Group (AMEG) en prenant en compte les conséquences de l'utilisation des antibiotiques chez l'animal pour la santé publique. Elle doit guider les vétérinaires dans leur choix pour la prescription d'antibiotiques.

On distingue quatre catégories : la catégorie A correspond aux antibiotiques à **éviter**, l'utilisation de ces antibiotiques est interdite en médecine vétérinaire et également non autorisée pour les animaux de production alimentaire. S'en suit la catégorie B, qui se réfère aux antibiotiques dont l'utilisation est **restreinte** car ce sont des antibiotiques considérés comme d'importance critique pour la santé humaine, ils doivent donc être utilisés que dans le cas où les antibiotiques des catégories suivantes, C et D, ne sont pas efficaces. Sont inclus dans cette catégorie les polymyxines, les quinolones, dont les fluoroquinolones, et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération. La catégorie C englobe les antibiotiques pour lesquels une **attention** particulière doit être portée, comme dans la catégorie B ils doivent être employés seulement si les traitements de la catégorie D sont inefficaces, mais il existe une alternative à ces antibiotiques en médecine humaine. Il s'agit des antibiotiques de la classe des aminoglycosides,

des céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération, des macrolides, des phénicolés, des pleuromutilines, des lincosamides, de la rifaximine ainsi que des aminopénicillines combinés avec un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase. Enfin la catégorie D inclut les antibiotiques qui sont à utiliser avec **prudence**, tels que les pénicillines, les tétracyclines, l'acide fusidique, certains sulfamides, le métronidazole, les aminopénicillines et les dérivés de nitrofurane. Ce sont ces antibiotiques qui sont considérés de première intention mais ils sont également à employer que lorsque c'est indispensable (ANSES 2021).

Le plan Ecoantibio a été lancé par le ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt dans le but de réduire la résistance aux antibiotiques en médecine vétérinaire et maintenir leur efficacité. Ce plan s'applique à tous les animaux, incluant également les animaux de compagnie et ce dans toute la France y compris en Outre-mer.

Le premier plan Ecoantibio s'est déroulé entre 2012 et 2016 et visait une réduction de 25% de l'exposition des animaux aux antibiotiques et particulièrement une diminution de l'utilisation des antibiotiques d'importance critique comprenant les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération ainsi que les fluoroquinolones. L'exposition est mesurée par l'indicateur ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials) qui tous les ans est déterminé par l'ANSES-ANMV (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Agence nationale du médicament vétérinaire). Les objectifs de ce premier plan ont largement été dépassés puisqu'en 5 ans l'exposition des animaux aux antibiotiques a diminué de 37% et la prescription des fluoroquinolones et des céphalosporines de dernières générations a baissé de 75% et 81% respectivement. Le second plan Ecoantibio (2017 – 2022) avait pour objectifs de maintenir les efforts réalisés lors du premier plan mais aussi de réduire de 50% chez les bovins, les porcs et les volailles l'exposition à la colistine et de diminuer de 50%, dans les échantillons de viande de volaille, la prévalence de *E. coli* BLSE (<https://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2012-2017-lutte-contre-lantibioresistance>).

Pour suivre la RAM chez les animaux, des plans de surveillance ont été mis en place. En France, un des réseaux de surveillance chez les bactéries pathogènes des animaux a été créé par l'ANSES en 1982, il s'agit du réseau Résapath. Cette surveillance couvre toutes les espèces d'élevage (porcs, bovins, volailles...) ainsi que les animaux de compagnie.

Un très grand éventail de GRA portés par divers hôtes bactériens a été identifié dans les intestins des animaux. La prévalence de ces gènes peut être corrélée à l'utilisation d'antibiotiques (Zhao et al. 2021). Les antibiotiques sont régulièrement détectés dans le système gastro-intestinal du bétail à des concentrations faibles et sublétales qui ralentissent la croissance des populations bactériennes sensibles. Cela exerce une pression de sélection sur les bactéries du système digestif pour qu'elles acquièrent et conservent des GRA et favorise l'augmentation de l'abondance relative des populations résistantes (He et al. 2020).

Plusieurs centaines de GRA ont été identifiés dans les filières de production animale, il s'agit de gènes conférant des résistances à diverses classes d'antibiotiques tels que les aminoglycosides, le chloramphénicol, la streptomycine, les fluoroquinolones, la pénicilline, les sulfamides, les tétracyclines, la vancomycine... (Zhao et al. 2021). La tétracycline est l'antibiotique le plus utilisé chez les animaux, c'est pourquoi les gènes de résistance à la tétracycline sont les plus fréquemment retrouvés dans le microbiome animal ainsi que les gènes de résistance aux sulfamides (Pal et al. 2016).

C'est aussi dans la filière animale qu'a été identifié en 2016, pour la première fois, le gène plasmidique de résistance à la colistine, *mcr-1*, dans un élevage de porcs en Chine où l'utilisation de la colistine en agriculture était élevée (Liu et al. 2016). Ce gène a ensuite été disséminé globalement et est maintenant retrouvé à la fois chez l'Homme et chez l'animal sur tous les continents (Chow, Ghaly, and Gillings 2021).

Il existe des différences de prévalence des GRA selon les pays. Par exemple, parmi les pays en développement, la Chine et l'Inde sont les plus grands foyers d'animaux porteurs de gènes de résistance, tandis que le Brésil et le Kenya sont considérés comme des hotspots émergents (Zhao et al. 2021). Une comparaison par analyse génomique du microbiote intestinal de porcs provenant de France, du Danemark et de Chine a montré une abondance en GRA plus de 10 fois plus élevée chez les porcs chinois en raison de l'utilisation continue de faibles doses d'antibiotiques (Xiao et al. 2016). La présence des GRA chez les animaux dépend également de l'espèce animale, en effet, les porcs ont une abondance plus importante de GRA tandis que les volailles ont un résistome plus diversifié (Munk et al. 2018).

L'aquaculture est un élevage complexe et qui peut être facilement influencé par les facteurs environnementaux et anthropiques. Un large panel de GRA y a été identifié, avec notamment de gènes conférant des résistances aux tétracyclines (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* et *tetG*), aux quinolones (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS1*), aux macrolides (*mphA* et *erm*), aux aminosides (*aph*, *aad* et *aac(6)-Ib*), au chloramphénicol (*catA2*, *cml* et *floR*), aux  $\beta$ -lactamines (*blaCTX-M* et *blaTEM*) ou encore aux sulfamides (*sul1*, *sul2* et *sul3*) (Zhao et al. 2021).

Tout comme chez l'Homme, l'utilisation excessive des antibiotiques et de mauvaises conditions d'hygiène sont des facteurs d'émergence de la résistance aux antibiotiques chez les animaux.

### **II.3. Les voies de transmission de la résistance dans les compartiments One Health**

Les trois compartiments étant connectés, des échanges de BRA et de GRA peuvent avoir lieu entre chacun de ces compartiments. En résumé, les échanges peuvent se faire d'Homme à Homme, entre animaux, entre l'Homme et l'animal et finalement entre l'environnement, l'Homme et l'animal et ce de différentes manières.

#### **II.3.1. Transmission entre Homme**

Le microbiote humain est variable selon les individus mais plusieurs facteurs contribuent à son façonnement, tels que les facteurs génétiques, l'âge ou encore le régime alimentaire. Mais d'autres facteurs moins étudiés peuvent aussi influencer notre microbiote, c'est le cas de notre entourage et des personnes avec qui nous interagissons. Il en est de même pour la résistance aux antibiotiques. Différents types de transmission interhumaine ont été décrits.

- Transmission manuportée ou oro-fécale

La transmission d'Homme à Homme peut se faire par transmission oro-fécale, particulièrement dû à un manque d'hygiène, notamment par des mains sales ou des objets contaminés, c'est particulièrement le cas pour les entérobactérales (Holmes et al. 2016). Il a notamment été montré par modélisation que la durée de séjour des patients à l'hôpital et les mains contaminées du personnel soignant étaient liées à la transmission de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Holmes et al. 2016).

- Transmission par voie sexuelle

La transmission peut également se faire par voie sexuelle, comme par exemple le cas de *N. gonorrhoeae*, qui est décrite comme ayant une grande capacité à développer des résistances aux antimicrobiens. Cet organisme est considéré comme une menace urgente de résistance par le Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Williamson et al. 2019).

- Transmission aérienne

La transmission peut se faire par voie aérienne c'est le cas pour les bactéries responsables d'infections des voies respiratoires comme *S. pneumoniae*.

- Tourisme

Le nombre de touristes au niveau mondial était de 1,087 milliard en 2013 et il est passé à 1,5 milliard en 2019 (UNWTO 2014 ; UNWTO 2019). Cet influx massif de touristes augmente le risque d'importer des bactéries résistantes, notamment des entérobactéries productrices de BLSE dans les lieux visités mais également le risque pour les voyageurs d'acquérir des bactéries multi-résistantes.

Les études montrent que lors de voyages à l'étranger, 21 à 51% des touristes acquièrent des entérobactéries multi-résistantes, pourcentage qui varie selon le pays visité, l'Asie étant la région associée au plus haut risque d'acquérir des entérobactéries multi-résistantes (85%) et *E. coli* étant l'organisme le plus communément acquis par les voyageurs dans presque 90% des cas, suivi de *K. pneumoniae*. C'est dans les pays en développement que l'on trouve généralement la plus forte prévalence d'entérobactéries productrices de BLSE, plus particulièrement en Asie où le portage communautaire est estimé à 70% (Armand-Lefèvre, Andremont, and Ruppé 2018). La propagation de certaines enzymes de résistance à travers le monde s'est faite initialement par le tourisme, comme par exemple NDM, KPC ou encore les enzymes OXA-48 étant parmi les plus préoccupantes. La propagation par les voyages a également été mise en évidence pour les bactéries à Gram positif, notamment dans la propagation de *S. pneumoniae* résistant aux antimicrobiens de l'Espagne à l'Islande (Holmes et al. 2016).

Une étude sur 100 voyageurs sains Suédois a montré que 24 d'entre eux étaient colonisés après leur voyage par des *E. coli* producteurs de BLSE, la majorité étant producteurs de CTX-M-15, alors qu'ils ne l'étaient pas avant. Parmi eux 5 personnes étaient encore colonisées même plusieurs mois après leur retour (Tängdén et al. 2010).

Cependant, dans la majorité des cas, la durée du portage de bactéries multi-résistantes semble être assez courte, généralement inférieure à 1 mois. La durée dépend du lieu de voyage et également de l'abondance relative des bactéries résistantes dans le tube digestif : plus l'abondance relative est élevée plus le portage sera long, et inversement (Armand-Lefèvre, Andremont, and Ruppé 2018).

Les aéroports sont également un point de convergence, dans lequel sont recueillies les eaux usées impactés par les voyageurs provenant de toutes parties du monde. L'étude de Heß et al. montre que les eaux usées des avions présentent une abondance relative en gènes de résistance plus élevée que les eaux usées municipales (Heß et al. 2019).

Certains comportements sont également associés à de plus grandes chances d'acquérir des résistances. C'est par exemple le cas lors de l'utilisation d'antibiotiques lors du voyage ou l'apparition de troubles digestifs et de diarrhées, qui tout deux multiplient par 2 ou 3 le risque d'acquisition d'entérobactéries multi-résistantes car ces facteurs entraînent une perte

d'intégrité du tube digestif et de la flore intestinale et donc réduit leur effet de barrière contre la colonisation de bactéries exogènes. Un autre facteur est un voyage dans un pays à risque, plus particulièrement en Asie (Bengtsson-Palme et al. 2015; Armand-Lefèvre, Andremont, and Ruppé 2018; Tham et al. 2010). En revanche, acquérir des entérobactéries multi-résistantes après un voyage en Amérique du Nord, en Europe ou en Océanie semble plus rare, à l'exception de la Grèce (Armand-Lefèvre, Andremont, and Ruppé 2018).

D'autres formes de tourisme tels que le tourisme médical, les pèlerinages ou encore l'arrivée de réfugiés sont associés à un risque considérable de résistance aux antibiotiques. En effet, c'est dans les pays à faibles et moyens revenus que l'on retrouve la majorité des réfugiés et c'est également là que la prévalence de bactéries résistantes est élevée, se dirigeant généralement vers des pays développés, les flux migratoires, effectués dans des conditions d'hygiène extrêmement limitée avec, du fait du confinement, un risque élevé d'attraper des maladies, sont vecteurs de bactéries résistantes (Sulis, Sayood, and Gandra 2022; Schwartz and Morris 2018).

De nombreux rassemblements ont lieu annuellement, pour lesquels beaucoup de personnes venant de partout dans le monde se déplacent. Ces rassemblements peuvent être sources d'épidémies et de transmission de bactéries résistantes, ces bactéries peuvent être ensuite importées dans les pays d'origine de ces personnes à leur retour. En Arabie Saoudite un pèlerinage a lieu tous les ans à la Mecque, réunissant 2 à 3 millions de personnes. Une étude sur 218 pèlerins a montré que 129 d'entre eux présentaient une augmentation de la colonisation par des *E. coli* producteurs de BLSE après leur voyage et dans 33% des échantillons de fèces ont été retrouvés les gènes CTX-M au retour contre 10% au départ (Leangapichart et al. 2017).

### **II.3.2. Transmission entre animaux**

#### **- Promiscuité**

Il y a peu de connaissances sur les voies de transmission entre animaux, notamment à l'interface entre les animaux sauvages et le bétail. Tout comme pour les humains, le contact entre les animaux mais aussi un manque d'hygiène peut conduire à la transmission de bactéries résistantes.

Une étude a comparé le microbiote intestinal et le profil de gènes de résistance d'animaux sauvages (porcs sauvages, coyotes), de bétail (bovins) et de l'environnement. Dans un premier temps ils ont montré que les animaux sauvages portaient plus de gènes de résistance et plus d'organismes résistants aux antibiotiques que le bétail, suggérant que les animaux sauvages pourraient être une source de bactéries résistantes. L'étude a également montré une transmission de bactéries entre les porcs sauvages et les bovins mais il n'est pas prouvé qu'il s'agit d'une transmission directe ou indirecte par absorption d'herbe, contaminées par les porcs sauvages (Lee et al. 2022).

Le transport des animaux peut aussi être une source de transmission de bactéries et de gènes de résistance aux antibiotiques, les facteurs majeurs contribuant à cette transmission étant la présence de BRA et de GRA chez les animaux transportés, l'hygiène des véhicules, le contact avec d'autres animaux porteurs de GRA et de BRA (Koutsoumanis et al. 2022).

### II.3.3. Transmission Homme – Animal

Les estimations montrent qu'environ 75% des infections humaines sont d'origine zoonotique montrant le lien entre les Hommes et les animaux (McEwen and Collignon 2018). Une étude de Pal et *al.* en 2016 a montré que 71% des gènes de résistance retrouvés dans l'intestin humain étaient partagés avec les animaux (Pal et al. 2016).

La transmission de GRA entre l'Homme et les animaux peut se faire de différentes façons, elle se fait majoritairement par contact direct ou à travers la chaîne alimentaire (Mukerji et al. 2017).

#### - Transmission par contact

La transmission par contact se fait notamment par les animaux de compagnie mais aussi par le bétail. Le fait de vivre dans le même espace entraîne une augmentation de la similarité dans la composition du microbiote du fait du partage des ressources entre les individus. C'est par exemple le cas des personnes ayant des animaux de compagnie, qui ont un microbiote plus semblable à celui de leurs animaux (Song et al. 2013). Une étude de Dickson et al, sur les animaux de compagnie et leurs propriétaires, a montré que la transmission de la RAM pouvait être expliquée par le comportement affectueux entre les animaux et leurs maîtres (Dickson et al 2019).

Le SARM, notamment le CC398 est l'un des pathogènes pour lequel la transmission par contact direct entre l'Homme et l'animal a été décrite (Wegener 2012). En France entre 2006 et 2010, chez les animaux de compagnie, les infections causées par le SARM étaient de seulement 1,8% mais près de 90% des isolats appartenaient à des clones humains (Haenni et al. 2012).

Les travailleurs agricoles, les vétérinaires ou encore les employés des abattoirs sont directement exposés aux animaux. Ils encourent un risque élevé d'être colonisés par des BRA et des GRA provenant de ces animaux, favorisant leur dissémination dans la communauté et dans les établissements de santé par le biais de transmissions interhumaines (Zhao et al. 2021). Parmi ces professionnels, les éleveurs de porcs constituent une des populations à risque d'acquérir des bactéries résistantes. Kalupahana et al ont montré que ces éleveurs étaient plus susceptibles d'être infectés par des SARM provenant de leurs porcs que la population générale (Kalupahana et al. 2019). Reynaga et al. ont également rapporté une forte prévalence, 57,9 %, de travailleurs en élevage porcin colonisés par la lignée clonale ST398 de SARM, associée au bétail (Reynaga et al. 2016). Ce qui fait des éleveurs la population humaine la plus exposée aux bactéries résistantes provenant des animaux.

Dans une étude réalisée aux Pays-Bas, Van Gompel et al. ont étudié les résistomes et microbiomes de personnes ayant été exposées au bétail. Les résultats ont montré qu'il y avait plus de gènes de résistance aux antibiotiques dans les fèces des travailleurs des abattoirs de porcs et des éleveurs de porcs que chez les éleveurs de poulets de chair et la population contrôle. Les chercheurs ont également constaté que les gènes de résistance les plus abondants dans le résistome des populations étudiées étaient des gènes conférant une résistance à la tétracycline, aux  $\beta$ -lactamines et aux macrolides. Il existe également des différences dans l'abondance des GRA le long de la chaîne d'abattage. En outre, le portage des gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les agriculteurs et les employés était plus élevé que chez les membres de leur famille, mais l'inverse a été observé pour les gènes de résistance aux aminoglycosides (Van Gompel et al. 2020).

Le contact entre l'Homme et les animaux sauvages n'est lui pas aussi intime qu'avec les animaux de compagnie et le bétail mais les animaux sauvages, particulièrement les oiseaux, ont été montrés comme étant des vecteurs de la transmission de la RAM. Mais le risque pour la

santé humaine associé avec les bactéries et gènes de résistances chez les animaux sauvages n'a pas été complètement évalué du fait du manque de données de surveillance pour ces bactéries et gènes de résistance chez les animaux sauvages (Dolejska and Literak 2019).

Les animaux sauvages peuvent contribuer à la transmission de la RAM de façon locale, c'est particulièrement le cas des animaux qui sont au contact des Hommes (rats, cafards...) (Laborda et al. 2022). Une étude sur le microbiome et le résistome d'une espèce de cafard a montré la présence de gènes de résistance ainsi que d'EGM (Domínguez-Santos et al. 2021). Il a aussi été montré que des pathogènes présents dans les hôpitaux étaient identifiés avec une forte prévalence dans l'intestin de cafards capturés dans des établissements de santé (Mehainaoui et al. 2021). Également, l'analyse du résistome de rats présents dans l'environnement hospitalier montre une forte abondance de gènes de résistance à la vancomycine en liaison au transposon Tn1549 (Hansen et al. 2016). C'est aussi le cas chez les animaux sauvages tels que les iguanes, anolis et rongeurs. En effet, une étude faite en Guadeloupe a démontré que tous ces animaux étaient porteurs de gènes de résistance qui sont aussi présents chez l'Homme, et ce, plus particulièrement, chez les rongeurs (Stephanie Guyomard-Rabenirina et al. 2020).

Dans d'autres cas ils participent à la transmission de la RAM plus globalement, à travers diverses zones géographiques. Cette propagation de la résistance se fait notamment par les animaux migrateurs, oiseaux, poissons..., ces animaux représentent des vecteurs dans la transmission de la résistance (Laborda et al. 2022). Ce sont généralement des animaux qui sont adaptés à des environnements soumis à la pression anthropique, comme les environnements recevant des effluents d'eaux usées contenant des GRA et BRA d'intérêt clinique. En effet, il a été montré que certains oiseaux se nourrissant dans les stations d'épuration, par exemple les canards, sont plus porteurs de gènes de résistance que d'autres oiseaux qui s'alimentent dans des eaux moins contaminées par des bactéries résistantes. Ils sont également porteurs de bactéries pathogènes humaines, notamment des clones retrouvés avec une forte prévalence à l'hôpital (Pärnänen et al. 2019). Ces gènes de résistance acquis par ces oiseaux migrateurs peuvent ensuite être diffusés à d'autres compartiments, notamment l'environnement et l'Homme mais également dans d'autres zones géographiques (Sun et al. 2020).

Il a également été démontré que des plasmides porteurs de gènes de BLSE, généralement semblables à ceux qui sont retrouvés chez les pathogènes humains, étaient présents chez les bactéries de divers animaux sauvages (Stephanie Guyomard-Rabenirina et al. 2020). Des plasmides de résistance ont même été trouvés chez des oiseaux d'Arctique qui sont dans des zones où il n'y a peu, voire pas de pollution anthropique et antibiotique et peu d'habitants (Sjölund et al. 2008).

#### - Consommation d'aliments d'origine animale

Les produits d'origine animale peuvent être porteurs de bactéries pathogènes résistantes. Ils constituent une potentielle voie de transmission de bactéries résistantes à l'Homme et contribuent aux épidémies.

La présence de bactéries résistantes peut être due à une contamination de la nourriture lors de la production ou lors de la transformation des aliments (Bennani et al. 2020). L'organisation mondiale de la santé a estimé qu'environ 1 personne sur 10 est malade chaque année après avoir consommé de la nourriture contaminée, causant près de 420 000 décès (WHO 2015).

Les agents pathogènes les plus associés à ces maladies d'origine alimentaire sont *Campylobacter* et les Salmonelles non typhoïdique. La plupart des produits alimentaires peuvent être contaminés mais certains aliments sont à plus fort risques, tels que les produits d'origine animale consommés crus ou insuffisamment cuits. La présence d'une forte abondance



de BRA et de GRA a été notamment démontrée dans le porc, le poulet, le bœuf et le poisson (Zhao et al. 2021). Sont également à risque les produits nécessitant plusieurs ingrédients et un grand nombre de manipulation par le personnel. Différents facteurs sont à l'origine de l'apparition des maladies d'origine alimentaire, notamment la production intensive à grande échelle, favorisant la dissémination des bactéries pathogènes chez les animaux destinés à l'alimentation, ou encore la mondialisation avec l'import et l'export d'aliments et animaux vivants (Antunes, Novais, and Peixe 2020).

A l'échelle mondiale, la transmission de la RAM à travers la chaîne alimentaire reste difficile à évaluer. Cette transmission est particulièrement sous-estimée dans les pays à faibles et moyens revenus dont les pratiques agricoles ne sont pas réglementées surtout au niveau de l'utilisation d'antibiotiques et dont les conditions d'hygiène sont parfois insuffisantes. De plus, la demande de plus en plus forte en protéines en conséquence de la population grandissante dans ces pays implique le passage à un système agricole à plus grande échelle avec une plus grande utilisation d'antibiotiques, ce qui contribue à la RAM (Van Boeckel et al. 2015).

De nombreux pays en développement sont les principaux exportateurs mondiaux d'animaux ou de produits carnés, ce qui facilite le transport des BRA et GRA à travers le monde (Zhu et al. 2017). Par exemple, le Brésil, qui est le plus grand exportateur mondial de poulets et de bœufs, contribue à la propagation mondiale du gène *mcr-1* (Fernandes et al. 2016).

L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a rapporté en 2016, que des résistances aux antimicrobiens fréquemment utilisés étaient couramment trouvées chez *Campylobacter* et *Salmonella* chez l'homme et la volaille. Par exemple, chez *Campylobacter jejuni* la résistance à la ciprofloxacine atteint 69,8% chez des souches isolées de poulets de chair. Concernant *Salmonella*, cette résistance à la ciprofloxacine a été identifiée comme étant supérieure chez certains sérotypes, notamment ceux qui sont associés à la volaille, tels que *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis, et *S. Kentucky* (Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2016). De multiples clones de *Salmonella* producteurs de BLSE, tels que CTX-M-2, CTX-M-9 et TEM-52, ont été retrouvés partagés entre des volailles et des humains infectés dans plusieurs pays européens (Antunes, Novais, and Peixe 2020).

Des preuves de la transmission du SARM associé au bétail vers l'Homme ont récemment été décrites, le poulet de chair et la viande de dinde étant considérés comme des vecteurs probables de la lignée CC9/CC398 (Larsen et al. 2016).

Une étude sur le gène *mcr-1* a montré sa propagation des animaux vers l'Homme à travers la chaîne alimentaire, son taux de détection était plus élevé dans les échantillons d'animaux (21%) et de viande crue (15%) que dans les échantillons cliniques (1%) (Liu et al. 2016).

Le fait d'utiliser régulièrement des antimicrobiens chez le bétail, associé à la production intensive d'animaux destinés à l'alimentation est considérée comme le principal moteur de la sélection de bactéries résistantes et d'EGM dans le monde entier. L'utilisation d'autres molécules ayant une activité antimicrobienne, tel que le cuivre, ont également été identifiés comme participant à la sélection de BRA (Antunes, Novais, and Peixe 2020).

#### **II.3.4. Transmission Homme – animal et environnement**

La résistance aux antibiotiques est un phénomène ancien, naturelle et déjà répandu dans l'environnement depuis un long moment. En effet, l'origine des produits antibiotiques naturels

est très ancienne, elle est estimée entre 2 milliards et 40 millions d'années, indiquant que la résistance pourrait dater de cette même époque (D'Costa et al. 2011).

Les gènes de résistance aux antibiotiques étaient donc déjà présents avant notre utilisation des antibiotiques. Dans ce sens, l'étude de D'Costa et al. (2011) avait notamment montré, grâce à l'analyse de séquences d'ADN collecté dans les sédiments du permafrost, des similarités entre la protéine VanA datant de 30 000 ans et les variants actuels, confirmant sa présence bien avant l'utilisation des antibiotiques. Les auteurs ont aussi retrouvé des gènes codant des résistances aux  $\beta$ -lactamines et aux tétracyclines dans ces sédiments.

Ces déterminants de la résistance étaient aussi probablement déjà soumis aux transferts horizontaux. Il a été montré que les  $\beta$ -lactamases à sérine dateraient d'il y a plus de 2 milliards d'années et certaines seraient présentes sur des plasmides depuis des millions d'années (Hall and Barlow 2004).

Il est maintenant admis que les activités anthropiques, perturbant les écosystèmes et pouvant générer des molécules exerçant des pressions de sélection sur les microorganismes, sont liées à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Il a été également mis en évidence que les milieux aquatiques impactés par l'Homme subissent une augmentation plus importante en GRA que les milieux non impactés (Kim and Cha 2021).

Les stations de traitement des eaux usées (STEU), réceptionnant les effluents des villes, sont considérées comme des lieux de dissémination de la résistance, du fait des rejets des eaux usées traitées localement dans les environnements aquatiques et potentiellement dans les sols lors de valorisation agricole des boues. De nombreuses bactéries pathogènes sont adaptées pour vivre dans des habitats aquatiques, ce qui fait des rivières des sources possibles et des voies de propagation de la résistance aux antibiotiques, puisqu'elles reçoivent généralement des effluents des stations d'épuration, qui peuvent contenir des résidus d'antibiotiques et des BRA et GRA. L'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire contribue également significativement à la résistance environnementale. Les déchets animaux, à la fois provenant de l'agriculture et de la faune sauvage, représentent un risque pour la transmission et la persistance de la RAM dans le sol et l'environnement aquatique (Czatkowska et al. 2022).

Mais la dissémination de bactéries résistantes entre l'environnement, l'Homme et les animaux est peu décrite dans la littérature et a souvent été négligée mais de récentes études épidémiologiques s'intéressant à la comparaison des génomes bactériens de ces compartiments One-Health ont tentées de combler ces lacunes.

#### **II.3.4.1. Les stations de traitement des eaux usées**

Les STEU ont souvent été décrites comme étant des hotspots pour la dissémination de la RAM. Elles créent des conditions favorables pour la prolifération bactérienne notamment grâce à la présence de sources de carbone et autres nutriments, des accepteurs d'électrons mais aussi un pH et des températures favorables ainsi que des particules sur lesquelles les bactéries peuvent s'adsorber (Mania et al. 2018). Les stations reçoivent également d'importantes proportions de résidus d'antibiotiques, de BRA et de GRA, l'environnement pourrait donc favoriser la sélection et le transfert horizontal de GRA entre les bactéries au cours du processus de traitement des eaux usées (Grehs et al. 2021).

### **Principe de fonctionnement d'une STEU**

Les eaux usées sont collectées par les réseaux d'égouts au domicile des habitants d'une collectivité et sont acheminés jusqu'à la station de traitement où elles subissent une série de traitements afin de retirer de ces eaux les particules en suspension, la charge organique et, dans certains cas (rejet en zone sensible), les nutriments (azote, phosphore). La charge bactérienne qu'elle rejette n'est pas considérée systématiquement et on considère un abattement bactérien de 1 à 2 log avec une station de traitement classique (Manaia et al. 2018).

### Pré-traitement et traitement primaire

La première étape a pour but d'éliminer les gros déchets, le sable et les graisses en faisant passer l'eau par des étapes de dégrillage, dessablage et déshuilage/dégraissage. Cette première étape de traitement permet notamment d'éviter la détérioration des équipements.

Le traitement primaire, optionnel, est une décantation séparant les matières particulaires denses de l'eau, la matière solide se déposant au fond de l'ouvrage et est récupérée puis traitée, 50 à 60% des matières en suspension vont alors être éliminées. Dès cette étape une grande partie des microorganismes présents dans les eaux usées adhérant aux particules organiques et inorganiques et sont donc éliminés de l'effluent et dirigés vers les boues à traiter (Manaia et al. 2018).

### Traitement secondaire

Le traitement secondaire est, dans la grande majorité des STEU, un traitement biologique permettant d'éliminer les composés biodégradables tels que la matière organique, l'azote ammoniacal en présence d'oxygène. Les conditions mises en place dans les bassins de traitement (forte concentration de bactérie, faible quantité de « nourriture ») favorisent le métabolisme énergétique des micro (faible croissance), la floculation par production de substances polymériques extracellulaires (EPS) et l'oxydation de la matière organique en dioxyde de carbone et en H<sub>2</sub>O. La concentration en boues (ensemble des microorganismes et particules floculés dans une liqueur mixte) est de l'ordre de quelques grammes. La composition des EPS leur confère différentes propriétés de sorption des composés chimiques organiques ou inorganiques présents souvent récalcitrants à la biodégradation tels que les métaux lourds et les pharmaceutiques, les détergents, ... se trouvant également dans les eaux usées. Ces composés peuvent être toxiques pour une partie des bactéries, générant ainsi une pression de sélection (Grehs et al. 2021).

Lors de rejet en zone sensible, des traitements complémentaires sont associés : l'azote nitrifié dans le bassin d'aération par des bactéries autotrophes, est éliminé en diazote gazeux dans une zone anoxique tandis que le phosphore est éliminé soit par traitement physicochimique (précipitation) soit par traitement biologique dans un bassin en anaérobie par des bactéries accumulatrices de phosphate.

La liqueur mixte est séparée en effluent traité et en boue. Les boues formées sont d'une part recyclées dans le bassin d'aération pour y garantir une concentration constante en biomasse et, d'autre part, envoyées vers le traitement des boues (épaississement, déshydratation, hygiénisation, séchage) préalablement à une valorisation matière ou thermique éventuelle.

Ce traitement secondaire permet une diminution de 1 à 2 log de la charge microbienne dans l'effluent secondaire (Manaia et al. 2018). L'effluent est généralement rejeté dans son milieu récepteur après le traitement secondaire mais un traitement tertiaire peut être réalisé.

Lors de rejets en zone d'activité sensible (baignade, zone conchylicole) des traitements tertiaires peuvent être mis en place tels que la désinfection des eaux grâce à des traitements par lagunage, par filtration membranaire voire des traitements aux UV.

D'autres procédés peuvent être implémentés au sein des STEU en fonction des besoins de traitement permettant d'améliorer la qualité des eaux rejetées (traitement membranaire (micro et ultrafiltration), osmose inverse, charbon actif ...).

La **Figure 11** représente les différentes étapes du processus de traitement des eaux usées dans une STEU.

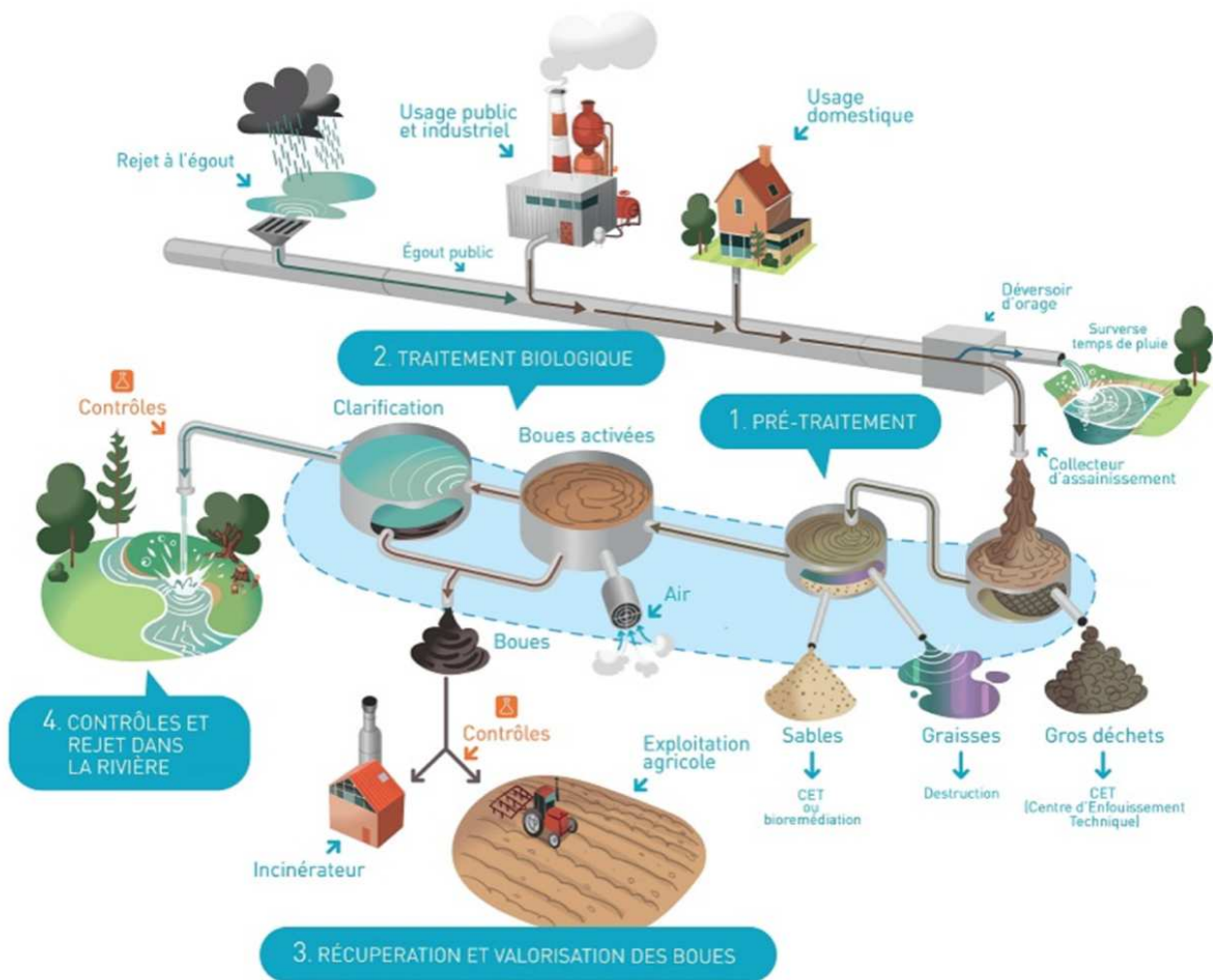


Figure 11 : Schématisation du principe de fonctionnement d'une station de traitement des eaux usées (Source IDEA).

### II.3.4.2. La résistance dans les STEU

L'influent de la station reflète, en partie, les caractéristiques du microbiome de la population humaine desservie y compris la présence de BRA, de GRA et d'EGM associés. Les microorganismes présents dans les eaux usées sont donc principalement des bactéries commensales du microbiote humain mélangées à des bactéries d'origines diverses qui sont entrées dans le système de canalisation. Le résistome de cet influent est influencé, entre autre,

par la prévalence générale de la résistance aux antibiotiques et la consommation d'antibiotiques dans la communauté (Pärnänen et al. 2019).

Les STEU reçoivent des eaux usées provenant, entre autres, de l'hôpital, des communautés, des industries pharmaceutiques ou encore des exploitations agricoles. Les hôpitaux produisent de grandes quantités d'eaux usées ; à ce niveau aussi il existe des différences entre les pays développés et les pays en développement. En effet, les hôpitaux des pays développés produisent entre 400 et 1 200 litres d'eaux usées par patient alors que dans les pays en développement ce sont entre 200 et 400 litres qui sont produits. Ces eaux hospitalières contiennent de grandes quantités de BRA et de GRA, concentrations qui sont de 2 à 9 fois plus élevées que dans les eaux usées municipales (Czatkowska et al. 2022).

Ce sont particulièrement des gènes de résistance aux aminosides, aux  $\beta$ -lactamines et à la vancomycine qui sont détectés dans ces eaux (Czekalski et al. 2012; Buelow et al. 2018). De plus, dans ces eaux, *E. coli* présente un taux de résistance plus élevé à tous les antibiotiques que dans les eaux usées municipales (Korzeniewska, Korzeniewska, et Harnisz 2013). Les eaux usées cliniques sont également plus riches en bactéries opportunistes mais aussi en GRA d'importance médicale. Elles transportent notamment des entérobactéries, constituant naturel du microbiote intestinal humain, ces bactéries peuvent être sources de gènes codant des  $\beta$ -lactamases et des BLSE (Pazda et al. 2019). Certaines études montrent une prévalence de 37 à 40 % de bactéries productrices de BLSE dans les eaux usées hospitalières (Korzeniewska, Korzeniewska, and Harnisz 2013; Chagas et al. 2011).

Mais les effluents hospitaliers représentent moins de 1% de la quantité des eaux usées municipales, ils sont donc extrêmement dilués en arrivant à la STEU, indiquant que les eaux usées urbaines contiennent une grande proportion de BRA (Karkman et al. 2018). Dans ce sens, il a été montré que le risque de résistance n'était pas augmenté dans les stations d'épuration recevant des eaux usées hospitalières en plus des eaux municipales par rapport aux stations traitant uniquement des eaux usées municipales. Les hôpitaux ne contribueraient donc pas de manière importante à la quantité et à la diversité des GRA dans le réseau d'assainissement (Buelow et al. 2018).

En outre de la diminution de la charge bactérienne, la majorité des études montre également une baisse de l'abondance des GRA après traitement dans la STEU. Cependant, l'effet du traitement sur l'abondance relative de ces gènes diffère fortement selon les gènes étudiés. Certaines études décrivent une baisse ou pas de changements de l'abondance relative des gènes étudiés (Rafraf et al. 2016; Munir, Wong, and Xagorarakis 2011) tandis que d'autres montrent un enrichissement de certains gènes (Makowska, Koczura, and Mokracka 2016; Di Cesare et al. 2016; Lee et al. 2017). En général, dans les stations d'épuration conventionnelles, l'élimination des GRA varie de 1 à 2 log (Sabri et al. 2020) et des changements dans le résistome des STEU sont observés tous les 2 à 3 ans (Yin et al. 2019).

D'après les résultats de Buelow *et al* ayant suivi pendant plus de cinq années le résistome lors du traitement d'effluents urbains et hospitaliers entre l'entrée et la sortie des systèmes de traitement des effluents de l'hôpital l'abondance des GRA diminue de 5, pour les gènes de résistance aux QAC, aux sulfamides et les gènes codant pour des transposases, à 78 fois pour les gènes conférant une résistance aux quinolones. Tandis que pour les systèmes de traitement des effluents urbains la diminution est de l'ordre de 3, pour les gènes de résistances aux aminosides, à 43 fois, pour la résistance à la streptogramine et dans certains cas aucune baisse n'est observée, notamment pour les gènes de résistance aux quinolones, à la bacitracine, aux  $\beta$ -lactamines, aux QAC, ainsi qu'aux métaux lourds (Buelow et al. 2020).

Pärnänen *et al.* ont comparé l'influent et l'effluent de 12 stations d'épuration, situées dans 7 pays européens (Portugal, Espagne, Irlande, Chypre, Allemagne, Finlande et Norvège), par qPCR ciblant 229 gènes de résistance et 25 EGM. Dans ces influents, la majorité des gènes détectés sont des gènes très répandus dans l'environnement et codant pour la résistance aux antibiotiques de première génération. Tous leurs échantillons contenaient des gènes conférant une résistance aux aminosides (*aadA* et *strB*), aux  $\beta$ -lactamines (*blaGES*, *blaOXA* et *blaVEB*), aux macrolide-lincosamide-streptogramine B (MLS<sub>B</sub>) (*ereA*, *ermF* et *matA/mel*), aux sulfamides (*sul1*), aux tétracyclines (*tetM* et *tetQ*) et à la multirésistance (*qacEAI* et *qacH*). En plus de ces gènes de résistance, des EGM étaient également présents dans ces échantillons d'influents, tels que *int11*, *tnpA*, *Tp614*, *ISAb3*, *ISPps* et *ISSm2*. Mais des différences existent en fonction des pays. En effet, les gènes de résistance d'intérêt clinique majeur tels que les  $\beta$ -lactamases *blaNDM-1*, *blaKPC*, *blaVIM* et *blaIMP* ou encore les gènes *mcr-1*, *mecA* et *vanA* ont été retrouvés de façon plus sporadique selon le pays étudié. Après traitement par la STEU, certains gènes ont persisté dans plus de 90% des échantillons, il s'agissait des gènes de résistance aux aminosides (*aadA* et *strB*), aux  $\beta$ -lactamines (*blaOXA*), aux MLS<sub>B</sub> (*ermF*), aux sulfamides (*sul2*), à la tétracycline (*tetW*), à la multirésistance (*qacH*) et des EGM, tels que la transposase (*tnpA*), l'intégrase (*int11*) et les séquences d'insertion (*ISAb3* et *ISPps*) (Pärnänen *et al.* 2019). Des plasmides à large spectre, comme IncP, IncQ et IncW, portant des gènes de résistance ont également été retrouvés à de fortes prévalences dans les eaux usées (Czekalski *et al.* 2012).

Des intégrons porteurs de cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques sont détectés avec une prévalence élevée dans les STEU, les effluents finaux et les boues de stations (Ma *et al.* 2013; Mokracka, Koczura, and Kaznowski 2012; Moura *et al.* 2012). Le fait de retrouver ces EGM montre que les transferts horizontaux de gènes et la dissémination des GRA est possible dans les STEU.

La fraction de BRA et GRA non éliminée lors du traitement primaire se retrouve au contact des bactéries des boues activées dans le bassin du traitement secondaire où des échanges peuvent avoir lieu (Manaia *et al.* 2018).

Sur la base des méthodes cultures-dépendantes ce sont les indicateurs de contamination fécale qui sont le plus fréquemment retrouvés dans les échantillons de STEU, incluant *E. coli*, les coliformes totaux et les entérocoques. Outre ces bactéries, d'autres BRA d'intérêt clinique sont également identifiés, tels que les SARM, les VRE et d'autres bactéries à Gram négatif ayant des résistances à de nombreux antibiotiques (Bouki, Venieri, and Diamadopoulos 2013; Figueira *et al.* 2011). Les résistances portées sont des résistances aux  $\beta$ -lactamines, à l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole, à la tétracycline et à la ciprofloxacine (Amador *et al.* 2015). Les analyses métagénomiques, quant à elles, montrent que les bactéries identifiées par les méthodes cultures-dépendantes ne font pas partie des organismes les plus prédominants. En effet ce sont les protéobactéries, les *Firmicutes*, les actinobactéries et les genres *Aeromonas*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Providencia* et *Staphylococcus* qui sont les plus abondants dans les eaux de STEU (Zhang *et al.* 2015).

Suite au traitement de la station, les eaux sont déversées dans des récepteurs naturels, tels que les rivières et les autres eaux de surface (Czatkowska *et al.* 2022). Lors du rejet final des effluents dans les eaux réceptrices il peut y avoir une augmentation de  $10^{12}$  BRA ou  $10^{18}$  GRA par jour (Grehs *et al.* 2021). Globalement, dans ces eaux l'abondance des GRA est de non détecté à  $10^8$  copies/L. Les gènes vont pouvoir ensuite s'accumuler dans les sédiments soit par sédimentation soit par adsorption (He *et al.* 2020). La dissémination de ces GRA dans les environnements récepteurs dépend de la capacité de l'hôte à survivre et proliférer ainsi que de

l'acquisition de ces gènes par de nouveaux hôtes par les mécanismes de transfert horizontaux (He et al. 2020).

Les eaux en aval de la station reçoivent également des charges bactériennes significatives, malgré la réduction du nombre de bactéries. Une étude a montré que les eaux réceptrices peuvent recevoir plus de  $2,7.10^3$  UFC/mL de *E. coli* avec jusqu'à 18% de ces bactéries productrices de BLSE (Korzeniewska, Korzeniewska, et Harnisz 2013).

La conséquence de rejeter des effluents contenant des GRA dans les environnements récepteurs est l'augmentation du contenu en GRA dans celui-ci. La population peut ensuite être exposée aux GRA rejetés par la STEU par exemple dans le cadre d'activités récréatives dans les eaux de surface (Pallares-Vega et al. 2019). Le résistome des rivières est lui considéré comme une voie potentielle pour la réintroduction de la RAM chez l'Homme en raison de l'utilisation de l'eau en tant que source d'eau potable et d'eau d'irrigation en agriculture (Kim and Cha 2021). Mais ce risque de contamination reste difficile à évaluer, même s'il a déjà été montré que l'exposition récréative était liée à un taux plus élevé de portage de *E. coli* producteurs de BLSE chez les surfeurs (Leonard et al. 2018).

En conclusion, les STEU sont des « hotspots » de la dissémination de la RAM, recevant de grandes quantités de GRA et de BRA, qui sont plus particulièrement abondants dans les eaux usées de l'hôpital. Mais ces eaux hospitalières sont diluées dans les eaux usées urbaines, qui sont aussi une grande source de BRA et de GRA. Suite au passage des effluents dans le procédé de traitement des eaux usées la charge bactérienne diminue ainsi que l'abondance des GRA. Le milieu récepteur reçoit ces eaux traitées et les GRA peuvent s'accumuler dans les sédiments. Tout cela montre l'impact des activités anthropiques sur la dissémination de la résistance et l'importance de maintenir en conformité les STEU pour diminuer la contamination environnementale.

### II.3.4.3. L'épandage des boues de STEU

Les boues de STEU sont majoritairement composées de matière organique biodégradable. La gestion des boues se fait de différentes façons : traitement thermique, compostage ou encore utilisation agricole (Buta et al. 2021). Mais en France, ces boues sont très souvent appliquées sur les sols. Elles permettent un enrichissement en nutriments, elles sont notamment une source nutritive pour les plantes, elles permettent également une amélioration de la porosité, de la rétention d'eau,... (Markowicz et al. 2021).

Au niveau de l'Union Européenne, c'est en Allemagne, en Espagne, en Italie et en France que les boues d'épuration sont les plus largement produites. La moitié de ces boues produites sont ensuite utilisés en agriculture et épandues sur les sols (Czatkowska et al. 2022).

Outre les composés qui sont bénéfiques au sol, les boues contiennent également des composés potentiellement impactant, comme des métaux lourds, des polluants organiques persistants, des résidus d'antibiotiques ou encore des pathogènes, des BRA, des GRA (Buta et al. 2021; Wang et al. 2023). Le rôle des résidus antibiotiques et autres résidus sur la RAM est détaillé dans le **Chapitre III**. Les pathogènes dominant dans ces boues sont *E. coli* et *K. pneumoniae* (Ye and Zhang 2011). Plus de 200 sous-types de GRA ont été détectés dans les boues d'épuration. L'abondance absolue de ces gènes varie de  $2,10.10^5$  à  $7,35.10^{11}$  copies/g de poids sec. Parmi eux, les gènes de résistance aux tétracyclines, aux  $\beta$ -lactamines, aux sulfamides et aux macrolides sont les plus étudiés (Nnorom et al. 2023).

Il a été montré que les quantités de GRA, EGM mais aussi métaux lourds augmentaient dans le sol à la suite de l'application des boues de station. Ce sont principalement les gènes conférant des résistances aux  $\beta$ -lactamines et aux tétracyclines qui sont trouvés dans ces boues (Chen et

al. 2016). Les gènes *ermF*, *tetX* et *tetG* sont notamment introduits dans le sol suite à l'épandage, mais en raison de leur dégradation leur niveau redevient rapidement comme dans les sols contrôles (Zhang et al. 2019).

Une étude menée pendant 24 ans a permis d'observer, après épandage de boues séchées thermiquement et de boues digérées anaérobiquement, l'augmentation de l'abondance des éléments Cu et Zn dans le sol et ce sans modifier leur biodisponibilité. Cette étude montre également l'accroissement de l'activité microbienne, de la biomasse mais aussi des GRA et des EGM dans le sol. En revanche la composition de la communauté de procaryotes est rarement modifiée dans les sols amendés (Urrea et al. 2019).

Même si divers procédés, biologiques, chimiques ou thermiques, sont réalisés sur les boues d'épuration avant qu'elles ne soient utilisées en agriculture, la majorité des méthodes de traitement des boues permettent l'élimination d'une partie de la charge microbienne mais elles ne sont pas toutes efficaces pour éliminer les métaux lourds qui eux ont une stabilité importante dans l'environnement (Buta et al. 2021). Aussi, pendant la pandémie de Covid-19, pour éviter les contaminations par le SARS-CoV-2, des traitements d'hygiénisation pour les boues ont été mis en place : compostage, séchage thermique, digestion anaérobie thermophile et chaulage.

De plus, 60% des micropolluants sont sorbés sur les boues et vont donc retourner, après épandage, dans le sol (Dagot 2018). Miller et al. ont montré lors du stockage des boues une augmentation des gènes *intI* les deux premiers mois, s'en est suivi une diminution les mois suivant, montrant l'intérêt d'avoir une période de stockage avant fertilisation des sols (Miller et al. 2014). Dans les sols amendés, la fréquence de transfert horizontal de gènes est donc généralement plus importante que dans les sols non amendés, mais ceci n'est valable que sur une durée courte après amendement (Riber et al. 2014).

Une directive a été adoptée par la Communauté Européenne en 1986 concernant la protection de l'environnement et des sols, dans laquelle des valeurs seuils pour les éléments toxiques ont été fixées (Directive 86/278/CEE du Conseil du 12 juin 1986 relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture 1986).

#### II.3.4.4. L'épandage du fumier et du lisier

Le fumier des animaux est constitué d'un mélange d'excréments, d'urine, de litière et d'autres matières associées à la production animale. Ces fumiers sont utilisés comme engrais naturel en raison de leur teneur élevée en nutriments organiques, afin d'améliorer les rendements de la production alimentaire (Li et al. 2020). En France, 300 millions de tonnes de fumier sont épandus chaque année (Lecomte et al. 2023).

Ils sont également fortement abondants en microorganismes, plus particulièrement en bactéries à Gram négatif (Buta-Hubeny et al. 2022). Des bactéries potentiellement pathogènes sont présentes dans ces déchets, elles peuvent survivre pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois, mais leur survie dépend de la source du fumier et des propriétés du sol (Leclercq et al. 2016). En tant qu'engrais, le fumier apporte des nutriments servant à la croissance de bactéries pouvant être porteuses de GRA et favoriser la transmission de ces GRA aux bactéries du sol (Hu et al. 2016). *Clostridium*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* ont été identifiés comme les genres associés à l'enrichissement en GRA dans les sols amendés (Leclercq et al. 2016).

Des résidus d'antibiotiques peuvent être détectés dans le fumier à des concentrations très variables, allant du µg/kg au mg/kg (He et al. 2020). Parmi les antibiotiques détectés, les fluoroquinolones, les sulfamides et les tétracyclines sont les classes les plus fréquentes. Les



concentrations en fluoroquinolones sont plus élevées dans le fumier de volailles, dans le fumier de bovins c'est l'oxytétracycline tandis que dans le lisier de porc les sulfamides sont détectés à de plus grandes concentrations (Li et al. 2020; Apreja et al. 2022).

La dégradation et l'élimination de ces résidus sont rendus difficiles pour certains antibiotiques qui sont souvent excrétés intacts dans le fumier où ils vont pouvoir former des complexes avec les matières organiques solubles. D'autres antibiotiques ayant des demi-vies courtes vont, au contraire, être rapidement dégradés dans les sols amendés par le fumier, c'est le cas de la sulfaméthazine, la tylosine et la chlortétracycline (Li et al. 2020).

Le fait d'épandre du fumier d'animaux traités aux antibiotiques a été montré comme augmentant le taux de BRA et de GRA d'intérêt clinique par rapport aux sols recevant des engrais inorganiques ou ne recevant pas d'engrais. Mais cet apport en BRA et en GRA dépend de la qualité des lisiers et n'est donc pas toujours visible (Li et al. 2020; Han et al. 2018). Une quantité importante de gènes est présente dans le fumier. En effet, lorsqu'il n'est pas traité, l'abondance des GRA est de  $10^6$  à  $10^{11}$  copies/g de poids sec (He et al. 2020).

En comparaison avec les eaux usées des hôpitaux et des municipalités, les eaux usées des élevages de porcs et de poulets contiennent une abondance en GRA de trois à cinq ordres de grandeur supérieurs alors que l'abondance dans les eaux usées des bovins et des poissons est comparable à celle des eaux usées hospitalières et municipales (He et al. 2020).

Des différences considérables ont été observées dans l'abondance des GRA dans le fumier entre les différents types d'animaux, ceci peut être dû à une utilisation différente des antibiotiques. C'est l'épandage du fumier de volaille qui apporte la plus grande concentration de GRA dans le sol, notamment des gènes codant des résistances aux tétracyclines, aux aminosides, aux sulfamides, à la bacitracine et au chloramphénicol (Buta-Hubeny et al. 2022; He et al. 2020). Les gènes de résistance les plus fréquemment détectés dans les déchets d'élevage comprennent les gènes *tet*, *sul*, *erm*, *fca* et *bla*, qui correspondent aux principales classes d'antibiotiques utilisées dans l'élevage. Parmi eux les gènes *tet* et *sul* sont généralement les plus abondants (He et al. 2020).

Des différences existent également entre les pays ; la Chine, qui est le producteur et le consommateur majeur d'antibiotiques dans le monde (Van Boeckel et al. 2015), est le pays où

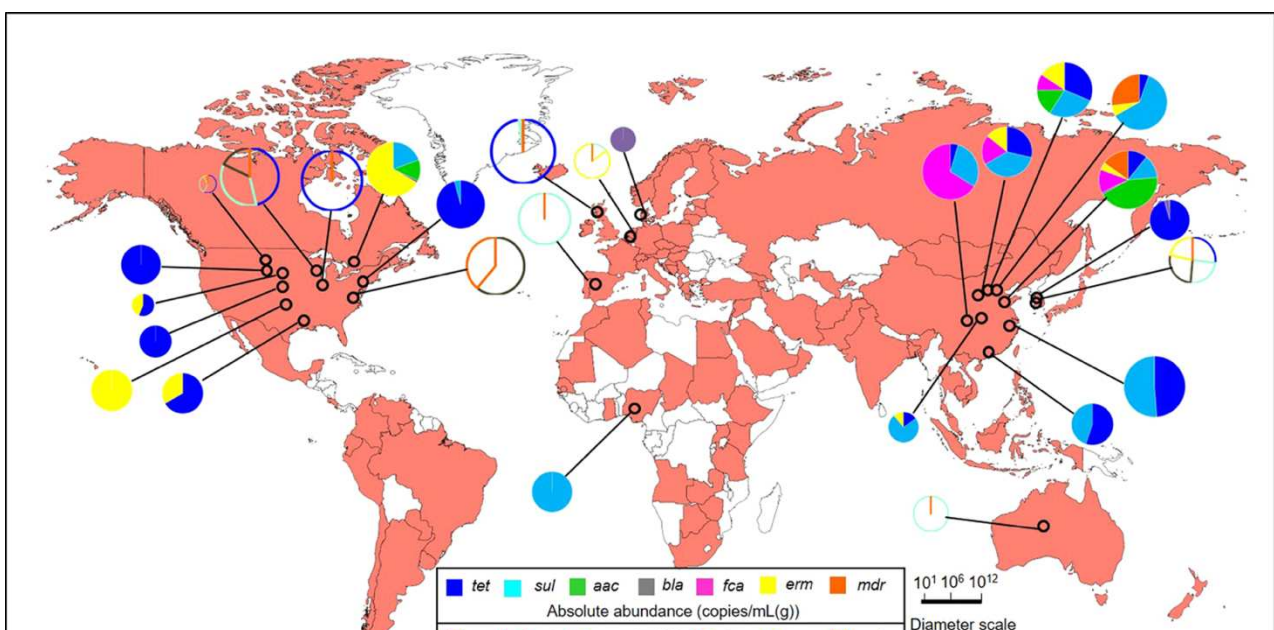


Figure 12 : Abondance relative des gènes de résistance sélectionnés, dans les déchets d'élevage à travers le monde (He et al. 2020)

l'on trouve l'abondance de GRA la plus élevée dans le fumier (He et al. 2020). L'occurrence d'une sélection de gènes de résistance dans le fumier dans différents pays est montrée sur la **Figure 12**.

La fréquence de détection des GRA dans ces sols amendés est jusqu'à 28 000 fois plus élevée que dans les sols qui ne le sont pas (Zhu et al. 2013). Ce sont principalement les gènes de résistance à la tétracycline et aux sulfamides qui voient leur abondance augmenter dans le sol après amendement (Tang et al. 2015). Dans le sol, la persistance des GRA peut être de plus de 120 jours, et leur concentration peut mettre de 3 à 6 mois pour atteindre des concentrations similaires à ce qui est naturellement retrouvé dans le sol (Li et al. 2020; Buta-Hubeny et al. 2022; Han et al. 2018; Kyselková et al. 2015).

L'application de fumier augmente également le nombre et l'abondance relative des EGM, comme par exemple les IS, celles-ci restent ensuite stables pendant plusieurs mois dans sol (Li et al. 2020). Une étude a aussi montré que suite à l'épandage de lisier de porc sur le sol l'abondance des intégrons de classe 1 est augmenté mais est aussi encore maintenu des mois après l'épandage (Byrne-Bailey et al. 2011). Actuellement, le traitement du lisier et du fumier n'inclut pas l'élimination des antibiotiques, des GRA, des BRA et des EGM.

Le sol, en particulier le sol agricole, est donc un réservoir important de GRA. Selon la qualité des boues d'épuration et du fumier animal, ils pourraient être une source de l'apport de GRA dans le sol lors de l'amendement. Ces pratiques agricoles favorisent donc la dissémination des GRA dans les sols et facilitent leur import dans la chaîne alimentaire (Niu et al. 2022; Zhao et al. 2021).

La **Figure 13** résume les différentes possibilités de transmission de BRA et de GRA à l'intérieur et entre chaque compartiment du concept One-Health.

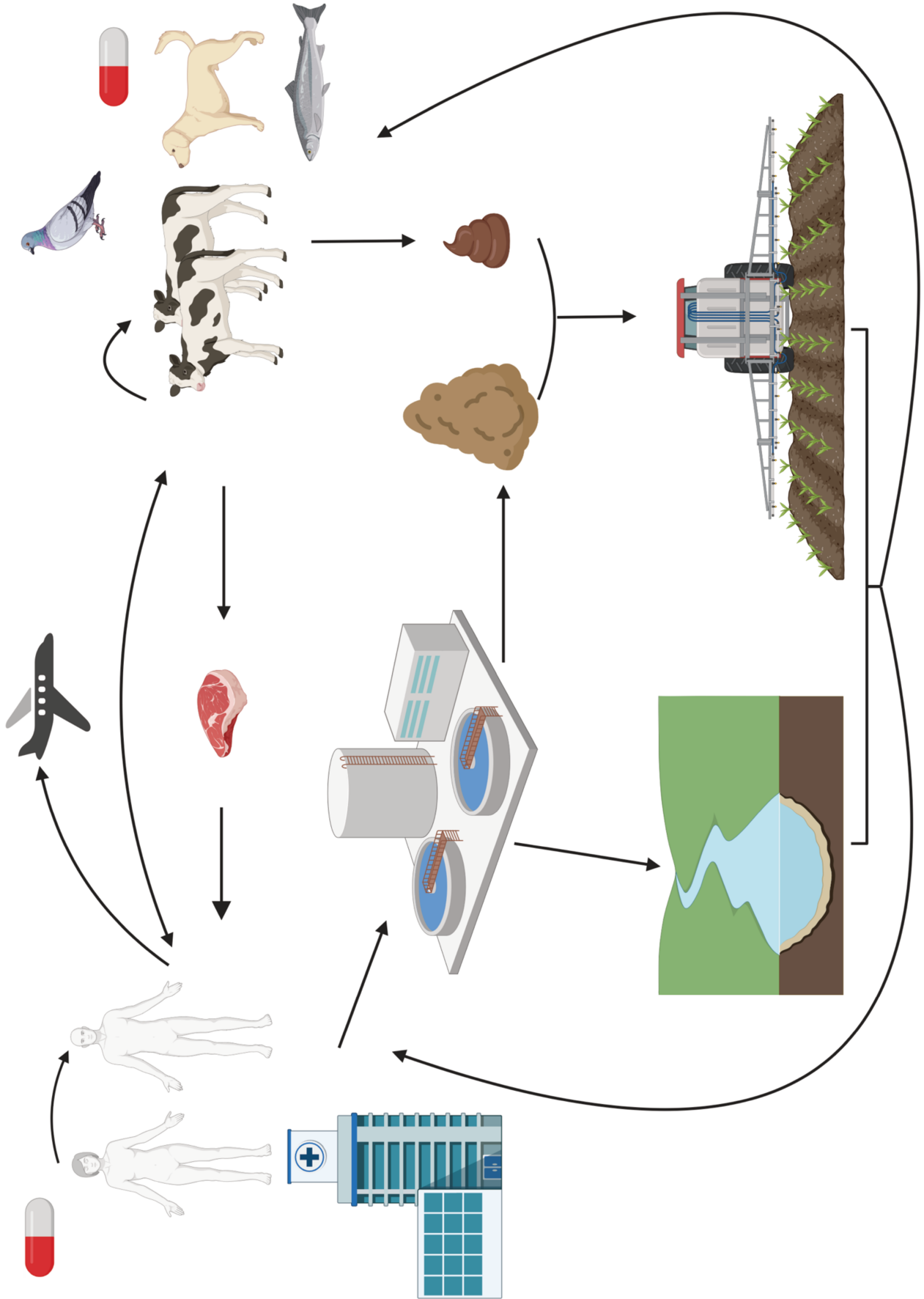


Figure 13 : Voies de transmission de la résistance aux antimicrobiens selon le concept One-Health

## II.4.Évaluation du risque : les indicateurs et suivis environnementaux

Comme il n'existe pas d'outils permettant de détecter les gènes de résistance couvrant toutes les classes d'antibiotiques il est nécessaire d'avoir des indicateurs. Toutefois, la sélection de ces indicateurs ainsi que la détermination des concentrations auxquelles ces indicateurs seraient considérés comme étant sûres reste délicat et nécessitent de faire l'objet d'études supplémentaires. Pour être un bon indicateur, il faut qu'il soit trouvé abondamment dans des milieux impactés par l'activité humaine et peu dans des environnements peu impactés. Actuellement, aucun indicateur unique ne fait l'objet d'un consensus international.

Différentes approches ont donc été mises en place pour évaluer de manière qualitative et/ou quantitative la résistance aux antibiotiques dans l'environnement en utilisant des indicateurs.

Une des approches se fait par culture de BRA ou de groupes bactériens résistants spécifiques. Les bactéries principalement ciblées par cette méthode sont les *E. coli* producteurs de BLSE, les entérocoques résistants à la vancomycine et les SARM (Liguori et al. 2022). Toutefois, cette méthode ne peut se limiter qu'aux bactéries cultivables ne représentant qu'une petite partie du microbiome environnementale. En effet, dans les environnements aquatiques ou dans les boues des STEU, moins de 0.1% des bactéries sont cultivables (Miłobedzka et al. 2022).

Pour pallier à ce biais de culture, des méthodes moléculaires culture-indépendantes ont été développées, c'est le cas par exemple des PCR quantitatives (qPCR) qui sont capables de donner une information sur la prévalence des GRA connus dans les échantillons environnementaux, ce qui peut constituer une bonne estimation du niveau de contamination par les GRA (Berendonk et al. 2015; Li et al. 2020). La qPCR peut permettre une détection et une quantification très sensibles des gènes, ce qui est utile pour identifier et caractériser l'influence anthropique, ainsi que pour évaluer l'élimination des ARG lors du traitement des eaux usées par exemple (Liguori et al. 2022). Grâce à cette méthode Pruden et al. ont notamment pu montrer la corrélation entre le nombre de copies du gène *sull* mesuré dans les sédiments d'une rivière du Colorado et les capacités des STEU et des exploitations animales en amont (Pruden, Arabi, and Storteboom 2012). L'une des difficultés de la qPCR est qu'elle oblige à sélectionner des GRA ou d'autres cibles génétiques d'intérêt, parmi des milliers de choix. Récemment, des méthodes de qPCR à haut débit comprenant des centaines de cibles ARG, pouvant traiter de 96 à 384 échantillons par cycle et produire des résultats en moins de quelques heures, ont été mises au point, ce qui réduit la nécessité de choisir la "bonne" combinaison de GRA (Ishii 2020). C'est par exemple le cas de Resistomap, qui a été créé pour mesurer la résistance aux antibiotiques dans des échantillons environnementaux. Pour cette méthode, dans chaque puce, jusqu'à 384 gènes peuvent être mesurés simultanément. La présence et l'abondance des GRA, des intégrons et des EGM ainsi que du gène de l'ARNr 16S dans chaque échantillon sont analysées ([www.resistomap.com/](http://www.resistomap.com/)).

D'autres marqueurs, tels que les EGM peuvent également être inclus. Cependant, l'instrumentation nécessaire à la qPCR à haut débit n'est pas largement disponible, les protocoles ne sont pas bien établis et l'ajout d'une étape de pré-amplification est nécessaire pour atteindre des limites de détection sensibles, ce qui constitue des inconvénients pour la surveillance de la résistance dans l'environnement. La digital droplet PCR (ddPCR) est de plus en plus utilisée dans ce domaine, car elle est considérée comme une version améliorée de la qPCR, plus sensible et moins affectée par l'inhibition, mais peu d'études sur les GRA ont montré l'utilisation de la ddPCR (Liguori et al. 2022).

Afin d'explorer plus largement la diversité, sans avoir besoin de sélectionner des gènes cibles, au sein d'environnements complexes, la métagénomique a été développée. Le séquençage

métagénomique est réalisé par extraction de l'ADN génomique, fragmentation et séquençage de nouvelle génération (NGS) pour obtenir des millions de reads représentant la communauté bactérienne des échantillons environnementaux (Liguori et al. 2022). La métagénomique a d'abord été utilisée pour examiner les sédiments des eaux de surface fortement impactés par les rejets d'eaux usées pharmaceutiques, en particulier par les antibiotiques (Kristiansson et al. 2011). La métagénomique est aussi largement utilisée pour évaluer les changements dans le résistome à travers les STEU et pour identifier les EGM afin d'estimer les événements de transfert horizontal de gènes (Yang et al. 2014; Ju et al. 2019). Plus récemment, la métagénomique a été décrite comme un outil surveillance des eaux usées, afin d'estimer le portage et l'excrétion des GRA par la population humaine (Hendriksen et al. 2019).

Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients qui sont listés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Avantages et désavantages des approches permettant l'évaluation de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement (adapté de Franklin et al. 2021)

Méthode	Avantages	Désavantages
Culture-dépendante	Facilité de la mise en œuvre	Laborieux et consommateur de temps
	Faibles exigences techniques	Absence de représentation de l'ensemble de la communauté microbienne
	Possibilité de comparer les données au niveau mondial	Biais inhérent à la culture, les bactéries faciles à cultiver étant les plus cultivées (sélection des bactéries à croissance rapide avec des cultures d'une nuit, alors que de nombreuses bactéries environnementales peuvent nécessiter plus de temps de culture)
	Possibilité de déterminer la CMI des bactéries cultivables et les changements phénotypiques sous la pression de sélection des antibiotiques	Néglige les bactéries non cultivables
	Cohérence avec les réglementations et les programmes de surveillance de la qualité de l'eau existants	Absence de comparaison avec les méthodes culture-indépendantes
qPCR	Quantification plus précise du gène cible	Impossible de vérifier l'expression des gènes
	Capacité à détecter les gènes à faible abondance	Inhibition de la qPCR
	Quantification des GRA dans différents environnements	Impossibilité de distinguer directement l'ADN extracellulaire de l'ADN intracellulaire
	Les nouvelles technologies permettent d'analyser un grand nombre de gènes cibles	Limitée par la conception des amorces et les GRA connus
Métagénomique	Analyser tous les gènes dans les échantillons environnementaux	PCR-dépendant et les biais liés à la PCR peuvent affecter la sensibilité et la précision de l'analyse (ex : exagération des taxons dominants ou omission de taxons peu abondants)
	Réalisation simultanée de la taxonomie bactérienne et de l'analyse des gènes fonctionnels (GRA, EGM,...)	N'offre pas une profondeur de séquençage suffisante pour enrichir et assembler les génomes d'une seule souche (en particulier dans des matrices complexes), mais dépend de la plateforme
	Élimine les problèmes liés à une conception inadaptée des amorces et aux biais de la PCR	Faible répétabilité, coût élevé et laborieux en raison de la complexité de la préparation et de l'analyse des échantillons
	Découvrir de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques	Pas de discrimination entre vivant, mort ou actif en l'absence de culture préalable

Certains gènes de résistance ont été suggérés comme indicateurs pour suivre la résistance, il s'agit notamment de gènes d'intérêt clinique, prévalents dans l'environnement et des gènes associés à des EGM avec donc le potentiel d'être transmis par transfert horizontal. Les gènes candidats proposés sont : *intI1*, *sul1*, *sul2*, *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaNDM-1*, *blaVIM*, *blaKPC*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr*, *vanA*, *mecA*, *ermB*, *ermF* et *aph* (Berendonk et al. 2015). D'autres gènes codant des résistances aux antibiotiques de première génération ou des éléments génétiques mobiles avec une prévalence élevée dans les eaux usées ont également été proposés comme indicateurs, il s'agit de *aadA*, *qacEΔ1*, *ermF* et *intI1* (Pärnänen et al. 2019). Dans le cas des eaux douces, la pollution peut être étudiée par l'intermédiaire de deux indicateurs qui sont les gènes de résistance aux sulfamides *sul1* et *sul2*. *sul1* est particulièrement associé aux rejets des effluents de STEU tandis que *sul2* est lui associé aux ruissellement agricoles (Apreja et al. 2022).

Pour étudier plus précisément la pollution anthropique, le gène de l'intégron-intégrase de classe 1, *intI1*, a été proposé comme marqueur du fait i) de l'association de *intI1* avec des gènes conférant des résistances aux antibiotiques, aux métaux lourds ainsi qu'aux désinfectants, ii) de sa présence chez un grand nombre de bactéries pathogènes et non pathogènes chez l'Homme et chez les animaux mais une faible abondance dans les environnements moins affectés et iii) de sa capacité à pouvoir être transféré par transfert horizontal et iv) et son abondance peut rapidement changer en réponse aux pressions environnementales (Gillings et al. 2015). *intI1* est mal éliminé lors du traitement de l'eau et son abondance augmente souvent en aval des STEU. Ces intégrons peuvent être transférés dans divers milieux environnementaux tels que les eaux souterraines, le sol... ce qui indique qu'ils sont des contaminants environnementaux émergents d'importance mondiale. La surveillance d'*intI1* pourrait être utilisée pour l'analyse d'échantillons d'eaux, tels que les effluents d'eaux usées, les eaux de ruissellement, les rivières, les lacs et les océans. Il peut notamment être utilisé comme indicateur de l'abondance et de l'efficacité de l'élimination des GRA dans les STEU. Sa concentration peut être déterminée par qPCR (Gillings et al. 2015; Zheng et al. 2020).

Si l'on s'intéresse aux indicateurs bactériens, potentiellement porteurs de ces gènes de résistance, les recommandations sont de rechercher des bactéries appartenant aux *Gammaproteobacteria* ou aux *Firmicutes* car ce sont cette classe et ce phylum qui sont les plus porteurs de gènes de résistance. Parmi les bactéries proposées on retrouve notamment *E. coli*, déjà utilisé dans la surveillance de la qualité de l'eau. La surveillance de *E. coli* dans les eaux usées pourrait permettre une prédiction du niveau de résistance clinique. L'avantage de cette observation au niveau des eaux usées est le fait de ne pas avoir besoin de faire des prélèvements au niveau des individus pour avoir des données sur la résistance (Huijbers, Larsson, and Flach 2020).

Un protocole standardisé a été développé afin de réaliser la surveillance de *E. coli* et plus particulièrement les *E. coli* producteurs de BLSE, il s'agit du protocole tricycle. Il a été initié par l'OMS en collaboration avec la FAO et l'OIE. Le protocole tricycle a pour objectif d'établir un système de surveillance commun et simplifié afin de détecter et déterminer la prévalence de la bactérie indicatrice choisie dans ce protocole : *E. coli* producteur de BLSE et ce dans les trois secteurs que sont les humains, les animaux et l'environnement. Même si elle ne représente pas à elle seule le problème global de la RAM, cette bactérie a été choisie en tant qu'indicateur car 1) il existe de grandes variations des taux de colonisation par les *E. coli* BLSE chez les humains que ce soit dans ou entre les pays et également dans le temps, 2) sa prévalence chez les animaux d'élevage est également variable et l'utilisation d'antibiotiques dans la chaîne alimentaire et la présence de *E. coli* BLSE dans l'environnement serait la cause d'une partie de la morbidité humaine liée aux *E. coli* BLSE, 3) des diminutions de l'occurrence des *E. coli* BLSE ont été observées suite à la mise en place de plans conduisant à une baisse de l'exposition aux antibiotiques chez les humains et les animaux et 4) les BLSE confèrent une résistance à des antimicrobiens d'importance critique (WHO 2021).

D'autres bactéries ont été suggérées comme indicatrices : *K. pneumoniae*, *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* (Berendonk et al. 2015). Les bactéries choisies comme indicatrices le sont car elles sont ubiquistes et sont également d'importants vecteurs de la RAM et sont responsables du transfert des ARG entre les différents compartiments de l'environnement.

Outre ces indicateurs, les modèles mathématiques sont des outils rapides et peu coûteux, de plus en plus utilisés pour prédire la propagation de la résistance aux antibiotiques d'un point de vue microbiologique et épidémiologique mais également pour soutenir la prise de décisions en matière de santé publique. Ces modèles sont notamment capables d'étudier la relation entre l'exposition aux antibiotiques et l'émergence et la sélection de la résistance au niveau microbien

et au niveau de la population et aussi d'évaluer la tolérance aux antibiotiques (Opatowski et al. 2011; Knight et al. 2019).

Une partie des indicateurs cités est décrite dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Description des indicateurs d'évaluation de la résistance aux antibiotiques (adapté de Liguori et al. 2022).

Indicateurs	Description	Critères
Gène de l'ARNr 16S	Biomarqueur universel des bactéries	Évaluation de : - l'abondance des bactéries - l'élimination/l'augmentation des bactéries - l'abondance relative des GRA
crAssphage	Phage, associé au genre <i>Bacteroides</i> , abondant dans l'intestin humain	- Abondant dans les eaux usées - Indicateur de contamination fécale
Gène de l'intégrase de l'intégron de classe 1, <i>int1</i>	Associé à des EGM susceptibles de porter des GRA	- Parmi les biomarqueurs les plus utilisés - Abondant dans les eaux usées - Lié aux GRA - Présents dans de nombreuses espèces bactériennes des eaux usées - Présents sur le chromosome et les plasmides
Gène de la dihydroptéroate synthase, <i>sul1</i>	Code la résistance aux sulfamides, première classe d'antibiotiques utilisés en médecine	- Parmi les GRA les plus examinés dans les eaux usées - Abondant dans les eaux usées - Associé à <i>int1</i> - Présents dans de nombreuses espèces bactériennes présentes dans les eaux usées - Présents sur le chromosome et les plasmides
Gène de l'aminoglycoside nucléotidyltransférase, <i>aadA</i>	Code la résistance à la streptomycine	- Les gènes de résistance aux aminoglycosides sont parmi les plus abondants dans les eaux usées - Associé à <i>int1</i> - Présents dans de nombreuses espèces bactériennes présentes dans les eaux usées - Présents sur le chromosome et les plasmides
Gène de bêta-lactamase, <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Code la résistance aux bêta-lactamines (pénicillines et peut inclure les céphalosporines de troisième génération)	- Présents dans de nombreuses espèces bactériennes des eaux usées - Comprend des producteurs de BLSE d'importance clinique - Présents sur le chromosome et les plasmides
Gènes de méthyltransférase de résistance à l'érythromycine, <i>ermB</i> ou <i>ermF</i>	Code la résistance aux macrolides	- Les gènes de résistance aux macrolides sont parmi les plus abondants dans les eaux usées - Présents dans de nombreuses espèces bactériennes présentes dans les eaux usées
Résistance plasmidique aux quinolones, <i>qnrS</i>	Code la résistance aux quinolones	- Abondant dans les eaux usées - Présents dans de nombreuses espèces bactériennes présentes dans les eaux usées - Principalement associé à des plasmides

### III. Les facteurs environnementaux liés à la dissémination des gènes de résistance : le rôle de l'exposome

---

#### III.1. Définition de l'exposome

La notion d'exposome est principalement utilisée chez l'Homme et a été introduite en 2005 par Christopher Paul Wild. L'exposome est défini comme la totalité des expositions environnementales auxquels les Hommes sont soumis, depuis leur conception jusqu'à la fin de leur vie. Les facteurs pris en compte dans cette notion incluent l'environnement microbiologique, chimique, physique, médicamenteux, récréatif, l'alimentation, le style de vie ainsi que les infections (Wild 2005).

Dans mon travail de thèse, l'exposome est considéré comme les composés présents dans l'environnement auxquels sont exposées les bactéries et pouvant avoir une influence sur la RAM et sa dissémination.

Les polluants résultant des activités anthropiques ont un impact sur chacune des parties de l'environnement (air, eau et sol), influençant radicalement l'équilibre naturel. Cependant, la vie microbienne est abondante dans la plupart des environnements, par conséquent, l'introduction de polluants dans l'environnement pose des défis importants à la communauté microbienne. Mais l'impact des conditions environnementales sur la résistance aux antimicrobiens est mal connu. Malgré cela, trois catégories de composés ont bien été décrits dans la littérature : les antimicrobiens, les métaux lourds et les biocides étant capables de favoriser la sélection de gènes de résistance (Singer et al. 2016).

#### III.2. Antibiotiques et molécules pharmaceutiques non-antibiotiques

Le marché mondial des médicaments, qu'ils soient utilisés en médecine humaine ou en médecine animale, représentait en 2021 environ 1 300 milliards de dollars. La production de ces médicaments liée à leur consommation engendre des contaminations environnementales. En effet, un grand nombre de résidus de ces médicaments se retrouve dans l'environnement (Lecomte et al. 2023). Ceci s'explique par le fait que les antibiotiques sont peu métabolisés par l'organisme, jusqu'à 90% du traitement antibiotique peut être excrété de manière inchangée (Chow, Ghaly, and Gillings 2021).

C'est donc par les fèces et par les urines que sont principalement excrétés ces contaminants en France, cette voie est plus importante que le rejet dans l'environnement par les effluents industriels ou encore le rejet inadapté des médicaments qui n'ont pas été utilisés. Environ 80% des flux de ces contaminants qui arrivent en entrée de station d'épuration sont d'origine domestique. Les effluents hospitaliers représentent donc seulement une faible part de l'apport en résidus de médicaments même si la concentration en ces molécules y est plus importante (Lecomte et al. 2023).

Les antibiotiques sont retrouvés dans les eaux de surface et dans les eaux usées à des concentrations allant du ng/L au µg/L (**Tableau 3**) et représentent les molécules pharmaceutiques les plus importantes dans les milieux aquatiques. La concentration de ces molécules dans les eaux est fonction de leur utilisation, de leur consommation, de la capacité de métabolisation de l'organisme mais également de leur dégradation, qu'elle soit naturelle ou



réalisée par les procédés des STEU (Lecomte et al. 2023). Ils sont d'autant plus retrouvés dans les environnements impactés par l'Homme (Chow, Ghaly, and Gillings 2021).

Dans les pays disposant de systèmes d'assainissement bien développés, les rejets dans l'environnement de ces résidus sont réduits, mais les communautés microbiennes présentes dans les stations d'épuration peuvent quand même être exposées à des concentrations d'antibiotiques de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$ . Une grande partie des antibiotiques s'accumule dans les boues qui peuvent ensuite être épandues sur les terres agricoles (Kovalakova et al. 2020). Si les résidus ne sont pas éliminés par les STEU ils peuvent se retrouver dans l'environnement, principalement dans le milieu aquatique. Ils peuvent atteindre les eaux de surface, les eaux souterraines ou encore les sédiments. Mais, dans les eaux de surface recevant des eaux usées municipales, les concentrations d'antibiotiques dépassent rarement  $1 \mu\text{g/L}$  (Kümmerer 2009). Les antibiotiques sont donc relargués de manière continue à des concentrations sub-inhibitrices (Chow, Ghaly, and Gillings 2021). Globalement, l'efficacité des STEU pour l'élimination des résidus de médicaments est de 50 à 60%. L'élimination est dépendante des molécules, de la STEU y compris des procédés et mécanismes mis en place, tels que l'oxydation, la biotransformation, la biodégradation,... (Dagot 2018).

Le rejet des industries pharmaceutiques sont considérés comme une source potentielle de pollution, notamment en Inde ou en Chine, lieux de production internationaux. En Europe, il a été montré dans plusieurs pays (Croatie, Danemark ou encore Norvège) que des concentrations élevées d'antibiotiques provenaient des effluents de fabrication (Monahan et al. 2021). Une étude en Inde, sur l'analyse de produits pharmaceutiques retrouvés dans les effluents d'une STEU desservant des fabricants majeurs de médicaments pour le marché mondial, a rapporté des concentrations de ces produits beaucoup plus élevées que ce qui avait déjà été décrit dans la littérature. En effet, la ciprofloxacine était l'antibiotique le plus abondant, avec une concentration atteignant  $31\,000 \mu\text{g/L}$ , concentration 1000 fois supérieure au niveau de toxicité chez certaines bactéries (Larsson, de Pedro, and Paxeus 2007).

Un des facteurs dont dépend la détection des antibiotiques dans l'environnement est leur persistance. Certains antibiotiques, très utilisés, pour lesquelles on s'attend à retrouver une grande concentration dans l'environnement ne sont finalement pas détectés car ils y sont dégradés rapidement. C'est par exemple le cas des  $\beta$ -lactamines, qui sont facilement dégradées dans l'eau à cause de leur structure chimique instable (Monahan et al. 2021). Au contraire, d'autres antibiotiques comme les fluoroquinolones et les tétracyclines sont beaucoup plus persistants, leur permettant de rester plus longtemps dans l'environnement, de se propager davantage et de s'accumuler à des concentrations plus élevées (Kovalakova et al. 2020).

La persistance des antibiotiques dans l'environnement est variable, par exemple dans le sol elle varie de quelques jours, pour les antibiotiques tels que le chloramphénicol, à 300 jours, par exemple pour l'oxytétracycline. Elle dépend également de différents facteurs, comme l'exposition à la lumière, dans ce cas les antibiotiques persistent mieux lorsqu'ils n'y sont pas exposés, la persistance est d'autant plus forte que la température est basse, par ailleurs dans le sol la persistance va également dépendre de ses propriétés et de son pH (Singer et al. 2016).

Dans le fumier et dans les sols amendés par le fumier, les concentrations sont souvent remarquablement plus élevées que celles trouvées dans les environnements aquatiques. Ceci est vrai aussi pour les boues produites dans les stations d'épuration. Cependant, de nombreux antibiotiques ont tendance à se lier fortement aux particules, et seule une fraction est probablement bioactive mais l'évaluation de la proportion d'antibiotiques biodisponibles est encore un défi majeur (Kovalakova et al. 2020).

Les communautés microbiennes contribuent au devenir de ces résidus, elles peuvent avoir un rôle dans leur bioaccumulation ou leur dégradation. Mais ces molécules peuvent impacter la

diversité des microorganismes alors, afin de lutter contre ces contaminants ces organismes développent des mécanismes de tolérance ou de résistance (Lecomte et al. 2023).

La plus faible concentration d'antibiotique ayant un effet d'inhibition de la croissance sur une bactérie est appelée concentration minimale inhibitrice (CMI). Mais, il a été démontré que des concentrations inférieures à la CMI pouvaient exercer une pression de sélection, un seuil a donc été défini, appelé concentration sélective minimale (CSM), concentration à laquelle les souches résistantes ont un avantage compétitif par rapport aux souches sensibles (Monahan et al. 2021).

Ces faibles doses d'antibiotiques, à des concentrations sub-inhibitrices, ont donc un impact sur la résistance. Elles ont été montrées, pour certains antibiotiques, comme augmentant le taux de mutation ainsi que le taux de transfert de gènes chez les bactéries par le mécanisme de conjugaison à travers l'induction du système SOS (Chow, Ghaly, and Gillings 2021). Il a également été constaté que les antibiotiques augmentent la compétence bactérienne, ce qui favorise le transfert de gènes par transformation (Charpentier, Polard, and Claverys 2012). Un paramètre permettant de prédire la concentration à laquelle il existe un risque de sélection de la résistance a été mis en place, il s'agit de la concentration prédite sans effet (PNEC), calculée à partir des CMI des populations bactériennes fournies par l'organisme européen en charge de l'analyse de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en médecine humaine, l'EUCAST. Les PNEC sont comprises entre 0,008µg/L et 64µg/L, ce qui représente des concentrations environ 16 à 32 fois plus basses que les CMI les plus faibles (Bengtsson-Palme and Larsson 2016) (**Tableau 3**). Il a été suggéré que dans l'environnement, tout comme dans l'organisme, les antibiotiques peuvent agir en synergie et exercer une pression de sélection même si leur concentration se situe en-dessous de leur PNEC individuelle (Monahan et al. 2021).

Outre les antibiotiques, d'autres molécules pharmaceutiques sont détectées dans l'environnement. Les plus souvent retrouvées dans les eaux sont les anti-inflammatoires, les analgésiques/antipyrétiques, les régulateurs lipidiques, les β-bloquants, les agents de contraste, les hormones, les antidépresseurs et les anticonvulsifs (Sanseverino et al. 2018).

Ces molécules pharmaceutiques non-antibiotiques jouent aussi un rôle dans la résistance. Elles représentent plus de 95% du marché du médicament à travers le monde. Elles sont souvent retrouvées dans l'environnement à des concentrations allant du ng/L au mg/L (**Tableau 4**), notamment dans les eaux usées, les eaux de surface, l'eau potable ou encore les eaux souterraines. Cette présence dans l'environnement est due à l'excrétion de ces médicaments par l'Homme, qui tout comme les antibiotiques sont excrétés à 90% et aboutissent dans l'environnement.

Une étude sur l'effet de diverses molécules pharmaceutiques, ayant une consommation mondiale élevée et faisant partie de la liste des médicaments essentiels de l'OMS, a été réalisée sur une bactérie naturellement compétente, *Acinetobacter baylii*. Les médicaments choisis sont des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (ibuprofène, naproxène et diclofénac), un hypolipédémiant (gemfibrozil) et un β-bloquant (propranolol). L'étude a montré que ces 5 médicaments permettent d'augmenter la fréquence de transformation des GRA en utilisant des concentrations similaires à celles trouvées en clinique et dans l'environnement. L'augmentation de la fréquence de transformation semblent être liée à la promotion de la compétence, une hausse du stress, une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi qu'une plus grande perméabilité de la membrane bactérienne (Yue Wang et al. 2020).

Tableau 3 : Pourcentage d'excrétion des antibiotiques par les consommateurs, ainsi que le pourcentage de leur élimination moyenne par les STEU associés à leur PNEC de sélection de résistance et leurs concentrations (en ng/µL) dans différents milieux aquatiques, selon la littérature. PNEC = concentration prédite sans effet.

Antibiotiques	<sup>a</sup> Excrétion (%)	<sup>b</sup> Élimination moyenne (%)	<sup>c</sup> PNEC (sélection de résistance) (µg/L)	Concentration dans l'eau (ng/µL)		Références
<b>Macrolides</b>						
Azithromycine		47 - 100	0,25	Eaux usées hospitalières	3 - 7 351	(Santos et al. 2013; Orias et Perrodin 2013; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Influent	<LD - 295	(Hapeshi et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Effluent	<LD - 1 255	(Hapeshi et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Azuma et al. 2015; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Eaux de surface	2,6 - 166,5	(Wang et al. 2015; Yan et al. 2015; Paíga et al. 2016; López-Serna, Petrović, et Barceló 2011)
Erythromycine	25 - 60	0 - 50	1	Eaux usées hospitalières	22,2 - 27 000	(Santos et al. 2013; Orias et Perrodin 2013)
				Influent	<LD - 964	(Hapeshi et al. 2015; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Guedes-Alonso et al. 2020)
				Effluent	<LD - 217	(Hapeshi et al. 2015; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Guedes-Alonso et al. 2020)
				Eaux de surface	<LD - 156	(Lindim et al. 2016; Petrović et al. 2014; Yan et al. 2015; Wang et al. 2015; López-Serna, Petrović, et Barceló 2011)
<b>Fluoroquinolones</b>						
Ciprofloxacine	50 - 83,7	45 - 66	0,064	Eaux usées hospitalières	3 - 124 500	(Santos et al. 2013; Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Influent	107 - 1 307	(Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Effluent	108 - 1 396	(Papageorgiou, Kosma, et Lambropoulou 2016; Azuma et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Eaux de surface	0 - 115	(Paíga et al. 2016; Petrović et al. 2014; Lindim et al. 2016; López-Serna, Petrović, et Barceló 2011)
Ofloxacine	72,5	65 - 100	0,5	Eaux usées hospitalières	70 - 37 000	(Santos et al. 2013; Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Influent	51,9 - 4 986	(Santos et al. 2013; Hapeshi et al. 2015; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Effluent	<LD - 4 726	(Santos et al. 2013; Hapeshi et al. 2015; Chiffre et al. 2016; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Eaux de surface	<LD - 114,1	(Lindim et al. 2016; Petrović et al. 2014; Yan et al. 2015; Wang et al. 2015; López-Serna, Petrović, et Barceló 2011)
<b>Sulfamides</b>						
Sulfaguandine				Eaux usées hospitalières		
				Influent	ND	(Čizmić, Babić, et Kaštelan-Macan 2017)
				Effluent	ND	(Čizmić, Babić, et Kaštelan-Macan 2017)
				Eaux de surface		
Sulfaméthoxazole	15 - 30	50 - 76	16	Eaux usées hospitalières	1 - 25 300	(Santos et al. 2013; Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Influent	55 - 2 260	(Hapeshi et al. 2015; Gurke et al. 2015; Subedi et al. 2017; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Effluent	<LD - 1 380,4	(Hapeshi et al. 2015; Chiffre et al. 2016; Gurke et al. 2015; Papageorgiou, Kosma, et Lambropoulou 2016; Subedi et al. 2017; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Varela et al. 2014; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Eaux de surface	<LD - 115,3	(Hossain et al. 2018; Wang et al. 2015; Yan et al. 2015; Lv et al. 2014; Paíga et al. 2016; Lindim et al. 2016; Subedi, Codru, et al. 2015)
Sulfathiazole				Eaux usées hospitalières	ND - 280	(Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014)
				Influent	94 - 180	(Giebułtowicz et al. 2020; Varela et al. 2014)
				Effluent	21 - 120	(Giebułtowicz et al. 2020; Varela et al. 2014)
				Eaux de surface	7 - 29	(Giebułtowicz et al. 2020)
<b>Autre antibiotique</b>						
Triméthoprime	40 - 69	0 - 97	0,5	Eaux usées hospitalières	2 - 14 993	(Santos et al. 2013; Orias et Perrodin 2013; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Influent	0 - 400	(Santos et al. 2013; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Subedi et al. 2017; Gurke et al. 2015; Hapeshi et al. 2015; Guedes-Alonso et al. 2020; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Effluent	<LD - 2 080	(Paíga et al. 2016; Santos et al. 2013; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Subedi et al. 2017; Papageorgiou, Kosma, et Lambropoulou 2016; Gurke et al. 2015; Chiffre et al. 2016; Hapeshi et al. 2015; Guedes-Alonso et al. 2020; Rodriguez-Mozaz et al. 2015)
				Eaux de surface	<LD - 156	(Subedi, Codru, et al. 2015; Lindim et al. 2016; Moreno-González et al. 2015; Petrović et al. 2014; Wang et al. 2015; Hossain et al. 2018)

a. <https://www.rxlist.com> , b. (Hapeshi et al. 2015a), c. (Bengtsson-Palme and Larsson 2016)

Tableau 4 : Pourcentage d'excrétion et pourcentage d'élimination moyenne par les STEU des molécules pharmaceutiques non-antibiotiques ainsi que leurs concentrations (en ng/L) dans différents milieux aquatiques, dans la littérature

Molécules	Excrétion (%)	Élimination moyenne (%)	Concentration dans l'eau (ng/L)		Références
<b>Molécules pharmaceutiques non-antibiotiques</b>					
Ibuprofène	1 - 10	91 - 100	Eaux usées hospitalières	0,21 - 38 148	(Santos et al. 2013; Tran, Urase, et Ta 2014; Orias et Perrodin 2013)
			Influent	0 - 19 118	(Hapeshi et al. 2015; Subedi et al. 2017; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Guedes-Alonso et al. 2020)
			Effluent	<LD - 1 940	(Hapeshi et al. 2015; Subedi et al. 2017; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Guedes-Alonso et al. 2020)
			Eaux de surface	0 - 17 600	(Yan et al. 2015; Lv et al. 2014; Aristizabal-Ciro et al. 2017; Paíga et al. 2016; Lolić et al. 2015; Petrović et al. 2014; Gumbi et al. 2017; Lindim et al. 2016; Subedi, Codru, et al. 2015; Tran, Urase, et Ta 2014)
Ketoprofène	80	69 - 93	Eaux usées hospitalières	0,12 - 17 400	(Santos et al. 2013; Tran, Urase, et Ta 2014; Orias et Perrodin 2013)
			Influent	<LD - 956	(Santos et al. 2013; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Subedi et al. 2017; Hapeshi et al. 2015)
			Effluent	<LD - 320	(Paíga et al. 2016; Santos et al. 2013; Subedi, Balakrishna, et al. 2015; Papageorgiou, Kosma, et Lambropoulou 2016; Chiffre et al. 2016; Hapeshi et al. 2015)
			Eaux de surface	0,04 - 9 220	(Tran, Urase, et Ta 2014; Lindim et al. 2016; Gumbi et al. 2017; Petrović et al. 2014; Lolić et al. 2015; Lv et al. 2014; López-Serna, Petrović, et Barceló 2011)
Diclofénac	6 - 100	10 - 66	Eaux usées hospitalières	0,14 - 14 934	(Santos et al. 2013; Tran, Urase, et Ta 2014; Orias et Perrodin 2013; López-Serna, Petrović, et Barceló 2011)
			Influent	0 - 3 457	(Hapeshi et al. 2015; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Guedes-Alonso et al. 2020)
			Effluent	<LD - 3 283	(Hapeshi et al. 2015; Chiffre et al. 2016; Al-Tarawneh et al. 2015; Santos et al. 2013; Paíga et al. 2016; Guedes-Alonso et al. 2020)
			Eaux de surface	0 - 10 200	(Yan et al. 2015; Lv et al. 2014; Paíga et al. 2016; Lolić et al. 2015; Petrović et al. 2014; Bayen et al. 2016; Gumbi et al. 2017; Lindim et al. 2016; Tran, Urase, et Ta 2014)

### III.3. Les biocides

Les biocides sont des désinfectants utilisés en milieu hospitalier et industriel, dans le domaine de la cosmétique, dans les produits ménagers ou encore dans les fermes. Ces désinfectants contiennent des ingrédients actifs à des concentrations supérieures à la CMI des micro-organismes ciblés. Les plus couramment utilisés sont l'éthanol, la chlorhexidine, le formaldéhyde, le triclosan ainsi que les ammoniums quaternaires (QAC) (Singer et al. 2016; Tezel and Pavlostathis 2015).

Les QAC sont des surfactants cationiques, découverts dans les années 1930, efficaces contre un grand nombre de bactéries, champignons et virus. Ils agissent en perturbant la stabilité physique et ionique de la membrane cellulaire. Ils sont utilisés dans le nettoyage et la désinfection, le traitement de l'eau mais également dans les produits pharmaceutiques. Par exemple, le chlorure de benzalkonium (BAC) est utilisé en tant qu'ingrédient dans les conservateurs, les désinfectants médicaux et les systèmes ophtalmiques (Buffet-Bataillon et al. 2012; Chukwu et al. 2023; Tezel and Pavlostathis 2015).

L'utilisation de ces désinfectants dans les domaines hospitaliers, industriel et domestique conduit à la production d'eaux usées contenant des résidus de ces biocides. Les biocides sont ensuite principalement relargués dans l'environnement par les STEU (Singer et al. 2016). En effet, les STEU étant conçues pour éliminer les principaux composés organiques facilement

dégradables, la plupart des contaminants à l'état de traces, y compris les QAC, sont rejetés dans l'environnement (Tezel and Pavlostathis 2015). Ils sont détectés dans l'environnement à des concentrations dépassant les limites fixées par les gouvernements et les agences de réglementation, ceci est surtout vrai pour les pays en développement où les systèmes de traitement ne fonctionnent pas de manière optimale ou sont absents. Les concentrations retrouvées dans la littérature sont décrites dans le **Tableau 5**. De plus, la plupart des biocides ne sont pas entièrement solubilisés et sont capables d'adhérer aux particules et aux sédiments riches en carbone (Chukwu et al. 2023).

Il a été montré que 75 % des QAC qui sont utilisés chaque année sont rejetés dans les STEU, tandis que le reste est déversé directement dans l'environnement. La concentration moyenne des QAC dans les eaux usées domestiques est de 0,5 mg/L, dans les effluents traités elle est de 0,05 mg/L, dans les boues d'épuration de 5000 mg/kg de poids sec et dans les eaux de surface de 0,04 mg/L, ce qui est inférieur aux concentrations appliquées. Néanmoins, l'utilisation inappropriée de ces désinfectants, puis la dilution dans l'environnement après le rejet et la biodégradation ont pour conséquence la création de gradients de concentration en biocides. Cela a pour conséquence une exposition des microorganismes à des concentrations à la fois non-inhibitrices, sub-inhibitrices ou sur-inhibitrices de biocides. Cette exposition facilite l'évolution de la résistance à ces agents mais peut aussi entraîner des phénomènes de co- et cross-résistance à d'autres agents antimicrobiens (Tezel and Pavlostathis 2015).

L'adaptation aux QAC peut se faire par la modification de la membrane, des porines, ou encore par la surexpression ou l'acquisition de pompes à efflux via des EGM, tels que les plasmides et les intégrons, les gènes codant ces pompes peuvent ensuite être transmis horizontalement. Ces gènes sont généralement retrouvés abondamment dans l'environnement. Les pompes à efflux acquises appartiennent à la famille SMR. Parmi elles, EmrE, smr et SugE sont des pompes à efflux multidrogues, tandis que QacE, Qac $\Delta$ E, QacF, QacG, QacH, QacI, QacJ et QacZ sont spécifiques au QAC (Tezel and Pavlostathis 2015).

Les gènes de résistance aux biocides ont été identifiés chez beaucoup d'espèces bactériennes, parmi lesquelles les gènes *qacE* et *qacA/B* communs aux *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas* et les gènes *qacA/B* chez *S. aureus* conférant la résistance aux QAC (Ignak, Nakipoglu, and Gurler 2017; Vali et al. 2017).

Les biocides et les antibiotiques possèdent des mécanismes de résistance communs, ce qui peut leur permettre de conduire à la co-sélection des GRA. Les biocides, à des concentrations sublétales, sont capables de sélectionner des mutations conférant une résistance aux antibiotiques (Wesgate, Grasha, and Maillard 2016). La résistance aux biocides peut entraîner simultanément la résistance aux antibiotiques de deux façons, soit par co-résistance soit par cross-résistance. La co-résistance aux antibiotiques et aux biocides peut être due à l'acquisition d'EGM, tels que les plasmides, les transposons et les intégrons portant deux gènes de résistance ou plus. La cross-résistance quant à elle peut être liée à l'export à la fois des QAC et des antibiotiques par une pompe à efflux (Buffet-Bataillon et al. 2012).

Certaines études suggèrent que la relation entre la résistance aux antibiotiques et l'exposition des microorganismes aux QAC n'est pas très claire (Cole et al. 2003; Gerba 2015), mais d'autres études ont montré que l'exposition aux QAC entraîne la dissémination d'intégrons porteurs de gènes de résistance (Gillings 2014; Gillings et al. 2015). D'autre part, des concentrations sub-inhibitrices de QAC créent un stress oxydatif, qui déclenche la réponse SOS, induisant des erreurs lors de la réplication de l'ADN, ce qui entraîne des mutations et des transferts de gènes. Chez la bactérie *E. coli*, par exemple, une exposition au bromure de cétyltriméthylammonium entraîne la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Nakata, Tsuchido, and Matsumura 2011).

Une exposition continue à des concentrations sub-inhibitrices de biocides bien inférieures à la concentration recommandée pour leur utilisation peut, dans des conditions de laboratoire, induire une résistance, même en l'absence d'une tolérance accrue aux biocides (Adkin et al. 2022). Chez *S. aureus*, sa co-résistance à l'oxacilline et au chlorure de benzalkonium lui permet d'être huit fois plus tolérant à l'antibiotique que la souche sauvage (Singer et al. 2016). Dans l'étude de Wesgate et al, il a été montré que l'exposition au triclosan induit une résistance à la ciprofloxacine chez *S. aureus* (Wesgate, Grasha, and Maillard 2016).

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques peut être modifiée en cas d'exposition simultanée à des herbicides. Les réponses observées aux différents herbicides varient selon les espèces exposées. Il a été démontré que l'activation de la pompe à efflux AcrAB-TolC, suite à une exposition aux herbicides, chez *E. coli* et *Salmonella Typhimurium* entraîne une réduction de la sensibilité aux fluoroquinolones, aux  $\beta$ -lactamines, à la tétracycline et au chloramphénicol (Kurenbach et al. 2015). Zhang et son équipe ont montré que des désinfectants, comprenant le chlore, la chloramine et le peroxyde d'hydrogène, favorisent le transfert des gènes de résistance *sulI* et *aadA2* de la bactérie *Aerococcus* sp. à la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. (Zhang et al, 2017).

Les plasmides de type IncP-1 jouent également un rôle dans la dissémination des gènes de résistance aux QAC, ils sont largement répandus dans les environnements présentant des concentrations sub-inhibitrices de QAC, tels que les sols et les stations d'épuration.

Tableau 5 : Concentration (en ng/L) des biocides dans différents milieux aquatiques selon la littérature

Biocides	Concentration dans l'eau (ng/L)		Références
Albendazole	Eaux usées hospitalières	n.d - 3 810	(Santos et al. 2013; Porto et al. 2019)
	Influent	n.d - 891	(Santos et al. 2013; Zhao et al. 2024; Sim et al. 2013; Faleye et al. 2019; Porto et al. 2019)
	Effluent	n.d - 129	(Santos et al. 2013; Zhao et al. 2024; Sim et al. 2013; Faleye et al. 2019; Porto et al. 2019)
	Eaux de surface	1,59 - 20,7	(Chen et al. 2021; Mooney et al. 2021)
Flubendazole	Influent	14,5 - 1. 460	(Zhao et al. 2024; Sim et al. 2013)
	Effluent	4,6 - 13,0	(Zhao et al. 2024; Sim et al. 2013)
	Eaux de surface	1,09 - 22,35	(Chen et al. 2021)
Thiabendazole	Eaux usées hospitalières	9,17 - 1 746	(Santos et al. 2013; Porto et al. 2019)
	Influent	0 - 440	(Santos et al. 2013; Giebultowicz et al. 2020; Juku et al. 2019; Zhao et al. 2024; Zhang et al. 2020)
	Effluent	0,493 - 370	(Santos et al. 2013; Giebultowicz et al. 2020; Juku et al. 2019; Zhao et al. 2024; Zhang et al. 2020)
	Eaux de surface	<LD - 16	(Santos et al. 2013; Giebultowicz et al. 2020; Chen et al. 2021)
Levamisole	Eaux usées hospitalières	39,5 - 182	(Santos et al. 2013;
	Influent	6,96 - 229,8	(Santos et al. 2013; Zhao et al. 2024; Ćizmić, Babić, et Kaštelan-Macan 2017; Bijlsma et al. 2021)
	Effluent	8,72 - 176	(Santos et al. 2013; Zhao et al. 2024; Ćizmić, Babić, et Kaštelan-Macan 2017; Bijlsma et al. 2021)
	Eaux de surface	0,79 - 2,11	(Chen et al. 2021; Mooney et al. 2021)
Pyrantel pamoate	Influent	9,7 - 12,5	(Zhao et al. 2024)
	Effluent	3,1 - 7,0	(Zhao et al. 2024)
	Eaux de surface	3,15	(Chen et al. 2021)
Tébuconazole	Influent	ND - 8	(Kahle et al. 2008; Huang et al. 2010)
	Effluent	1 - 10	(Kahle et al. 2008; Huang et al. 2010)
	Eaux de surface	ND - 3	(Kahle et al. 2008; Huang et al. 2010)

### III.4. Les métaux lourds

Les métaux lourds sont les polluants les plus abondants dans l'environnement (Aslam et al. 2021). Parmi eux, les éléments Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb et Hg sont considérés comme les plus dangereux pour l'environnement à cause de leur toxicité, leur persistance ainsi que leur bioaccumulation (Biswas et al. 2021). La demi-vie des métaux lourds est estimée à des centaines voire des milliers d'années. Le cuivre est l'élément qui a l'une des plus longues demi-vies et celui-ci est beaucoup utilisé et ce dans plusieurs secteurs industriels (Czatkowska et al. 2022).

Les métaux lourds sont issus de diverses sources, ces sources peuvent être naturelles, telles que l'altération des roches ou encore le dépôt de particules dans le sol. Mais des sources anthropiques comme l'industrie, l'exploitation minière ou les rejets domestiques sont généralement à l'origine de concentrations élevées de ces polluants. Les effluents domestiques, les eaux de drainages, les dépôts atmosphériques ou encore les émissions émises par les véhicules sont les principales voies d'import des métaux lourds dans les STEU (Singer et al. 2016). Ces métaux lourds se retrouvent en grande majorité dans les eaux de surface ou dans les sédiments, ces sites deviennent alors des réservoirs environnementaux de ces éléments (Chukwu et al. 2023).

Les métaux lourds (Pb, Cu, Zn, Cd et As) sont également utilisés en tant que promoteurs de croissance chez les animaux et comme pesticides, fongicides et engrais en agriculture et

aquaculture. Ils peuvent être utilisés, dans certains pays, conjointement avec des molécules pharmaceutiques, tels que les antibiotiques. Cette exposition à ces deux substances peut augmenter la probabilité de sélection et de co-sélection de la résistance aux antibiotiques (Seiler and Berendonk 2012; Singer et al. 2016). C'est pourquoi l'agriculture et l'aquaculture sont les principales sources de contamination de l'eau et du sol avec des concentrations modérées à fortement toxiques, tel est le cas du mercure (Hg), du cadmium (Cd), du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) (Seiler and Berendonk 2012).

Dans les STEU les métaux lourds sont détectés à des concentrations de 2 à 4 ordres de grandeurs supérieurs à celles des antibiotiques (Seiler and Berendonk 2012). Ceci est dû au fait que les métaux ne sont pas facilement dégradés, ils génèrent ainsi une pression de sélection à long terme (Gupta, Sreerishnan, and Ahammad 2022).

Dans certains pays, plus particulièrement dans les pays à faibles et moyens revenus, il n'existe pas de législations concernant la concentration des bactéries résistantes aux métaux, des BRA, des gènes de résistance aux métaux lourds, des GRA et des intégrons dans les effluents des STEU (Gupta, Sreerishnan, and Ahammad 2022).

Néanmoins, certaines législations imposent un contrôle strict du rejet des métaux dans l'environnement, notamment dans le traitement des eaux usées industrielles. Alors que dans les stations d'épuration urbaines où l'élimination des métaux n'est pas prévue, les métaux sont retrouvés à des concentrations considérables et peuvent donc avoir un fort impact après leur rejet dans l'environnement, en particulier dans les zones impactées par les activités humaines (Di Cesare et al. 2016). La directive européenne sur l'eau a défini des substances contaminantes prioritaires, c'est le cas du cadmium (Cd), le zinc (Zn) et l'arsenic (As) (2000/60/CE ; DCE, 2000).

Certains métaux participent à certaines fonctions de la cellule, par exemple le zinc, le nickel, le chrome, le cuivre ou encore le cobalt. Mais, les métaux lourds peuvent être toxiques pour les bactéries en fonction de leur concentration mais ils n'ont pas tous la même toxicité (Seiler and Berendonk 2012).

La diversité des micro-organismes est influencée par les métaux lourds. La structure de la communauté microbienne change en fonction du gradient de stress aux métaux lourds. Les sites fortement contaminés sont caractérisés par une diversité bactérienne faible, ce qui conduit à une variation génétique réduite avec de nombreux gènes fonctionnels spécifiques, à savoir des gènes de résistance aux métaux lourds et des gènes de réduction des sulfates (Kang et al. 2013). Alors qu'une grande diversité d'espèces est observée dans les sites moins contaminés, on y retrouve principalement le groupe des  $\alpha$ -protéobactéries, des  $\beta$ -protéobactéries et des *Firmicutes* (Zhu et al. 2013).

Pour surmonter la toxicité des métaux lourds, certaines bactéries mettent en place des systèmes de défense cellulaires. La résistance aux métaux lourds est donc rendu possible par différents mécanismes, cela passe par l'efflux des métaux en dehors des cellules, la réduction de l'absorption, la séquestration des métaux ou encore la transformation de ces métaux en une forme moins toxique (Gupta, Sreerishnan, and Ahammad 2022).

Les métaux lourds, tels que Ag, Cu, Cr ou encore Cd, génèrent la production de ROS dans les cellules bactériennes, causant ainsi un stress oxydatif qui conduit à l'induction de la réponse SOS et menant à une augmentation de la perméabilité membranaire. C'est un moyen de stimuler le transfert de gènes (Lin et al. 2021).

Le co-transfert des GRA et des gènes de résistance aux métaux via les MGE a été observé dans divers environnements, tels que le sol, les sédiments et l'intestin humain, et pourrait également être un facteur déterminant pour le maintien des ARG (He et al. 2020).



Tout comme les biocides, des mécanismes de co- et cross-sélection peuvent exister. Il est fréquent de trouver simultanément dans une bactérie des gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes de résistance aux métaux mais d'après une étude réalisée sur 4 582 plasmides, le fait d'observer les deux sur le même plasmide est peu fréquent, cela représente seulement 5% des plasmides (Pal et al. 2015). L'étude d'un plasmide de multirésistance, pUUH239.2, portant des gènes conférant une résistance aux antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, tétracyclines, aminosides, macrolides, sulfamides, triméthoprim et ciprofloxacine) et aux biocides mais également des gènes conférant une résistance à l'Ag, au Cu et à l'As, montre qu'en raison du lien génétique entre les résistances, l'exposition à l'un ou l'autre de ces composés, ou à une combinaison de ceux-ci, pourrait entraîner le maintien de l'ensemble du plasmide et de toutes les résistances qui lui sont associées (Gullberg et al. 2014).

Le cas de co-résistance le mieux décrit concerne les transposons Tn21 et Tn21-like, dans lesquels se trouvent un opéron de résistance au mercure et un intégron contenant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques (Baker-Austin et al. 2006). Ce gène de résistance au mercure, nommé *merA*, a été largement étudié chez des bactéries telles que les membres des *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *E. coli*, ... et, dans la majorité des cas, il est étroitement lié à divers gènes de résistance aux antibiotiques et à des intégrons (Biswas et al. 2021). Ce gène a été décrit comme un déterminant de multirésistance par co-sélection. Mais sa présence dans des souches de la famille des *Enterobacteriaceae* isolées de milieux contaminés par différents métaux, As, Cu, Cr et Hg, n'a pas entraîné le développement de phénotypes multirésistants (Henriques et al. 2016).

Les intégrons de classe 1 semblent aussi associés au phénomène de co-sélection. En effet, ils sont souvent liés à des cassettes de gènes portant à la fois des gènes de résistance aux métaux lourds et des gènes de résistance aux antibiotiques. Dans des environnements contaminés par les métaux, ces intégrons de classe 1 confèreraient un avantage sélectif, hypothèse soutenue par le fait que l'on observe une plus forte abondance d'intégrons de classe 1 dans ces environnements (Di Cesare et al. 2016; Gupta, Sreekrishnan, and Ahammad 2022; Rosewarne et al. 2010). Des intégrons de classe 1 liés à des gènes codant pour la pompe à efflux *czcA* ont également été documentés. Cette pompe à efflux est décrite comme étant capable d'expulser les ions  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Co^{2+}$  (Seiler and Berendonk 2012). Dans l'étude de Liao et al, il a été montré que deux hydrocarbures aromatiques polycycliques (naphtalène et phénanthrène) augmentaient significativement l'abondance du gène de l'intégrase de classe 1 (*intI1*), du gène de résistance aux aminoglycosides (*aadA2*) et du gène de résistance aux sulfamides (*sulI*) dans la communauté microbienne par promotion de la conjugaison (Liao et al. 2019).

Un indicateur a été mis en place concernant la concentration minimale en métaux lourds qui est corrélée avec la détection d'une augmentation de la résistance aux antibiotiques. Il s'agit de la concentration co-sélective minimale (CCM) (**Tableau 6**). Ces CCM ont été définies pour différents compartiments environnementaux ainsi que pour les différentes méthodes de détection. Les métaux tels que Cd, Cu, Ni, Hg, Co, Pb et Zn sont retrouvés dans le milieu aquatique naturel à des concentrations qui dépassent généralement leur CCM, ce qui peut conduire à des phénomènes de co-sélection (Seiler and Berendonk 2012).

Le **Tableau 7** montre les concentrations en métaux lourds dans les milieux aquatiques.

Tableau 6 : CCM associées aux métaux lourds dans différents compartiments : eau, sédiment, sol et fumier. CCM = concentration co-sélective minimale. Adapté de Seiler and Berendonk 2012.

Échantillon	Type de CCM	Unité	Cd	Cr	Cu	Ni	Hg	Co	Pb	Zn
Eau	CCMeauCD	µg/L	0,03	/	1,5	0,29	/	0,05	0,15	19,61
	CCMeauCT	mg/L	0,11	/	/	58,7	/	/	/	/
Sédiment	CCMsedPF	mg/kg	/	/	11,6	/	/	3,3	17,4	46,1
	CCMsedPS	mg/kg	1	/	11,5	/	0,01	/	/	42,5
Sol	CCMsolPF	mg/kg	/	/	116,7	/	/	/	/	/
Fumier	CCMfumierPS	mg/kg	/	/	11,79	/	/	/	/	22,75

CCMeauCD = concentration co-sélective minimale se référant aux métaux dissous dans l'eau.

CCMeauCT = concentration co-sélective minimale se référant aux métaux totaux dans l'eau.

CCMsedPF = concentration co-sélective minimale se référant au poids frais des sédiments.

CCMsedPS = concentration co-sélective minimale se référant au poids sec des sédiments.

CCMsolPF = concentration co-sélective minimale se référant au poids frais du sol.

CCMfumierPS = concentration co-sélective minimale se référant au poids sec du fumier.

Tableau 7 : Élimination moyenne (en %) et concentration (en µg/L) de différents métaux lourds dans les milieux aquatiques, selon la littérature

Métaux lourds	Élimination moyenne (%)	Concentration dans l'eau (µg/L)		Références
Chrome (Cr)	27,1 - 63,8	Eaux usées hospitalières	4 - 14	(Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014)
		Influent	1,99 - 240	(Gao et al. 2015; Varela et al. 2014; Karvelas, Katsoyiannis, et Samara 2003; Šíma et al. 2019)
		Effluent	10 - 198	(Gao et al. 2015; Varela et al. 2014)
		Eaux de surface	0,28 - 2,6	(Gaillardet, Viers, et Dupré 2003; Turgut 2003)
Zinc (Zn)	58,3 - 93,9	Eaux usées hospitalières	0,03 - 11 550	(Orias et Perrodin 2013; Reza et Singh 2010)
		Influent	54,2 - 470	(Gao et al. 2015; Karvelas, Katsoyiannis, et Samara 2003; Šíma et al. 2019)
		Effluent	33	(Gao et al. 2015)
		Eaux de surface	0,40 - 293	(Zhen et al. 2016; Gaillardet, Viers, et Dupré 2003; Turgut 2003; Reza et Singh 2010)
Cuivre (Cu)	41,7 - 70	Eaux usées hospitalières	8,9 - 162	(Orias et Perrodin 2013)
		Influent	25,2 - 79	(Gao et al. 2015; Karvelas, Katsoyiannis, et Samara 2003; Šíma et al. 2019)
		Effluent	22	(Gao et al. 2015)
		Eaux de surface	0,53 - 3 950	(Zhen et al. 2016; Gaillardet, Viers, et Dupré 2003; Turgut 2003; Reza et Singh 2010)
Arsenic (As)	-79,1 - -236,2	Eaux usées hospitalières	<1 - 11	(Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014)
		Influent	0,94 - 4,90	(Varela et al. 2014; Šíma et al. 2019)
		Effluent	1,90 - 3,40	(Varela et al. 2014)
		Eaux de surface	0,46 - 19,53	(Zhen et al. 2016; Gaillardet, Viers, et Dupré 2003)
Cadmium (Cd)	0 - 64,2	Eaux usées hospitalières	<0,5 - 10	(Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014)
		Influent	0,10 - 10	(Varela et al. 2014; Karvelas, Katsoyiannis, et Samara 2003; Šíma et al. 2019)
		Effluent	<10	(Varela et al. 2014)
		Eaux de surface	0,04 - 300	(Zhen et al. 2016; Gaillardet, Viers, et Dupré 2003; Turgut 2003; Reza et Singh 2010)
Gadolinium (Gd)		Eaux usées hospitalières	<0,5 - 100	(Orias et Perrodin 2013)
		Influent		
		Effluent		
		Eaux de surface	0,04	(Gaillardet, Viers, et Dupré 2003)
Mercure (Hg)	66,3	Eaux usées hospitalières	0,04 - 3,30	(Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014)
		Influent	<0,05 - 0,96	(Varela et al. 2014; Hargreaves et al. 2016)
		Effluent	<0,05	(Varela et al. 2014; Hargreaves et al. 2016)
		Eaux de surface	0,01 - 0,10	(Zhen et al. 2016)
Plomb (Pb)	25,7 - 48,7	Eaux usées hospitalières	<1 - 20	(Orias et Perrodin 2013; Varela et al. 2014)
		Influent	0,75 - 441	(Gao et al. 2015; Varela et al. 2014; Karvelas, Katsoyiannis, et Samara 2003; Šíma et al. 2019)
		Effluent	<10 - 239	(Gao et al. 2015; Varela et al. 2014)
		Eaux de surface	0,079 - 120	(Zhen et al. 2016; Gaillardet, Viers, et Dupré 2003; Turgut 2003; Reza et Singh 2010)

## IV. Travaux précédents

---

Différents travaux ont été précédemment menés au laboratoire pour évaluer la résistance dans des milieux impactés par les activités anthropiques.

Les travaux de thèse de Thibault Stalder au laboratoire avaient pour objectif de déterminer l'impact des effluents hospitaliers et de la filière carnée sur la dissémination de la résistance aux antibiotiques par le suivi des intégrons de résistance. Il a montré à travers son travail que les intégrons de résistance pouvaient être utilisés comme bio-marqueurs de l'évaluation de la contribution des activités anthropiques dans la propagation de la RAM dans l'environnement. Il a également montré que, contrairement aux milieux naturels, les milieux anthropisés favoriseraient la sélection des intégrons de résistance dans les communautés bactériennes. La possibilité de dissémination de la résistance serait donc augmentée dans ces milieux et particulièrement par les activités hospitalières. L'analyse des cassettes de gènes portées par ces intégrons a mis en évidence la présence de gènes spécifiques dans les effluents hospitaliers tandis que les effluents urbains étaient caractérisés par plus de diversité. Les intégrons de résistance en tant que bio-marqueurs se sont montrés également efficaces dans l'évaluation de l'efficacité des procédés de traitements des effluents (Stalder 2012).

Dans ses travaux au laboratoire, Elena Buelow a évalué la dynamique et la relation du résistome et du microbiome avec l'exposome auquel sont soumises les bactéries dans des eaux usées urbaines, hospitalières ou dans un mélange des deux eaux. À travers des analyses multi-variées et du machine learning elle a montré l'existence d'une signature du résistome et du microbiome pour chaque type d'eau usée, qui ne variait pas dans le temps. Les résultats indiquent que les eaux usées hospitalières et urbaines forment des niches écologiques qui sont stables dans le temps mais qui diffèrent entre les deux. Ces différences entre les deux types d'eaux usées correspondraient aux différences d'exposition aux antibiotiques et aux composés de l'exposome. Ses travaux confirment que les GRA, les EGM et les intégrons sont plus abondants dans les effluents hospitaliers que dans les effluents urbains. Ses résultats montrent également que le mélange des eaux usées de l'hôpital et les eaux usées urbaines ne présentent pas plus de risque que de traiter séparément ces deux effluents. Elle a aussi démontré l'impact de l'exposome sur le microbiome et le résistome des échantillons (Buelow et al. 2020).

C'est dans la continuité de ces travaux que s'inscrit ma thèse et dont les objectifs sont décrits dans la partie suivante.

## Objectifs

---

La RAM, ayant changé la gestion des maladies infectieuses au cours des dernières années en raison de l'émergence de bactéries pathogènes multirésistantes, et étant présente à la fois chez l'Homme, chez l'animal et dans l'environnement, est complexe à évaluer. L'épidémiologie de la RAM nécessite donc d'utiliser une approche One-Health intégrant ces trois compartiments.

Dans le cadre du défi que représente le contrôle de la transmission de la RAM, il subsiste un manque de connaissances important notamment concernant la dimension environnementale. Parmi celles-ci, le rôle des conditions environnementales et particulièrement le rôle de l'exposome, de la diversité des matrices et de leur microbiome et résistome sur la transmission de la RAM est essentielle à déterminer.

De plus, à ce jour, très peu d'études de modélisation ont essayé de formaliser l'émergence, la sélection et la dissémination de la RAM dans des environnements anthropisés. Il est donc nécessaire d'élaborer de nouveaux modèles capables de relier la dynamique des différents réservoirs dans une perspective One-Health.

Enfin, à l'échelle mondiale, les voyages internationaux jouent aussi un rôle dans la dissémination de la RAM mais aucune étude ne s'est encore concentrée sur l'impact des activités touristiques dans une zone géographique spécifique avec toujours cette même approche One-Health.

C'est donc dans ce contexte One-Health que le projet ACRAS-R (AntimiCrobial Resistance trAnsmiSSion routes in Caribbean islandS : a One Health Risk analysis) a été mis en place pour tenter de combler certaines lacunes existantes. C'est un projet ANR franco-allemand mettant en collaboration différentes équipes : l'institut Pasteur de Guadeloupe, l'institut Pasteur de Paris, l'université technique de Dresden en Allemagne et l'UMR Inserm 1092 de Limoges.

Ce projet a deux objectifs principaux :

- i) Caractériser les voies de transmission de la RAM dans un continuum allant du milieu hospitalier au milieu récepteur naturel en Guadeloupe.
- ii) Analyser les conditions environnementales et sociales pour évaluer le potentiel de transmission de la RAM entre l'Homme, l'animal et l'environnement.

Pour répondre à ces objectifs, quatre campagnes de prélèvements ont été réalisées en Guadeloupe. Lieu idéal pour l'étude de la circulation des GRA et des BRA de par son insularité, la taille de sa population et les connaissances que nous avons en termes du nombre de touristes. Cette île est également similaire à la France métropolitaine pour ce qui est de la qualité du système de santé et de l'indice de développement humain.

Pour répondre au premier enjeu, une approche globale est effectuée en menant l'analyse du résistome et du microbiome à l'aide de méthodes sensibles et à haut débit.

Puis une approche plus spécifique est réalisée en se concentrant sur l'analyse des *E. coli* sensibles et des *E. coli* producteurs de BLSE. *E. coli* a été choisi comme cible car cette bactérie est généralement utilisée comme indicateur de la contamination fécale et comme marqueurs de la qualité des eaux de baignade. Les *E. coli* producteurs de BLSE permettent d'accéder à la diversité des plasmides porteurs de BLSE, les plasmides jouant un rôle majeur dans le transfert horizontal des ARG. Selon leur phénotype, BLSE ou non-BLSE, environ 1 000 isolats de *E. coli* sont ensuite séquencés par Illumina.

Afin de retracer la dissémination des plasmides et de leurs gènes BLSE à travers le continuum, de l'hôpital à l'environnement naturel récepteur, les plasmides sont analysés en termes d'organisation, de structure et de régions accessoires, ainsi que le contexte génomique du (des) gène(s) BLSE, la distribution des plasmides séquencés en fonction de la source (clinique, transport humain et animal, eaux usées, mer, ...) et la phylogénie. Pour atteindre cet objectif, les plasmides sont caractérisés en utilisant les technologies Illumina et Oxford Nanopore.

Le second enjeu va lui s'intéresser d'une part à l'analyse de l'exposome en quantifiant les antibiotiques, les biocides, certains traitements non antibiotiques et les métaux lourds dans les prélèvements d'eaux usées pour étudier l'impact environnemental.

En ce qui concerne l'impact social, c'est le tourisme qui est pris en compte dans cette étude. En effet une comparaison entre deux STEU impactées ou non par les activités touristiques est réalisée pour voir l'impact du tourisme. Ces stations sont également comparées à des échantillons de contenus de toilettes d'avions provenant principalement de France, reflétant directement le portage des gènes de résistance par les touristes.

A l'issue de toutes ces analyses l'objectif final de ce projet est de mettre en place un modèle mathématique permettant d'évaluer les hypothèses et faciliter la compréhension des mécanismes en jeu. Ce modèle prendra en compte les facteurs impliqués dans l'émergence, la sélection et la dissémination de la résistance bactérienne au sein et entre les différents écosystèmes. La sélection de la résistance par des processus tels que la multiplication cellulaire, l'effet des antibiotiques, des métaux lourds ou des biocides sur la croissance ou l'élimination des bactéries sera formalisé en se concentrant, d'une part, sur la dynamique des plasmides et des gènes de résistance, et d'autre part, sur la dynamique des *E. coli* résistants.

Cette modélisation mathématique permettra une caractérisation des processus biologiques et environnementaux qui interviennent dans la transmission et la sélection de la résistance aux antibiotiques. L'analyse permettra également d'identifier et de quantifier, au niveau des réservoirs, le rôle de l'exposome dans la sélection et la diffusion des gènes de résistance, des éléments génétiques mobiles et des bactéries résistantes. Elle évaluera aussi la contribution de la diffusion entre les réservoirs sur la dynamique de chaque réservoir.

C'est donc dans ce projet que s'inscrit mon projet de thèse sur l'étude des voies de transmission de la résistance aux antibiotiques par une approche One-Health.

Ma thèse contribue à répondre aux objectifs de caractérisation des voies de transmission et aux analyses des conditions environnementales et sociales en s'intéressant à l'analyse du résistome, du microbiome et de l'exposome dans chacun des continuum et échantillons collectés en Guadeloupe.

# **B. Matériels et Méthodes**

## I. Les campagnes d'échantillonnage en Guadeloupe

La Guadeloupe est une île située dans les Caraïbes, bordée par la mer des Caraïbes et l'océan Atlantique. D'une superficie de 1 628 km<sup>2</sup>, cette île héberge une population de 383 559 habitants (au 1<sup>er</sup> janvier 2023) (source Insee). La Guadeloupe a un indice de développement humain (IDH) proche de celui de la France Métropolitaine. Cet indice mesure les données clés du développement humain, tels que l'espérance de vie, l'éducation ainsi qu'un niveau de vie décent (<https://hdr.undp.org/>).

Le climat sur cette île est un climat tropical. On y distingue seulement deux saisons, une saison sèche qui s'entend de janvier à juin et une saison humide allant de juillet à décembre.

Quatre campagnes d'échantillonnages ont été réalisées en Guadeloupe, deux d'entre elles ont eu lieu en saison humide (Campagne 1 et Campagne 3) et les deux autres en saison sèche (Campagne 2 et Campagne 4) entre 2021 et 2023. Pour chaque campagne d'échantillonnage les prélèvements ont été réalisés 1 fois par semaine pendant 3 semaines consécutives.

On distingue deux continuums dans ces campagnes de prélèvements : un continuum hospitalo-urbain et animalier et un continuum touristique.

La **Figure 14** représente la situation géographique des lieux échantillonnés en Guadeloupe.

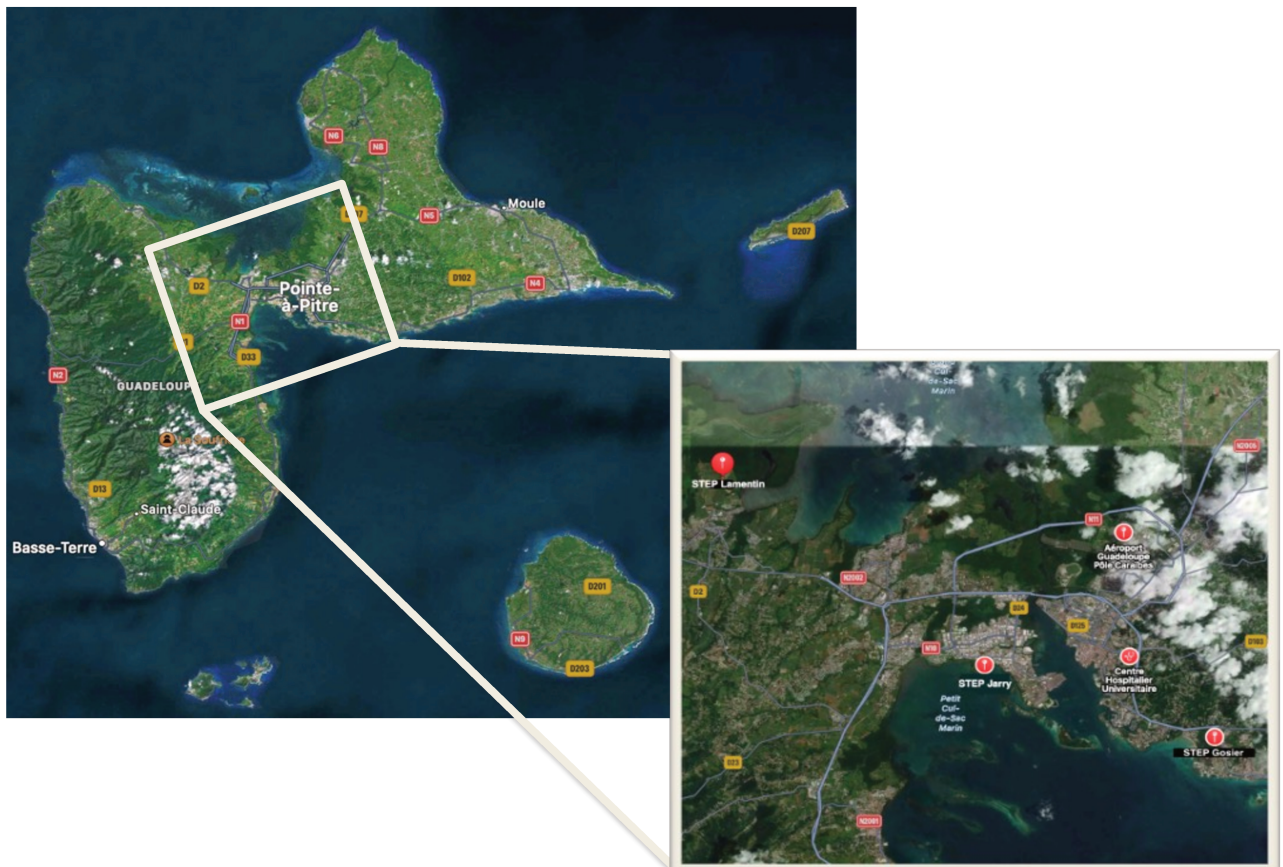


Figure 14 : Cartographie des lieux de prélèvements en Guadeloupe

## I.1. Continuum CHUG – STEU de Jarry

Sur ce premier continuum allant du Centre Hospitalier Universitaire de Guadeloupe (CHUG) à la STEU de Jarry, les prélèvements d'eau ont été réalisés dans l'effluent de l'hôpital (1), à l'entrée (2) ainsi qu'à la sortie de la STEU de Jarry au niveau du clarificateur (3) et enfin dans les effluents à la sortie de l'émissaire dans l'océan situé à 2 km de la plage (4), recevant l'effluent traité de la STEU (**Figure 15**). Les prélèvements dans les effluents de l'hôpital et à la sortie de l'émissaire dans l'océan étaient des prélèvements ponctuels tandis que les prélèvements en entrée et en sortie de STEU étaient des prélèvements de 24h réalisés à l'aide d'un préleveur automatique. Un échantillon a été récupéré pour chacun des sites une fois par semaine pendant trois semaines consécutives et ce pour chaque campagne de prélèvement, à l'exception des eaux collectées à la sortie de l'émissaire où l'échantillonnage n'a été possible que pour les campagnes 2 et 3.

La STEU de Jarry se situe dans la ville des Abymes. Elle récupère et traite les eaux hospitalières provenant du CHUG ainsi que les eaux urbaines provenant des villes de Point-à-Pitre, les Abymes et Baie-Mahault. La station a une capacité de 45 000 équivalents habitants (EH), mais elle était considérée non conforme par la Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DEAL) de Guadeloupe en 2020. La non-conformité peut être due à des équipements non-conformes et/ou de mauvaises performances épuratoires (DEAL 2020).

Dans le cadre du contexte One-Health, dans ce continuum sont également prélevés des échantillons de fèces d'animaux. Animaux vivant soit à l'intérieur de la station (anolis, cafards et crapauds (5)), soit des animaux vivant à l'extérieur de celle-ci (vaches (6)) (**Figure 15**). Cinq individus par espèce animale ont été prélevés pour chacune des campagnes et sur une seule semaine. Les anolis et les crapauds ont été capturés dans l'attente de récupérer leur fèces puis ils ont été relâchés, les cafards ont été capturés et disséqués afin de récupérer leur intestin et pour les vaches, les fèces ont été récupérées sur le sol à proximité des différents individus.



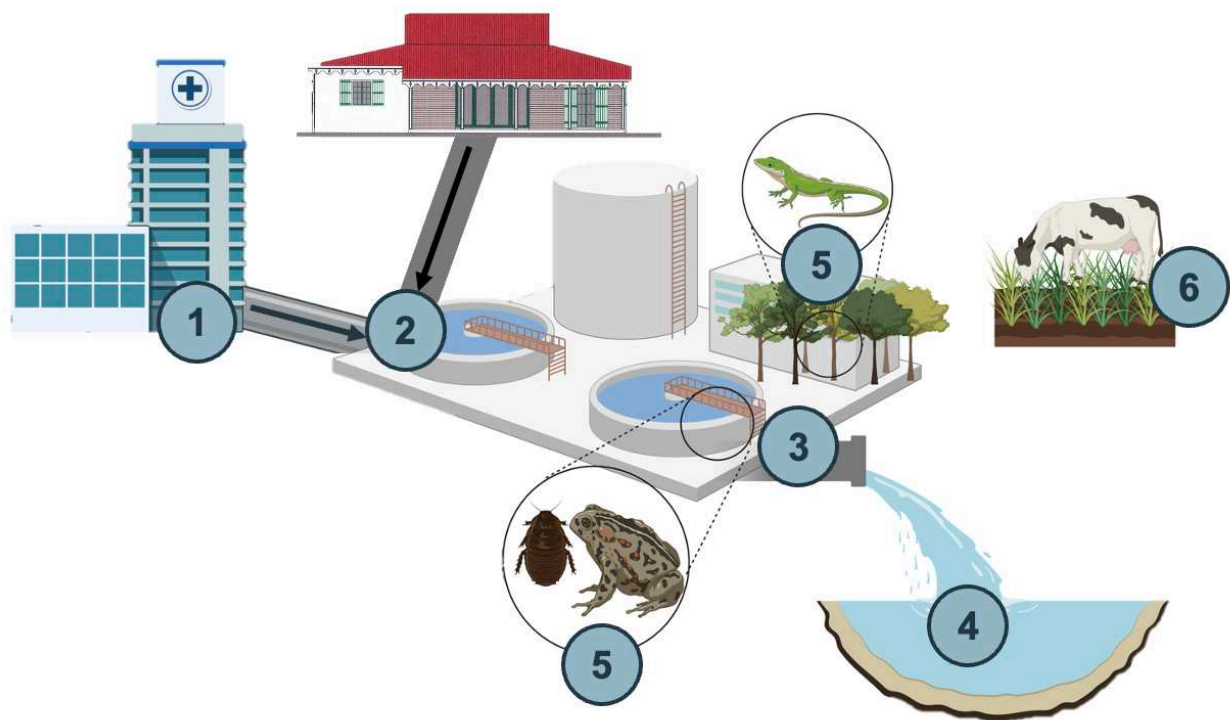


Figure 15 : Représentation schématique du continuum Hôpital-Jarry avec les points de prélèvements : eaux usées hospitalières (1), entrée (2) et sortie (3) de la station d'épuration de Jarry, océan (4), les animaux vivant dans (5) et en dehors de la station d'épuration (6).

## I.2. Continuum touristique et non-touristique

Pour le continuum touristique/non-touristique nous nous sommes intéressés à 2 villes ayant un niveau touristique différent ainsi qu'aux avions.

Les effluents des toilettes d'avions des compagnies aériennes Air France, Corsair et Air Caraïbes provenant de France Métropolitaine ont été collectés, à hauteur de 5 avions par semaine pendant trois semaines consécutives pour chacune des campagnes, représentant au total 15 avions par campagne (14) (**Figure 16**). Les effluents ont été collectés à l'arrivée de l'avion lors de la vidange des camions-citernes récupérant le contenu des toilettes des avions.

Les toilettes des avions utilisent un système d'aspiration. Les toilettes sont reliées par un système de tuyauterie à un réservoir d'eaux usées qui permet le stockage des déchets. Un produit « bleu », composé d'un germicide à base d'ammonium quaternaire et d'éthylène glycol comme antigel, est ajouté dans les toilettes pour empêcher le développement des microorganismes. Le processus de stockage des déchets est effectué de sorte à maintenir des conditions sanitaires optimales. Les réservoirs sont fermés de façon hermétique et équipé de dispositifs de sécurité pour éviter les fuites. Un système de pompage est présent pour évacuer l'air du réservoir afin de le maintenir sous vide. Les déchets sont stockés pendant toute la durée du vol et, à l'arrivée à l'aéroport, les réservoirs sont vidés et les effluents sont introduits dans le système de traitement des eaux usées.

Des prélèvements ponctuels ont ensuite été réalisés, une fois par semaine pendant trois semaines consécutives, dans les eaux du poste de refoulement (10) situé dans une ville avec une forte activité touristique, Le Gosier, qui est l'une des principales destinations touristiques de

Guadeloupe. Cette station balnéaire possède le plus grand nombre d'hébergements en Guadeloupe. Le taux d'occupation des hôtels dans cette ville est d'environ 57% en saison sèche et 56% en saison humide, ce qui représente bien la population touristique, en plus des avions. Le poste de refoulement reçoit les eaux usées provenant des hôtels situés dans la ville du Gosier. Il utilise une pompe pour remonter les eaux usées lorsque l'écoulement gravitaire n'est pas possible.

La STEU à laquelle le poste de refoulement est raccordé a aussi été échantillonnée au niveau de l'entrée (11) et de la sortie dans le clarificateur (12) sous forme d'un échantillon composite de 24h. La STEU du Gosier récupère les eaux usées de la ville de Gosier, comprenant les eaux usées provenant des habitations mais aussi des hôtels et également des eaux usées de petites cliniques traitant des patients atteints, en particulier, de maladies rénales, cardiovasculaires et diabétiques. Elle a une capacité de 15 000 EH, mais elle est elle aussi considérée non conforme par la DEAL.

À la fin de ce continuum touristique, des échantillons d'eau ont été prélevés de manière ponctuelle au niveau de la mangrove (13) recevant les eaux traitées de la station.

En comparaison de cette ville touristique, nous avons également prélevé des échantillons d'eaux usées dans la ville du Lamentin, qui est une zone rurale avec une faible activité touristique. Des prélèvements de 24h ont été réalisés en entrée (7) et en sortie (8) de STEU au niveau du clarificateur, à l'aide de préleveurs automatiques, à raison d'une fois par semaine pendant trois semaines consécutives pour chacune des campagnes. La STEU du Lamentin reçoit les eaux urbaines de la ville du Lamentin uniquement. La capacité de cette station est de 4 000 EH, contrairement aux deux autres elle est considérée conforme par la DEAL. Enfin, des échantillons de la mangrove (9) recevant les eaux traitées de la STEU ont également été collectés de façon ponctuelle.

Le continuum touristique et non-touristique est représenté sur la **Figure 16**.

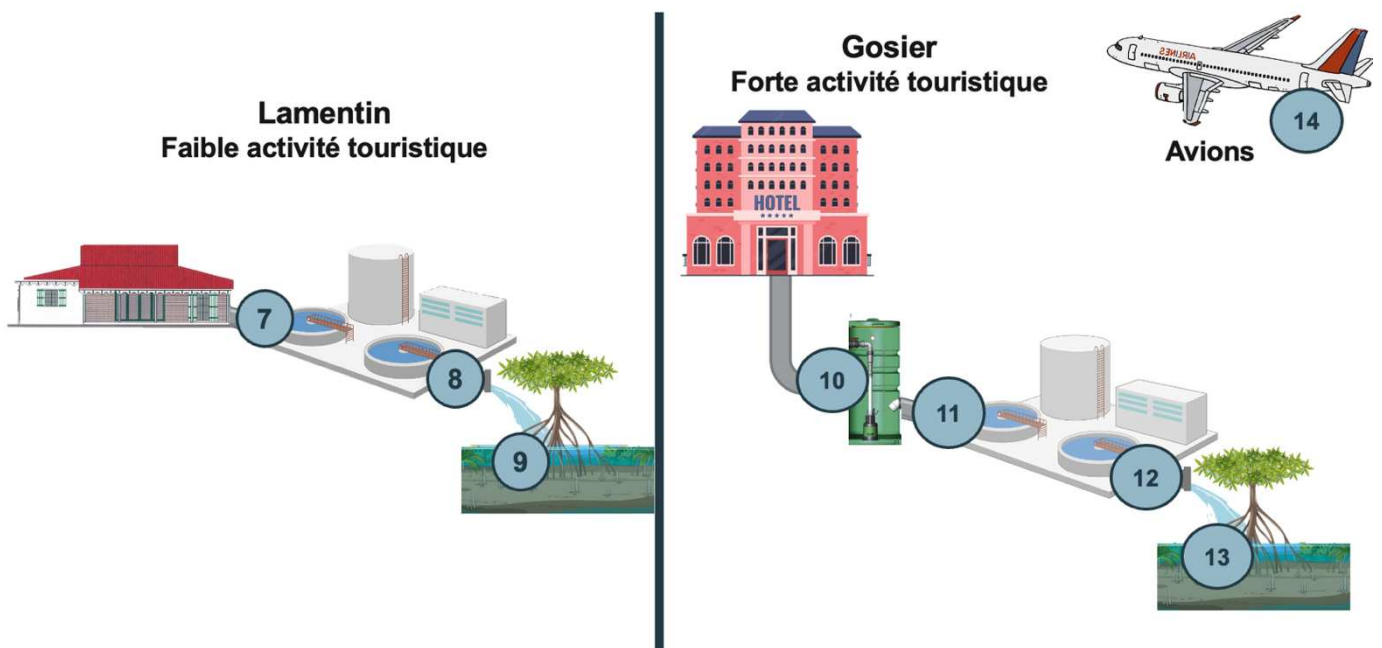


Figure 16 : Représentation schématique du continuum touristique avec à gauche le site faiblement touristique du Lamentin et à droite le site touristique du Gosier et les avions. Les différents points de prélèvement sont aussi représentés : en entrée (7) et en sortie (8) de la STEU du Lamentin, dans la mangrove (9), dans le poste de refoulement (10), en entrée (11) et en sortie (12) de la STEU du Gosier et dans la mangrove (13).

## II. Extraction d'ADN

Les échantillons d'eau ont été filtrés en Guadeloupe, en triplicat, en utilisant une rampe de filtration et des filtres de 47mm de diamètre avec une taille de pore de 0,45µm (Sartorius) et les échantillons de fèces ont été reçus bruts. Les filtres et fèces ont été stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. L'ADN des filtres ainsi que celui des fèces ont été extrait en utilisant des kits d'extraction. Pour les filtres des échantillons d'eau l'extraction d'ADN s'est faite avec le kit DNeasy PowerWater (Qiagen®) en suivant les instructions données par le fabricant. Pour les fèces c'est le kit Samag Tissu qui a été utilisé en suivant les instructions données par le fabricant. La concentration des échantillons a été mesurée par Qubit avec utilisation du kit dsDNA BroadRange (Invitrogen®) en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons ont ensuite été dilués ou concentrés pour obtenir une concentration finale de 10ng/µL pour la suite des analyses. Les ADN ont été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

## III. Analyse de l'exposome

L'analyse de l'exposome a été réalisée sur les eaux usées de l'hôpital, les eaux usées du poste de refoulement, les échantillons d'entrée et de sortie des trois STEU et sur les échantillons à la sortie de l'émissaire dans l'océan et dans les deux mangroves. Un seul échantillon d'eau a été analysé pour chaque semaine pour chacune des campagnes de prélèvement et ce pour chacun des échantillons collectés.

### III.1. Molécules antibiotiques, non-antibiotiques et biocides

Des antibiotiques, biocides et molécules non-antibiotiques ont été mesurés après extraction en phase solide (SPE) suivi d'une chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS). Cette méthode a été développée en collaboration avec l'unité toxicologie biologique et médico-légale du CHU de Limoges. Au total vingt molécules ont été sélectionnées, comprenant 8 antibiotiques (ciprofloxacine, ofloxacine, azithromycine, érythromycine, sulfaméthoxazole, sulfaguanidine, sulfathiazole, triméthoprime), 9 biocides (pyriméthamine, albendazole, flubendazole, thiabendazole, acéphate, lévamisole, pyrantel pamoate, tébuconazole et sulfoxaflor) et 3 anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) (ibuprofène, kétoprofène et diclofénac). Ces molécules ont été décrites dans la littérature comme étant des facteurs de sélection de la résistance et de co- et cross-résistance (Singer et al. 2016).

Une solution fille à 10 mg/L de toutes ces solutions a été préparée ainsi qu'une solution pour les étalons internes à 50 µg/L, par dilution des solutions mères dans du méthanol. Les deux étalons internes utilisés sont le mébutamate et le phénobarbital.

Les gammes d'étalonnage et la préparation des échantillons ont été réalisés selon le protocole suivant :

Tableau 8 : Gamme d'étalonnage pour la méthode de SPE

	Blanc	1 ng/L	5 ng/L	10 ng/L	50 ng/L	100 ng/L	500 ng/L	Échantillon
Volume eau ou échantillon	5	5	5	5	5	5	5	5
Solution fille à 100 µg/L (µL)	/	/	/	/	/	/	25	/
Solution fille à 10 µg/L (µL)	/	/	/	/	25	50	/	/
Solution fille à 1 µg/L (µL)	/	5	25	50	/	/	/	/
Etalons internes (Mébutamate et phénobarbital) à 50 µg/L (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50

### III.1.1. Extraction en phase solide

La technique d'extraction en phase liquide a été réalisée à l'aide d'un manifold sous vide. Cinq mL des échantillons ont été chargés sur des cartouches de type Oasis HLB 3cc (60 mg) (Waters, Milford, USA) préalablement conditionnées avec 2 mL de méthanol puis 2 mL d'eau. Les cartouches ont ensuite été rincées avec 3 mL d'eau et séchées sous vide pendant 15 min. L'étape d'élution a été réalisée premièrement avec 3 mL de méthanol, pour décrocher les composés neutres à basiques, puis par un mélange composé de méthanol et d'acétonitrile (20/80, v/v) dans 2% d'ammoniaque, afin de décrocher les composés acides. Les éluats sont ensuite évaporés à sec et les résidus secs sont reconstitués dans 90µL de mélange d'acide formique et d'acétonitrile (90/10 ; v/v) et 20 µL sont injectés dans l'appareil de LC-MS. Le **Tableau 9** recense les paramètres utilisés pour la mise en place de la méthode de SPE.

Tableau 9 : Paramètres de la méthode de SPE

Appareil	Manifold sous vide
Type de cartouches	Oasis HLB 3cc, 60mg (Waters)
Conditionnement	2mL de méthanol + 2 mL d'eau
Volume chargé par cartouche	5mL
Séchage de la cartouche	N2
Volume d'élution	90µL reprise formiate et acétonitrile (90/10 ; v/v)

### III.1.2. Méthode de LC-MS pour la détection des molécules de l'exposome

Le matériel utilisé pour la LC-MS est composé de deux pompes de chromatographie LC-30 AD fournies par Shimadzu (Marne-la-vallée, France) ainsi qu'un passeur automatique d'échantillon SIL-30AC. Les pompes fonctionnent en gradient haute pression avec un débit constant de 200 µL/min dans la colonne. Une pompe délivre du tampon formiate d'ammonium 2 mM, pH 3,0 ; l'autre pompe délivre un mélange composé de 90% d'acétonitrile et de 10% de tampon formiate d'ammonium 2 mM, pH 3,0. La colonne utilisée est de type HALO C18 50 x 2,1 mm de AMT.

Cette colonne a une granulométrie de 2,7  $\mu\text{m}$  et elle possède un greffage de type C18. Le volume d'injection est de 20  $\mu\text{L}$ .

Le spectromètre de masse utilisé est le modèle 5500 QTRAP (SCIEX, Toronto, ON, Canada). Il est constitué d'une source d'ionisation à pression atmosphérique de type electrospray et d'un triple quadripôle.

Les paramètres de cette méthode sont décrits dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Paramètres de la méthode de LC-MS

Appareil	5500 QTRAP (Sciex)		
Colonne	HALO C18 (AMT)		
Température du four	30°C		
Volume d'injection	20 $\mu\text{L}$		
Phase mobile	Pompe A : tampon formiate d'ammonium 2mM, pH 3,0 Pompe B : 90% acétonitrile + 10% tampon formiate d'ammonium 2mM, pH 3,0		
Débit	200 $\mu\text{L}/\text{min}$		
Gradient	Temps (min)	A (%)	B (%)
	0,01	90	10
	1	90	10
	6	5	95
	7	5	95
7,5	90	10	
Durée de l'analyse par injection	15 min		

L'ensemble des transitions retenues pour chacune des molécules est regroupé dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 : Molécules ciblées ainsi que leurs temps de rétention (en min) et les transitions de quantification et de confirmation des molécules. EC = Énergie de collision

		Temps de rétention (min)	Transition de quantification - rapport m/z (EC)	Transition de confirmation - rapport m/z (EC)
Antibiotiques	Ciprofloxacine	3.4	332.054 > 231 (45)	332.054 > 314 (29)
	Ofloxacine	3.4	362.3 > 260.9 (37)	362.3 > 344.1 (29)
	Azithromycine	3.8	375.299 > 83 (41)	375.299 > 158.1 (29)
	Erythromycine	4.3	734.184 > 158.2 (37)	734.184 > 576.4 (29)
	Sulfaméthoxazole	3.8	254 > 188 (19)	254 > 108.1 (39)
	Sulfaguanidine	0.9	214.941 > 92 (31)	214.941 > 108 (29)
	Sulfathiazole	2.3	255.897 > 155.9 (19)	255.897 > 92.1 (39)
	Triméthoprime	2.6	291.1 > 123.1 (33)	291.1 > 230 (35)
Biocides	Pyriméthamine	3.9	248.957 > 177 (39)	248.957 > 198.1 (53)
	Albendazole	4.6	266 > 234 (27)	/
	Flubendazole	4.7	313.96 > 282.1 (31)	313.96 > 123.1 (47)
	Thiabendazole	3.5	202.05 > 175.1 (31)	202.05 > 131.2 (47)
	Acéphate	1.0	183.99 > 142.9 (11)	183.99 > 94.9 (31)
	Lévamisole	1.8	204.938 > 178 (29)	204.938 > 122.9 (39)
	Pyrantel pamoate	2.8	206.926 > 150.1 (41)	206.926 > 136 (41)
	Tébuconazole	5.8	308 > 70.11 (27)	308 > 125.03 (41)
	Sulfoxaflor	4.1	277.941 > 174 (13)	277.941 > 154 (37)
AINS	Ibuprofène	5.6	205.026 > 161 (-10)	205.026 > 159.2 (-8)
	Kétoprofène	5.2	254.985 > 209.1 (19)	254.985 > 104.9 (31)
	Diclofénac	5.6	293.719 > 250 (-14)	293.719 > 35 (-60)

### III.2. Métaux lourds

Huit métaux lourds ont été choisis et mesurés par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Dans la liste se trouve : Zinc (Zn), Cuivre (Cu), Plomb (Pb), Chrome (Cr), Gadolinium (Gd), Mercure (Hg), Arsenic (As) et Cadmium (Cd).

Le plasma, en tant que source thermique, fournit l'énergie nécessaire à l'ionisation des atomes présents dans la solution. Les ions sont ensuite triés par l'analyseur quadripolaire en fonction de leur rapport masse/charge.

Quatre étalons internes sont utilisés, il s'agit du scandium (Sc), de l'yttrium (Y), de l'indium (In) et du rhénium (Re).

Les mesures des métaux lourds ont été réalisées par l'unité toxicologie biologique et médico-légale du CHU de Limoges.

## IV. Analyse du microbiome par séquençage de l'ARNr 16S

L'analyse du microbiome a été réalisée sur chacun des échantillons lors des 4 campagnes de prélèvements, à raison d'un seul réplicat par semaine de prélèvement.

Les régions variables du gène de l'ARNr 16S (V2, V3, V4, V6-7, V8, V9) ont été amplifiées à l'aide du kit Ion 16S<sup>TM</sup> Metagenomic kit (ThermoFisher) en suivant les instructions du fabricant, avec 2 primer set : V2-4-8 et V3-6,7-9. Les amplicons ont ensuite été purifiés à partir du kit Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter<sup>TM</sup>) et quantifiés par Qubit avec le kit dsDNA BroadRange (Invitrogen<sup>TM</sup>). Puis des bibliothèques sont préparées en utilisant le kit Ion Plus Fragment Library pour AB Library Builder<sup>TM</sup> System en suivant les instructions du fabricant.

Dans le cas du contenu des toilettes d'avions, les bibliothèques des 5 avions d'une même semaine ont été poolées. Enfin le contrôle de la qualité et la quantification ont été observées au Bioanalyzer 2100 de Agilent avec le kit Agilent High Sensitivity DNA. Ces bibliothèques ont été chargées sur des puces Ion 530™ et séquencées par la technologie Ion S5 (Ion Torrent™, ThermoFisher®). L'analyse des séquences s'est faite grâce à l'utilisation du Curated MicroSEQ® 16S Reference Library v2013.1 sur le logiciel Ion Reporter Software. L'analyse des résultats s'est faite en se basant sur la région variable V3 qui a donné de meilleurs résultats.

Les résultats du séquençage des échantillons des animaux de la campagne 4 n'ont pas donné de résultats probants. Par conséquent, les résultats de cette campagne ne seront pas pris en compte dans les analyses.

Cette partie sera valorisée par un chapitre dans la série de livres « RNA Analysis – Methods and Protocols » à paraître dans la série de protocoles de la boratoire « Methods in Molecular Biology » (MiMB).

## V. Analyse du résistome par Fluidigm PCR

A partir des ADN extraits des différents échantillons, tous concentrés ou dilués à une concentration de 10ng/μL, la méthode de Fluidigm a été réalisée. Cette méthode consiste en des PCR quantitatives à l'échelle du nanolitre permettant de quantifier l'abondance relative de gènes qui confèrent une résistance aux antimicrobiens, métaux lourds et composés d'ammonium quaternaire.

Au total 95 gènes sont ciblés, parmi eux 80 gènes conférant une résistance aux antibiotiques, métaux lourds et composés d'ammonium quaternaire, regroupés en 16 classes (**Tableau 12**). Ces gènes de résistance aux antibiotiques ont été choisis car il s'agit de gènes d'intérêt clinique, souvent retrouvés dans le microbiote intestinal d'individus sains. Les gènes de résistance aux métaux lourds et aux QAC quant à eux sont décrits comme favorisant la co- et la cross-sélection des GRA dans l'environnement. Sont aussi ciblés par cette méthode 9 éléments génétiques mobiles ainsi que les gènes de l'intégrase des intégrons de classe 1, 2 et 3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*), qui sont des vecteurs importants des GRA. Des amorces universelles ont également été utilisées pour cibler le gène bactérien de l'ARNr 16S.

Tableau 1 : Classes de gènes et gènes ciblés par la méthode de Fluidigm PCR

Phénicolés	Aminosides	Bacitracine	Bêta-lactamines	Macrolides
<i>catB3, cat, cmlA1</i>	<i>aac(3)-IId, aadE, aac(6')-Ib, aadA, aac(6')-IIa, spc, aph(3')-III, aph(2'')-I(de), aph(2'')-Ib, aadB, aac(3)-Ib, strB, aac(6')-aph(2'')</i>	<i>bacA_2, bacA_1</i>	<i>cepA, cblA, cfxA, blaTEM1, blaIMP, blaAMPc, blaDHA, blaCMY-2, blaACC, blaSHV, blaVIM, blaKPC, blaIMI, blaBIC-1, blaGES, blaNDM, blaOXA-48, blaCTX-M, blaPER-1</i>	<i>ermF, ermB, ermC, ermY, mfsA, mefA_10, macB, ermX</i>
Pompes à efflux	Quinolones	Métaux lourds	QAC	Vancomycine
<i>acrA, mdtO, tolC, mdtL, mdtF</i>	<i>qnrA, qnrB, qnrS, qnrC</i>	<i>cusF, copA, copD, cadA, merA, czcA</i>	<i>qacA, qacC, qacE</i>	<i>vanA, vanB</i>
Tétracyclines	Polymyxines	Sulfonamides	Méthiciline	Triméthoprimes
<i>tetQ, tetW, tetM, tetO, tetB</i>	<i>arnA, mcr-1</i>	<i>sul1, sulA</i>	<i>mecA</i>	<i>dfrA27, dfrF, dfrB1</i>
Streptogramines	EGM	Intégrons		
<i>vatB, vatA</i>	<i>ISSW1, ISS1N, IS6_IS6100, Tp614, IS613, IS6 group, tn3_tnpA, ISEc9, incP-1</i>	<i>int1, int2, int3</i>		

L'ADN a été soumis à une étape de pré-amplification de 14 cycles à l'aide d'un mélange de 0,18 µM de l'ensemble des amorces, à l'exception des amorces de l'ARNr 16S, en combinaison avec le Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems), suivi d'une dilution au cinquième avant de charger les échantillons sur la puce 96.96 BioMark™ Dynamic Array pour PCR en temps réel (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA). Les cycles thermiques ainsi que l'analyse en temps réel ont été réalisés grâce à l'instrument BioMark et les valeurs de CT sont extraites à l'aide du logiciel d'analyse BioMark Real-Time PCR.

Les étapes de pré-amplification, chargement des puces, amplifications et analyse en temps réel ont été effectuées au laboratoire UMR Inserm 1282 de Tours, selon les instructions du fabricant, sauf la température d'hybridation qui a été modifiée à 56°C. La liste des amorces utilisées est en **Annexe 1**.

Trois répliques techniques sont réalisés pour chaque couple d'amorces.

L'abondance relative de chaque gène est ensuite calculée par rapport à l'abondance du gène de l'ARNr 16S par la formule du  $2^{\Delta CT} = (2^{(Ct_{GRA} - Ct_{ARNr16S})})$ . Puis la somme des gènes appartenant à une même famille est calculée en additionnant leur abondance relative.

## VI. Détermination du risque de l'exposome sur la résistance

L'efficacité d'élimination de chacune des STEU pour chacun des composés a été calculé en tenant compte de la concentration en entrée ( $C_{entrée}$ ) et de la concentration en sortie ( $C_{sortie}$ ) de la STEU, avec la formule suivante :

$$Efficacité\ d'\ élimination = \frac{C_{entrée} - C_{sortie}}{C_{entrée}} \times 100$$

Pour déterminer le risque environnemental de la présence des composés les concentrations ont été comparées aux concentrations prédites sans effet (PNEC).



Les PNEC pour la sélection de la résistance ont été obtenues à partir de la publication de (Bengtsson-Palme and Larsson 2016). Les PNECenv ont été calculées en fonction des valeurs de EC50 trouvées dans la littérature et divisées par le facteur approprié conformément au « Technical Guidance Document on Risk Assessment ».

Le risque pour l'environnement a été estimé à l'aide du quotient de risque calculé en divisant la concentration maximale mesurée dans l'environnement (MECmax) par la PNECenv correspondante.

$$RQ = \frac{MECmax}{PNECenv}$$

Où  $RQ < 0.1$  représente un risque minimal,  $1 > RQ \geq 0.1$  un risque modéré et  $RQ > 1$  un risque élevé.

## VII. Analyses biostatistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R studio v2023.06.0. La significativité a été testée à l'aide du test non-paramétrique Mann-Whitney avec un niveau de significativité de 95%.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour la recherche de combinaisons linéaires entre les différentes variables (exposome, microbiome et résistome) à l'aide du logiciel R studio v2023.06.0 et du logiciel Shaman pour les données de microbiome (Volant et al. 2020).

Une analyse de partitionnement de variation a été réalisée pour évaluer quel groupe de l'exposome mesuré (antibiotiques, AINS, biocides et métaux lourds) explique la plus grande part de la variation du résistome et du microbiome et déterminer si la combinaison de ces groupes aurait une plus grande influence sur les données qu'individuellement. Cette analyse a été faite avec le logiciel R studio v2023.06.0 avec le package vegan.

La visualisation du réseau de gènes de résistance d'intérêt partagés entre les échantillons a été réalisée avec le logiciel Gephi.

Enfin, les corrélations entre les concentrations d'antibiotiques et l'abondance relative des GRA correspondants ont été établies à l'aide du test de Pearson. Les différences ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ .

# C. Résultats

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de caractériser les voies de transmission de la RAM et d'analyser les facteurs environnementaux et sociaux afin de déterminer le potentiel de transmission de la RAM sur l'île de la Guadeloupe en utilisant une approche One-Health.

Les résultats se déclinent en trois parties. Une première partie s'intéressant à la caractérisation des différents continuums en termes d'exposome, de microbiome et de résistome. Cela a pour objectif de faire un état des lieux de la résistance et de la contamination de l'environnement par les molécules de l'exposome en Guadeloupe. La seconde partie porte sur l'évaluation de l'impact de divers facteurs sur la RAM, analysant l'influence de la pandémie de Covid-19, de la saisonnalité, de l'exposome et du tourisme. Et pour finir une conclusion sur l'approche One-Health utilisée dans le cadre de cette étude afin de faire un bilan des voies de transmission possibles.

Les résultats seront discutés dans la **Partie D. Discussion**.

## **I. Caractérisation de l'exposome, du microbiome et du résistome de la Guadeloupe**

### **I.1. Analyse de l'exposome**

L'exposome est défini dans ce travail comme l'ensemble des composés auxquels les bactéries sont exposées dans l'environnement. La présence de ces composés a notamment été identifiée dans la sélection de GRA et dans le transfert horizontal de ceux-ci (Singer et al. 2016).

Afin d'estimer l'exposome dans les différents échantillons d'eaux, certains composés pharmaceutiques et chimiques ont été sélectionnés et détectés dans les eaux. Parmi eux, des antibiotiques, des molécules pharmaceutiques non-antibiotiques qui sont des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), des biocides ainsi que des métaux lourds.

#### **I.1.1. Continuum CHUG – STEU de Jarry**

Le continuum CHUG – STEU de Jarry, composé de l'hôpital, la STEU de la ville de Jarry recevant les eaux usées urbaines et hospitalières et l'océan, a été identifié afin de suivre une transmission potentielle de la résistance en partant du milieu hospitalier jusqu'au milieu récepteur naturel qui est l'océan. A ce continuum s'ajoutent les animaux locaux, permettant de suivre l'éventualité d'une transmission à la faune, dans une vision One-Health de la transmission (**Figure 17**).

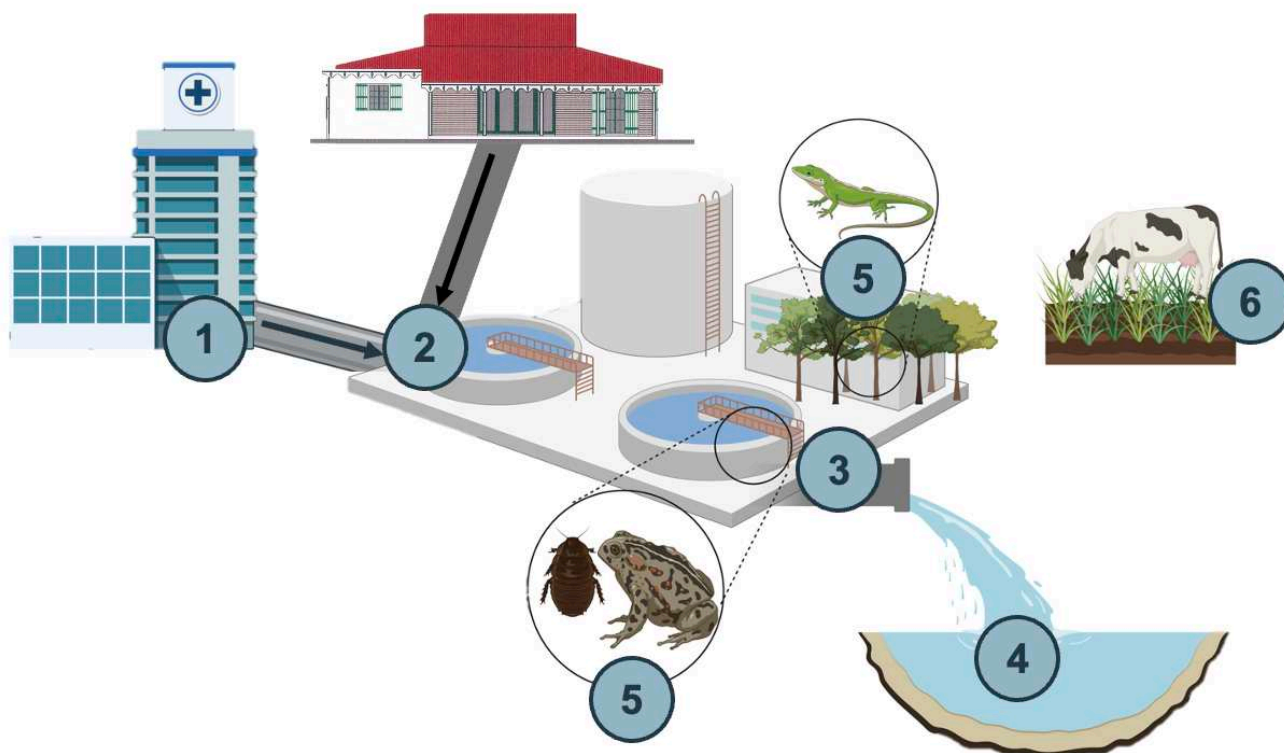


Figure 17 : Représentation schématique du continuum Hôpital-Jarry avec les points de prélèvements : eaux usées hospitalières (1), entrée (2) et sortie (3) de la STEU de Jarry, émissaire dans l'océan (4), les animaux vivant dans (5) et en dehors de la station d'épuration (6).

La concentration totale de chacune des catégories de composés de l'exposome mesurés dans les échantillons d'eau du continuum CHUG – STEU de Jarry par LC-MS et ICP-MS a été calculée en sommant les concentrations de chacune des molécules incluses dans chacune des catégories, pour chaque semaine de prélèvement et pour chaque campagne. La moyenne des concentrations des trois semaines a ensuite été calculée et est représentée en **Figure 18**.

Globalement, la concentration totale d'antibiotiques est beaucoup plus élevée dans les échantillons de l'effluent de l'hôpital (entre 1.1 µg/L et 3.7 µg/L) que dans eaux de l'entrée (entre 118.4 ng/L et 287 ng/L) et de la sortie de la STEU (entre 24.2 ng/L et 93.3 ng/L) et que dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan (entre 3.3 ng/L et 15.3 ng/L). L'abondance diminue entre l'entrée et la sortie de la station puis entre la sortie et l'émissaire dans l'océan où les concentrations sont faibles. Des différences significatives sont observées entre les campagnes 1 et 2 ( $p < 0.01$ ), entre les campagnes 1 et 4 ( $p < 0.01$ ), entre les campagnes 2 et 3 ( $p < 0.01$ ) et entre les campagnes 3 et 4 ( $p = 0.04$ ) au niveau des eaux usées de l'hôpital. Ces différences ayant lieu à chaque fois entre deux saisons différentes, la saisonnalité pourrait avoir eu un impact sur l'exposome. Mais il n'y pas de différences significatives entre les quatre campagnes de prélèvements pour les eaux de l'entrée et de la sortie de la STEU et entre les campagnes 2 et 3 dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan ( $p > 0.05$ ).

Concernant les AINS, ils sont également globalement significativement plus abondants dans les eaux du CHUG dans la campagne 1 ( $p < 0.01$ ), puis leur concentration diminue à l'entrée de la station puis à la sortie. C'est notamment dans les échantillons d'eaux usées de l'hôpital que l'on retrouve la plus forte concentration totale (4.1 µg/L). Dans le cas de la campagne 2, la

concentration augmente au fil du continuum, à l'exception des eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan où la concentration est très faible (8.6 ng/L). En campagne 3, les concentrations sont similaires ( $p > 0.05$ ) entre les eaux usées de l'hôpital et l'entrée de la station, avec des valeurs de 1.2 µg/L et 1.3 µg/L respectivement. La concentration totale diminue une fois au niveau de la sortie de la station, atteignant 0.2 µg/L mais elle est observée à de plus fortes concentrations dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan (0.3 µg/L).

La concentration totale des résidus de biocides est semblable entre l'effluent du CHUG, l'entrée et la sortie de la STEU ( $p > 0.05$ ) avec un niveau similaire entre les campagnes 1 et 2 (153.6 ng/L en moyenne). En campagne 3, c'est au niveau de l'entrée de la station que la concentration est plus élevée (562.2 ng/L) puis elle diminue en sortie et dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan, tandis que pour les eaux usées hospitalières la concentration est similaire aux campagnes 1 et 2. Dans la campagne 4 une diminution est observée le long du continuum, avec une plus forte concentration dans les eaux de l'hôpital (1.8 µg/L) et une concentration qui est la plus faible en sortie de la station (0.1 µg/L).

Pour les métaux lourds, les concentrations sont beaucoup plus élevées que les autres composés analysés, de l'ordre du mg/L. Les concentrations des métaux lourds sont étonnamment beaucoup plus faibles pour les campagnes 1 et 2 alors qu'elles sont plutôt semblables dans les 2 autres campagnes (certainement lié à des difficultés analytiques lors de la mise au point des méthodes), les résultats de ces deux premières campagnes ne seront donc pas pris en compte pour la suite. Pour les campagnes 3 et 4, la concentration totale en métaux lourds est plus élevée dans les eaux du CHUG (94.2 mg/L en moyenne) qu'en entrée et qu'en sortie de la STEU alors qu'entre ces deux sites il n'y a pas de différences significatives ( $p > 0.05$ ), les concentrations totales restant similaires (46.4 mg/L en moyenne). En revanche, les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan contiennent la concentration totale la plus élevée par rapport aux autres sites en campagne 3 (223.8 mg/L) tandis qu'elle est faible en campagne 2 (187 µg/L). Cette concentration élevée dans le point de collecte de l'océan pourrait provenir d'un apport autre que la STEU. En effet, bien que les rejets des effluents de STEU sont la principale source de contamination des eaux réceptrices, d'autres sources ont été mises en évidence telles que les activités industrielles, agricoles et portuaires (Trevizani et al. 2023; Omufere, Maseko, and Olowoyo 2022).

Plus précisément, chacune des molécules pharmaceutiques, biocides et des métaux lourds sélectionnées a été détectée au moins une fois dans chacun des échantillons de ce continuum au cours des quatre campagnes. Néanmoins, dans les échantillons des eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan, pour les campagnes 2 et 3, toutes les molécules pharmaceutiques non-antibiotiques, les biocides et les métaux lourds ont été retrouvés mais pas tous les antibiotiques. Les résidus d'antibiotiques détectés sont les résidus d'érythromycine, sulfathiazole, sulfaguanidine et triméthoprime. La concentration moyenne de chacun des résidus sur les 3 semaines de prélèvement et pour chacune des campagnes est reportée dans le **Tableau 13**.

Comme attendu, les concentrations d'antibiotiques dans les effluents sont plus élevées à l'hôpital qu'en entrée de la STEU, à l'exception de la sulfaguanidine dont les concentrations sont plus élevées en entrée pour chacune des campagnes, 10.9 ng/L, 32.2 ng/L, 10.6 ng/L et 11.3 ng/L en campagne 1, 2, 3 et 4 respectivement. La concentration de ces antibiotiques diminue ensuite en entrée de la STEU et devient encore plus faible en sortie. La STEU permet donc l'élimination d'une partie de ces résidus comme montré dans de précédentes études (Omufere, Maseko, and Olowoyo 2022). Puis dans l'environnement récepteur de ces eaux, leur concentration est nulle ou quasiment nulle, inférieure à 6 ng/L.

Les résidus de sulfaméthoxazole sont les plus abondants dans les effluents de l'hôpital avec des concentrations allant de 0.745 µg/L à 2.958 µg/L, suivis des résidus d'ofloxacin et de ciprofloxacine dont la présence pourrait être due à leur forte consommation et/ou leur dégradation lente (Liang Zhao et al. 2023). Dans le reste des échantillons ce sont les résidus d'érythromycine qui ont les concentrations les plus élevées, allant de 32.7 ng/L à 105.3 ng/L en entrée, ND à 57.4 ng/L en sortie et 1.7 ng/L à 5.7 ng/L dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan.

Concernant les résidus d'AINS, l'abondance respective des molécules recherchées diffèrent selon les campagnes. Mais dans la majorité des campagnes, pour l'effluent de l'hôpital et l'entrée de la station, le kétoprofène est l'AINS avec les plus fortes concentrations avec des concentrations maximales détectées de 2.6 µg/L dans les eaux usées de l'hôpital et 0.4 µg/L en entrée de STEU. Dans la sortie de la station c'est majoritairement le diclofénac qui est présent (0.4 µg/L maximum) tandis que dans le point collecte de l'océan c'est l'ibuprofène qui est le plus abondant avec des concentrations de 8.6 ng/L en campagne 2 et 302.6 ng/L en campagne 3.

Tous comme pour les antibiotiques, les concentrations de la majorité des biocides diminuent entre l'hôpital et l'entrée de la station puis baisse encore en sortie. Les eaux réceptrices, ici l'océan, sont encore impactés par ces résidus de biocides. En effet, une grande partie des composés mesurés sont retrouvés dans les eaux au niveau de l'émissaire dans l'océan à des concentrations allant de 0.4 ng/L (flubendazole lors de la campagne 3) à 33.7 ng/L (pyriméthamine en campagne 2). Le flubendazole est le biocide le plus abondant dans presque chacun des échantillons et chacune des campagnes, plus particulièrement dans les eaux d'entrée de station où les concentrations atteignent jusqu'à 0.4 µg/L en campagne 3.

Enfin, les métaux lourds les plus abondants sont le Zn et le Cu avec des concentrations comprises entre 0.07 mg/L et 126.1 mg/L et 0.003 mg/L et 34.7 mg/L respectivement tandis que les métaux Cd et Hg sont les moins abondants. On les retrouve principalement dans les eaux de l'hôpital et de l'émissaire dans l'océan. Le cuivre et le zinc sont notamment reconnus comme étant des agents de co-sélection associés à la résistance aux antibiotiques (Seiler and Berendonk 2012)

La présence des résidus antibiotiques, à des concentrations sub-inhibitrices pourraient entrainer la sélection de résistance aux antibiotiques. En effet, la présence de concentrations d'antibiotiques inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été montré comme exerçant une pression de sélection et induisant un plus haut taux de mutations et de transfert de gènes chez les bactéries (Monahan et al. 2021; Chow, Ghaly, and Gillings 2021). De plus, la présence des résidus non-antibiotiques, biocides et métaux lourds pourraient permettre la mise en place de phénomène de co- ou cross-sélection ou encore le transfert de gènes par transfert horizontal (Singer et al. 2016).

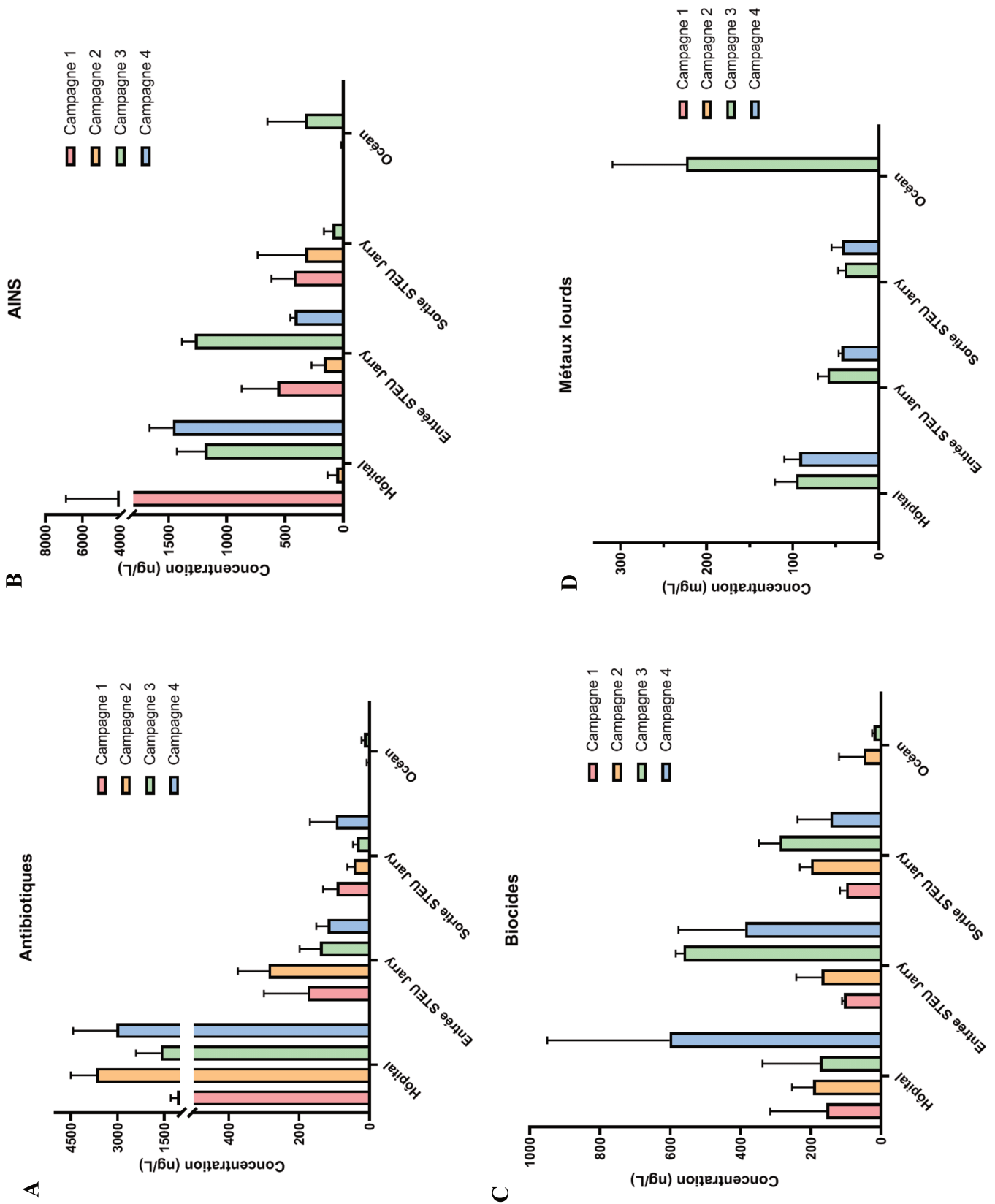


Figure 18 : Concentration totale moyenne des résidus **A.** d'antibiotiques (en ng/L  $\pm$  SD), **B.** d'AINS (en ng/L  $\pm$  SD), **C.** de biocides (en ng/L  $\pm$  SD) et **D.** de métaux lourds (en mg/L  $\pm$  SD) mesurés dans le continuum CHUG – STEU de Jarry, incluant l'hôpital, l'entrée et la sortie de la STEU collectés lors des 4 campagnes et les échantillons collectés au niveau de l'émissaire dans l'océan collectés en campagne 2 et 3. La campagne 1 est représentée en rouge, la campagne 2 en orange, la campagne 3 en vert et la campagne 4 en bleu.

	Concentrations moyennes (ng/L)																		
	Hôpital				Entrée STEU Jarry				Sortie STEU Jarry				Océan						
	Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4	Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4	Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4	Campagne 2	Campagne 3					
Antibiotiques	Ciprofloxacine	183.6 +/- 104.0	191.1 +/- 116.0	41.4 +/- 23.4	53.5 +/- 3.6	2.5 +/- 0.7	6.6 +/- 0.1	6.6 +/- 0.1	3.4 +/- 0.6	3.4 +/- 0.6	3.4 +/- 0.6	2.0 +/- 0.4	2.2 +/- 0.6	0.6 +/- 0.9	1.4 +/- 1.2	ND	ND		
	Oxotacine	537.0 +/- 245.6	555.7 +/- 495.6	259.6 +/- 312.4	343.5 +/- 25.1	13.7 +/- 6.0	15.6 +/- 5.3	15.6 +/- 5.3	6.0 +/- 1.6	30.0 +/- 10.5	30.0 +/- 10.5	9.5 +/- 1.8	8.3 +/- 3.3	3.0 +/- 4.3	7.0 +/- 4.5	ND	ND		
	Erythromycine	74.6 +/- 70.6	121.1 +/- 129.2	102.4 +/- 7.2	8.6 +/- 11.2	11.3 +/- 1.6	95.5 +/- 52.2	14.7 +/- 4.9	24.8 +/- 17.0	4.4 +/- 0.8	4.4 +/- 0.8	4.4 +/- 0.8	2.1 +/- 0.8	0.5 +/- 0.9	11.0 +/- 4.3	ND	ND		
	Sulfaméthoxazole	111.9 +/- 85.9	216.8 +/- 188.1	71.5 +/- 122.8	43.3 +/- 63.5	72.1 +/- 76.6	105.3 +/- 58.0	65.1 +/- 39.5	32.7 +/- 12.0	57.4 +/- 33.3	57.4 +/- 33.3	6.1 +/- 7.0	49.5 +/- 32.3	22.7 +/- 5.4	10.4 +/- 8.8	15.9 +/- 26.2	ND	ND	
	Sulfaguanine	2.5 +/- 0.5	15.2 +/- 2.5	4.0 +/- 2.9	5.9 +/- 6.6	10.9 +/- 5.8	32.2 +/- 9.3	10.6 +/- 1.3	11.3 +/- 12.9	6.4 +/- 2.7	6.4 +/- 2.7	8.1 +/- 1.6	7.2 +/- 6.4	7.0 +/- 6.2	0.7 +/- 1.0	0.5 +/- 0.8	ND	ND	
	Sulfathiazole	1.4 +/- 1.0	ND	ND	3.3 +/- 2.2	0.3 +/- 0.6	ND	ND	0.6 +/- 1.0	0.8 +/- 1.4	0.8 +/- 1.4	0.7 +/- 1.0	ND	ND	0.5 +/- 0.8	ND	ND		
	Triméthoprime	149.6 +/- 76.8	14.5 +/- 8.7	484.0 +/- 386.4	137.0 +/- 87.0	40.5 +/- 29.1	14.5 +/- 8.7	26.7 +/- 9.4	22.1 +/- 25.4	8.4 +/- 2.1	8.4 +/- 2.1	5.1 +/- 5.4	4.1 +/- 6.1	4.5 +/- 2.6	1.1 +/- 1.2	5.7 +/- 1.4	ND	ND	
	Ibuprofène	181.0 +/- 156.9	48.7 +/- 66.4	30.1 +/- 6.9	137.0 +/- 87.0	13.4 +/- 20.1	48.7 +/- 66.4	67.5 +/- 145.8	ND	8.8 +/- 1.5	8.8 +/- 1.5	138.5 +/- 122.3	151.8 +/- 262.9	17.4 +/- 15.2	92.9 +/- 73.9	8.6 +/- 10.0	302.6 +/- 306.2	6.6 +/- 7.2	
	Kétoprofène	2,649.7 +/- 1,768.8	86.7 +/- 75.9	260.1 +/- 144.4	1,265.0 +/- 195.5	275.3 +/- 158.9	86.7 +/- 75.9	314.0 +/- 107.2	417.1 +/- 39.5	15.7 +/- 1.3	15.7 +/- 1.3	17.4 +/- 15.2	169.0 +/- 292.6	ND	ND	ND	ND	ND	
	Diclofénac	1,288.4 +/- 1,130	30.7 +/- 26.8	897.6 +/- 443.4	180.5	276.5 +/- 82.1	30.7 +/- 26.8	285.1 +/- 42.5	ND	408.7 +/- 190.7	408.7 +/- 190.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Pyriméthamine	30.6 +/- 42.9	ND	6.6 +/- 11.5	ND	0.6 +/- 1.1	0.5 +/- 0.8	24.0 +/- 30.3	ND	6.2 +/- 3.0	6.2 +/- 3.0	ND	ND	ND	33.7 +/- 58.4	6.8 +/- 4.8	18.8 +/- 15.5	ND		
Albendazole	14.1 +/- 17.4	36.4 +/- 56.9	0.6 +/- 1.1	468.2 +/- 363.0	1.8 +/- 1.7	0.7 +/- 0.6	2.2 +/- 3.9	135.7 +/- 116.1	8.7 +/- 9.8	8.7 +/- 9.8	8.8 +/- 7.3	65.0 +/- 75.4	115.6 +/- 39.4	152.3 +/- 45.7	3.3 +/- 3.9	4.6 +/- 3.0	0.4 +/- 0.7		
Flubendazole	39.1 +/- 26.0	39.5 +/- 50.9	142.1 +/- 181.4	120.5 +/- 68.8	55.8 +/- 8.8	106.0 +/- 72.4	417.2 +/- 43.6	178.2 +/- 43.6	41.4 +/- 18.3	41.4 +/- 18.3	46.5 +/- 10.5	20.2 +/- 28.5	12.8 +/- 2.9	20.2 +/- 28.5	5.0 +/- 2.2	ND	ND		
Thiabendazole	4.2 +/- 1.3	29.4 +/- 38.4	12.4 +/- 5.7	ND	9.4 +/- 1.5	24.1 +/- 6.7	45.4 +/- 10.6	24.0 +/- 25.7	12.0 +/- 4.9	12.0 +/- 4.9	20.6 +/- 4.0	34.7 +/- 17.2	81.0 +/- 109.1	75.0 +/- 20.3	1.4 +/- 0.2	ND	ND		
Levamisole	7.4 +/- 4.8	79.3 +/- 82.7	12.9 +/- 17.2	8.9 +/- 14.0	29.0 +/- 3.0	27.7 +/- 11.0	44.0 +/- 8.8	62.1 +/- 87.8	20.6 +/- 4.0	20.6 +/- 4.0	16.1 +/- 16.4	1.2 +/- 1.1	ND	ND	1.4 +/- 0.2	ND	ND		
Pyrantel pamoate	57.0 +/- 93.2	7.8 +/- 1.6	ND	2.8 +/- 2.8	3.0 +/- 1.3	4.8 +/- 0.5	ND	2.2 +/- 0.5	5.4 +/- 1.6	5.4 +/- 1.6	10.1 +/- 6.2	12.7 +/- 7.4	2.1 +/- 2.0	ND	1.6 +/- 1.4	1.6 +/- 1.4	ND		
Tébuconazole	1.0 +/- 1.0	0.9 +/- 0.8	ND	1.8 +/- 0.5	5.1 +/- 2.3	5.0 +/- 4.0	11.4 +/- 2.3	5.4 +/- 1.3	4.0 +/- 0.9	4.0 +/- 0.9	ND	ND	ND	ND	6.0 +/- 7.3	ND	ND		
Sulfoxeflor	1.5 +/- 1.5	ND	ND	ND	0.5 +/- 0.9	ND	17.9 +/- 28.7	ND	0.4 +/- 0.7	0.4 +/- 0.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Métaux lourds	Chrome	ND	ND	790.5 +/- 44.3	1,257.1 +/- 399.5	ND	1,480.5 +/- 116.3	1,208.5 +/- 277.7	ND	ND	1,208.5 +/- 277.7	1,006.0 +/- 45.2	ND	875.3 +/- 93.8	1,006.0 +/- 45.2	787.6 +/- 126.6	ND		
	Zinc	32.4 +/- 28.2	72.4 +/- 42.4	78,269.5 +/- 25,931.5	64,209.2 +/- 9,310.3	ND	39,266.3 +/- 10,092.3	26,814.4 +/- 2,392.1	21.6 +/- 37.4	21.6 +/- 37.4	21.6 +/- 37.4	23,982.4 +/- 6,516.1	27,342.1 +/- 11,837.2	99.5 +/- 2.0	126,094.4 +/- 84,862.9	99.5 +/- 2.0	126,094.4 +/- 84,862.9	22.9 +/- 3.1	
	Cuivre	6.7 +/- 1.2	5.2 +/- 0.9	11,747.7 +/- 1,057.5	13,624.8 +/- 2,397.2	0.9 +/- 6.0	11,450.8 +/- 1,557.5	10,168.5 +/- 378.2	4.8 +/- 1.2	4.8 +/- 1.2	4.8 +/- 1.2	7,943.1 +/- 1,628.1	9,856.8 +/- 1,477.2	ND	3,500.8 +/- 2,433.7	3,132.0 +/- 1,017.8	64.3 +/- 5.4	59,385.5 +/- 15,261.8	64.3 +/- 5.4
	Arsenic	ND	ND	1,089.8 +/- 35.9	1,466.8 +/- 474.5	ND	3,698.4 +/- 1,146.1	3,573.8 +/- 802.0	ND	ND	ND	36.8 +/- 27.8	42.2 +/- 25.8	ND	ND	42.2 +/- 25.8	ND	47.0 +/- 11.4	ND
	Cadmium	ND	ND	44.1 +/- 18.3	61.1 +/- 42.7	ND	47.0 +/- 15.2	31.0 +/- 2.4	ND	ND	ND	271.5 +/- 234.2	199.5 +/- 23.6	ND	ND	13.2 +/- 2.0	ND	13.2 +/- 2.0	ND
	Gadolinium	2.5 +/- 2.5	0.1 +/- 0.0	642.1 +/- 596.4	891.63 +/- 4,956.3	ND	223.0 +/- 190.9	333.4 +/- 204.1	0.2 +/- 0.1	0.2 +/- 0.1	0.2 +/- 0.1	271.5 +/- 234.2	199.5 +/- 23.6	ND	ND	16.5 +/- 2.2	ND	16.5 +/- 2.2	ND
	Mercur	ND	ND	21.7 +/- 1.4	22.2 +/- 4.5	ND	22.8 +/- 1.1	15.2 +/- 2.8	ND	ND	ND	16.5 +/- 4.8	16.5 +/- 2.2	ND	ND	0.3 +/- 0.2	ND	0.3 +/- 0.2	ND
	Plomb	0.3 +/- 0.1	0.2 +/- 0.4	3,396.9 +/- 1,411.6	2,889.8 +/- 1,256.6	0.1	3,322.6 +/- 885.5	1,242.7 +/- 559.9	1,242.7 +/- 559.9	ND	ND	3,224.6 +/- 188.5	1,177.2 +/- 6.7	ND	ND	2,711.4 +/- 2,499.6	12.5 +/- 1.8	2,711.4 +/- 2,499.6	0.3 +/- 0.2

Tableau 13 : Concentrations moyennes des composés de l'exposome : antibiotiques, AINS, biocides (en ng/L ± SD) et métaux lourds (en µg/L ± SD), collectés lors des 4 campagnes de prélèvements dans le continuum CHUG – STEU de Jarry, incluant les échantillons de l'hôpital, l'entrée et la sortie de la STEU et l'océan, entre 2021 et 2023



### I.1.2. Continuum touristique et non-touristique

Les continuums touristiques et non-touristiques ont été définis afin d'évaluer l'impact des activités touristiques sur la dissémination de la résistance. Dans cette étude le continuum touristique est composé, dans un premier temps, des avions en provenance majoritairement de France métropolitaine, et dont le contenu des toilettes a été prélevé. S'en suit dans ce continuum la ville du Gosier, fortement impactée par l'activité touristique, avec des points de prélèvement au niveau du poste de refoulement recevant les eaux usées de la zone hôtelière, dans la STEU du Gosier et dans la mangrove réceptrice des eaux traitées de la station. Pour la partie non-touristique, la ville du Lamentin beaucoup moins impactée par le tourisme et la mangrove permettent une comparaison avec le continuum touristique (**Figure 19**).

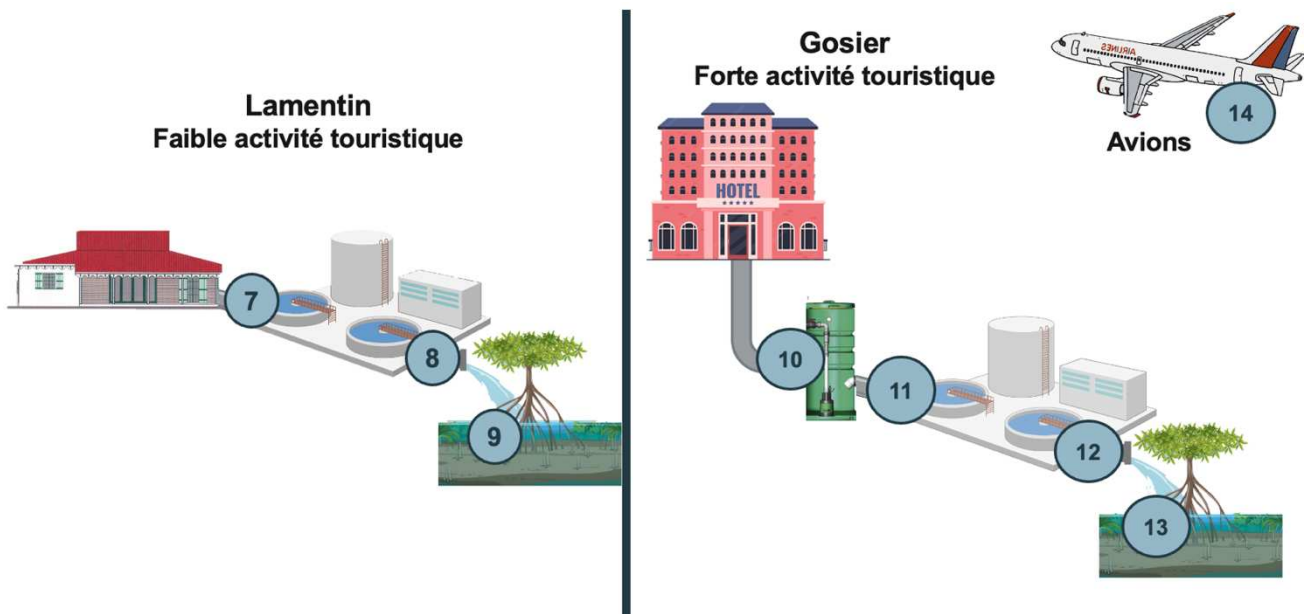


Figure 19 : Représentation schématique du continuum touristique avec à gauche le site faiblement touristique du Lamentin et à droite le site touristique du Gosier et les avions. Les différents points de prélèvement sont aussi représentés : en entrée (7) et en sortie (8) de la STEU du Lamentin, dans la mangrove (9), dans le poste de refoulement (10), en entrée (11) et en sortie (12) de la STEU du Gosier et dans la mangrove (13).

Les concentrations totales moyennes des composés de l'exposome pour les continuums du Gosier et du Lamentin sont présentées en **Figure 20**.

Si l'on compare les données de ce continuum avec le continuum CHUG – STEU de Jarry, on observe que les antibiotiques, les biocides et les métaux lourds sont retrouvés à des concentrations plus élevées dans le continuum touristique et non-touristique. Une exception est observée au niveau des eaux usées de l'hôpital qui ont des concentrations plus importantes d'antibiotiques et d'AINS que tous les autres points d'échantillonnage. Suivant la géographie les bactéries ne sont donc pas soumises au même exposome.

Globalement, dans les deux continuums, touristique et non-touristique, les résultats montrent que la concentration totale des antibiotiques est significativement plus élevée dans les eaux de l'entrée des STEU puis les concentrations diminuent après le traitement de la station puis en arrivant au niveau de la mangrove. Dans le point supplémentaire du continuum du Gosier, le poste de refoulement, la concentration totale d'antibiotiques est plus faible qu'en entrée de STEU. Les campagnes 1, 2 et 4 de ce site ont des concentrations similaires (202.8 ng/L, 240.2

ng/L et 221.5 ng/L respectivement) tandis que la concentration en campagne 3 y est plus faible (75 ng/L). En comparant les résultats entre les deux continuums, on observe qu'il n'y a pas de différences significatives ( $p > 0.05$ ) entre les sites des 2 continuums, à l'exception de la campagne 3 où les concentrations sont significativement plus élevées en entrée de STEU du Lamentin ( $p = 0.03$ ) et en sortie de cette STEU ( $p = 0.002$ ).

Les AINS ont été retrouvés à des concentrations beaucoup plus élevées dans la campagne 2 dans les 2 continuums, avec des concentrations similaires sur chacun des sites (entre 2.1 et 5.2  $\mu\text{g/L}$  en moyenne), à l'exception de la mangrove du continuum du Gosier (0.3  $\mu\text{g/L}$ ). En campagne 4 les concentrations de AINS sont plus faibles que dans les autres campagnes (moins de 169.8 ng/L). Les trois composés AINS mesurés (ibuprofène, kétoprofène et diclofénac) sont même non détectés au niveau des eaux du poste de refoulement, de l'entrée et de la sortie de la STEU du Gosier et en entrée de la STEU du Lamentin. Pour le continuum du Gosier en campagne 1, la concentration totale diminue le long du continuum, passant de 800.7 ng/L à 11.8 ng/L. La même diminution est observée le long du continuum du Lamentin passant de 918 ng/L en entrée de STEU à 242 ng/L dans la mangrove. Alors qu'en campagne 3 on constate une répartition inverse ; la concentration totale d'antibiotiques reste stable entre les eaux du poste de refoulement et de la sortie de la station au niveau du Gosier (474.7 ng/L en moyenne), et diminue au niveau de la mangrove (56.5 ng/L). Au niveau du Lamentin, la concentration diminue le long du continuum, passant de 635.9 ng/L à 150.5 ng/L.

Pour les 2 continuums, les concentrations de biocides mesurées lors des campagnes 1 et 2 sont similaires. Elles sont plus importantes dans le continuum du Lamentin que dans celui du Gosier. Pour les campagnes 1 à 3, au niveau du continuum du Lamentin, une diminution est observée entre l'entrée et la sortie puis entre la sortie et la mangrove alors qu'en campagne 4 il n'y a pas de différences significatives entre les 3 sites ( $p > 0.05$ ). Concernant le continuum du Gosier, il n'y a pas de différences significatives ( $p > 0.05$ ) entre l'entrée et la sortie de la STEU pour une même campagne, dans les eaux du poste de refoulement, la concentration est plus faible qu'en entrée dans les campagnes 1, 3 et 4. Enfin dans la mangrove la concentration est la plus faible du continuum pour chaque campagne (entre 8.2 ng/L et 60.1 ng/L).

Comme précédemment, les concentrations des métaux lourds sont étonnamment beaucoup plus faibles dans la campagne 1 alors qu'elles sont plutôt semblables dans les 3 autres campagnes. Pour la suite, les résultats de cette première campagne ne seront donc pas considérés. Pour le continuum du Lamentin il n'y a pas de différences significatives ( $p > 0.05$ ) entre les trois campagnes prises en compte. Une baisse de la concentration totale a lieu entre l'entrée et la sortie. En revanche les concentrations sont similaires entre la mangrove et les eaux de la sortie de la station (49.6 mg/L en moyenne dans la sortie et 42.9 mg/L en moyenne dans la mangrove). Dans le continuum du Gosier, les métaux lourds totaux sont moins abondants dans les eaux du poste de refoulement lors de la campagne 2 que dans l'entrée de la STEU, alors qu'ils sont présents de façon similaire en campagne 3 et plus abondants en campagne 4. Une diminution est observée suite au traitement par la station, au niveau de la sortie en campagne 2 et 3 mais les métaux sont enrichis en campagne 4 au niveau de la sortie. Dans la mangrove, la concentration totale en métaux lourds est plus élevée que dans chacun des autres sites et ce pour les campagnes 2 (165.8 mg/L) et 3 (154.2 mg/L).

Dans les échantillons collectés dans les continuums du Lamentin et du Gosier, les résidus d'érythromycine et d'azithromycine sont les résidus d'antibiotiques les plus abondants. On les retrouve à des concentrations maximales de 188.6 ng/L et 151.3 ng/L respectivement en entrée de STEU pour le continuum non-touristique et à des concentrations maximales respectivement de 259.3 ng/L en entrée de STEU et de 192.4 ng/L dans l'effluent du poste de refoulement.

Concernant les AINS, selon les campagnes, les molécules les plus abondantes diffèrent. Le kétoprofène et le diclofénac sont globalement les composés les plus retrouvés. Les concentrations sont les plus importantes en campagne 2, plus particulièrement pour l'ibuprofène et le diclofénac. En effet les concentrations sont, pour l'ibuprofène, de 1 514.3 ng/L, 648.4 ng/L et 51.1 ng/L en entrée de STEU, en sortie de STEU et dans la mangrove du continuum non-touristique respectivement, de 1 811.2 ng/L, 1 624.8 ng/L, 907.3 ng/L et 91.1 ng/L dans le poste de refoulement, en entrée de STEU, en sortie de STEU et dans la mangrove du continuum touristique. Concernant le diclofénac, les concentrations sont de 2 949.8 ng/L, 1 801.9 ng/L et 1 809.9 ng/L en entrée de STEU, en sortie de STEU et dans la mangrove du continuum non-touristique respectivement, de 871.3 ng/L, 1 906.6 ng/L, 1 995.1 ng/L et 212.9 ng/L dans les eaux du poste de refoulement, en entrée de STEU, en sortie de STEU et dans la mangrove du continuum touristique.

Le flubendazole est le biocide ayant la concentration la plus abondante que ce soit dans les échantillons du Gosier ou les échantillons du Lamentin, plus particulièrement lors des deux premières campagnes. Les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans l'entrée de la station en première campagne pour le continuum du Lamentin (1.3 µg/L) et en sortie de station en campagne 2 pour le continuum du Gosier (0.6 µg/L).

Tous les métaux lourds ont été détectés dans chacun des échantillons pour chacune des campagnes considérées. Tout comme dans le continuum du CHUG, les éléments Zn et Cu sont les plus abondants avec des concentrations moyennes pour le zinc, sur les trois campagnes prises en compte, de 64.9 mg/L en entrée de STEU, 34.3 mg/L en sortie de STEU et 26.4 mg/L dans la mangrove concernant le continuum du Lamentin. Pour le continuum du Gosier, les valeurs sont en moyenne de 69.9 mg/L, 67.8 mg/L, 40.6 mg/L et 77.9 mg/L dans l'effluent du poste de refoulement, en entrée de STEU, en sortie de STEU et dans la mangrove respectivement. Les concentrations moyennes de cuivre sont de 14.4 mg/L en entrée de STEU, 9.7 mg/L en sortie de STEU et 11 mg/L dans la mangrove du continuum du Lamentin et de 12.6 mg/L dans les eaux du poste de refoulement, 17.8 mg/L en entrée de STEU, 11 mg/L en sortie de STEU et 19 mg/L dans la mangrove au niveau du continuum du Gosier. Au contraire, dans chacun des échantillons de ces deux continnum, les éléments Cd et Hg sont le moins retrouvés avec des concentrations inférieures à 0.1 mg/L (**Tableau 14**).

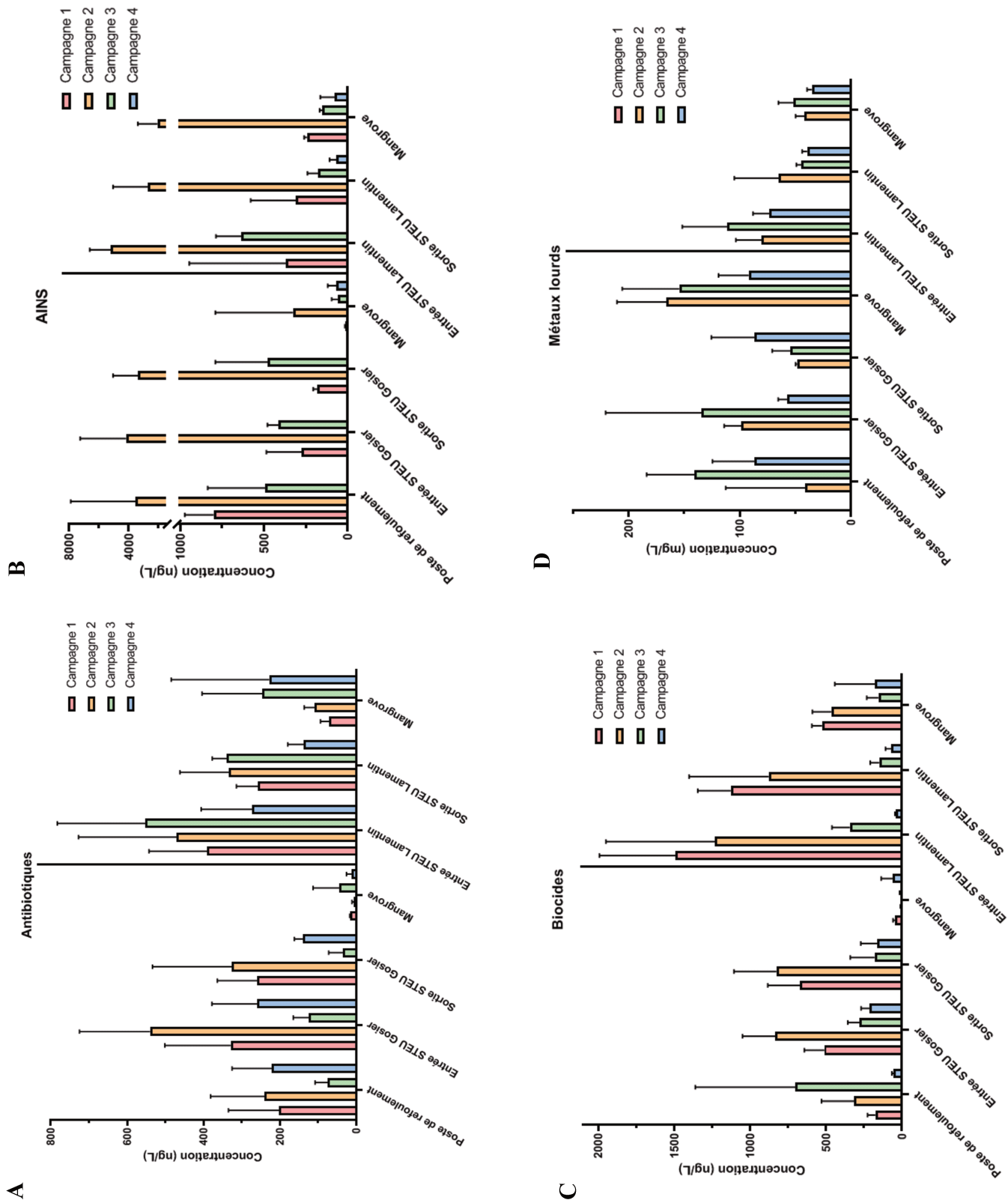


Figure 20 : Concentration totale moyenne des résidus A. d'antibiotiques (en ng/L $\pm$  SD), B. d'AINS (en ng/L $\pm$  SD), C. de biocides (en ng/L $\pm$  SD) et D. de métaux lourds (en mg/L $\pm$  SD) dans les échantillons des continus du Gosier et du Lamentin collectés lors des quatre campagnes d'échantillonnage. La campagne 1 est représentée en rouge, la campagne 2 en orange, la campagne 3 en vert et la campagne 4 en bleu.



## I.2. Analyse du microbiome

Le microbiome de chacun des échantillons a été évalué par séquençage du gène codant l'ARNr 16S, en se basant sur les résultats obtenus avec la région variable V3.

### I.2.1. Continuum CHUG – STEU de Jarry

Les résultats du séquençage montrent que les phyla majoritaires dans les échantillons du continuum allant des effluents hospitaliers à l'océan en passant par la STEU de Jarry, sont les *Pseudomonadota* (anciennement *Proteobacteria*), *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*) et *Bacteroidota* (anciennement *Bacteroidetes*). Ils représentent, en moyenne, à eux trois plus de 90% du microbiome des eaux usées du CHUG et de l'entrée de la station, plus de 70% du microbiome de la sortie de la STEU et plus de 60% des eaux de l'océan à la sortie de l'émissaire d'eaux usées traitées. Ces phyla correspondent aux phyla majoritaires qui composent le microbiote intestinal humain (Landman and Quévrain 2016).

Au niveau du genre les résultats montrent une grande diversité de bactéries présentes dans ces échantillons. La diversité alpha des genres est similaire entre les échantillons de l'effluent du CHUG, de l'entrée et de la sortie de la STEU avec en moyenne 134, 145 et 116 genres annotés respectivement. En revanche, la diversité est plus faible dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan avec seulement 58 genres.

L'abondance proportionnelle des genres les plus abondants dans chacun des échantillons du continuum est représentée en **Figure 21**.

Les trois semaines de prélèvement au sein d'une même campagne et pour les genres les plus abondants semblent stables pour l'entrée de la station de Jarry, à l'exception d'une semaine de prélèvement en campagne 2. Dans les eaux de la sortie de l'émissaire dans l'océan aussi, pour les deux campagnes, deux semaines sur trois présentent la même signature de microbiome. Pour les eaux de l'hôpital et de la sortie de la station, les résultats sont plus variables mais on distingue des similitudes avec les mêmes genres majoritaires, dans des proportions différentes. Entre les campagnes, le microbiome est également similaire pour l'entrée de la station et les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan mais moins proche pour l'effluent de l'hôpital et la sortie de la station.

Dans les eaux usées de l'hôpital, on retrouve particulièrement un mélange de bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatifs, qui sont à la fois d'origine humaine et environnementale. Quatre genres bactériens sont majoritaires ; il s'agit de *Aeromonas* (entre 3 et 26%), *Arcobacter* (entre 2 et 22%), *Faecalibacterium* (entre 1 et 12%) et *Streptococcus* (entre 2 et 13%). *Aeromonas* a notamment été décrit comme hébergeant une diversité de gènes de résistance dans les eaux usées et a également été suggérée comme un indicateur de la dissémination de la résistance au niveau des eaux usées (Hassoun-Kheir et al. 2020). Le microbiome du CHUG est plus proche au niveau microbiologique des sources brutes que sont les fèces des patients. Les communautés microbiennes évoluent ensuite au cours du parcours des eaux usées dans le réseau, passant d'une grande proportion de bactéries anaérobies strictes à une majorité de bactéries anaérobies facultatives suite au passage de conditions anaérobies à des conditions aérobies dans les eaux usées (Quintela-Baluja et al. 2019; Bengtsson-Palme et al. 2016).

En effet, dans les eaux usées arrivant à la station, le genre *Arcobacter* prend une place plus importante dans les échantillons, représentant en moyenne sur les campagnes 20.2% du

microbiome. Ces eaux usées sont majoritairement composées de bactéries environnementales. Les autres genres qui étaient les plus abondants au niveau des eaux usées du CHUG sont présents dans les eaux usées de la station mais dans de plus faibles proportions. Le milieu étant devenu aérobie, seules les bactéries capables de survivre en présence d'oxygène peuvent proliférer dans les STEU. Le traitement aérobie mis en place au sein de la station va donc permettre une réduction considérable de l'abondance des bactéries d'origine fécale. Cependant, de nombreux pathogènes étant anaérobies facultatifs, ils semblent mieux adaptés pour survivre dans les eaux usées et dans les stations d'épuration (Bengtsson-Palme et al. 2016).

Le genre *Arcobacter* est toujours un des genres les plus abondants dans la sortie de la station (9.6 % en moyenne). Selon l'origine des prélèvements, on retrouve une forte proportion des genres *Aeromonas* (dans l'effluent de l'hôpital), *Bacteroides* (dans l'effluent de la STEU), *Acinetobacter* (dans l'effluent de la STEU), *Pseudomonas* (dans l'influent de la STEU), *Polynucleobacter* (dans l'effluent de la STEU) et *Rhodococcus* (dans l'effluent de la STEU également). Dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan, les genres les plus abondants sont des bactéries marines et halophiles, ayant la capacité de survivre dans cet environnement salé. Lors des deux campagnes, le genre *Prochlorococcus* domine particulièrement les échantillons de la sortie de l'émissaire dans l'océan (59.9% en moyenne). Il s'agit d'une cyanobactérie, organisme adapté à des écosystèmes pauvres en nutriments, tel que l'océan (Vincent 2009). Le microbiome des eaux de la sortie de l'émissaire dans l'océan est peu impacté par les eaux de la station car dilué et dispersé à son arrivée dans cette étendue d'eau.

Chacun des échantillons est également composé des genres bactériens *Bacteroides* et *Prevotella*. Il s'agit de deux genres dominants dans le microbiote intestinal humain, montrant l'influence de l'homme sur la composition de ces eaux usées comme déjà décrit (Ley 2016).

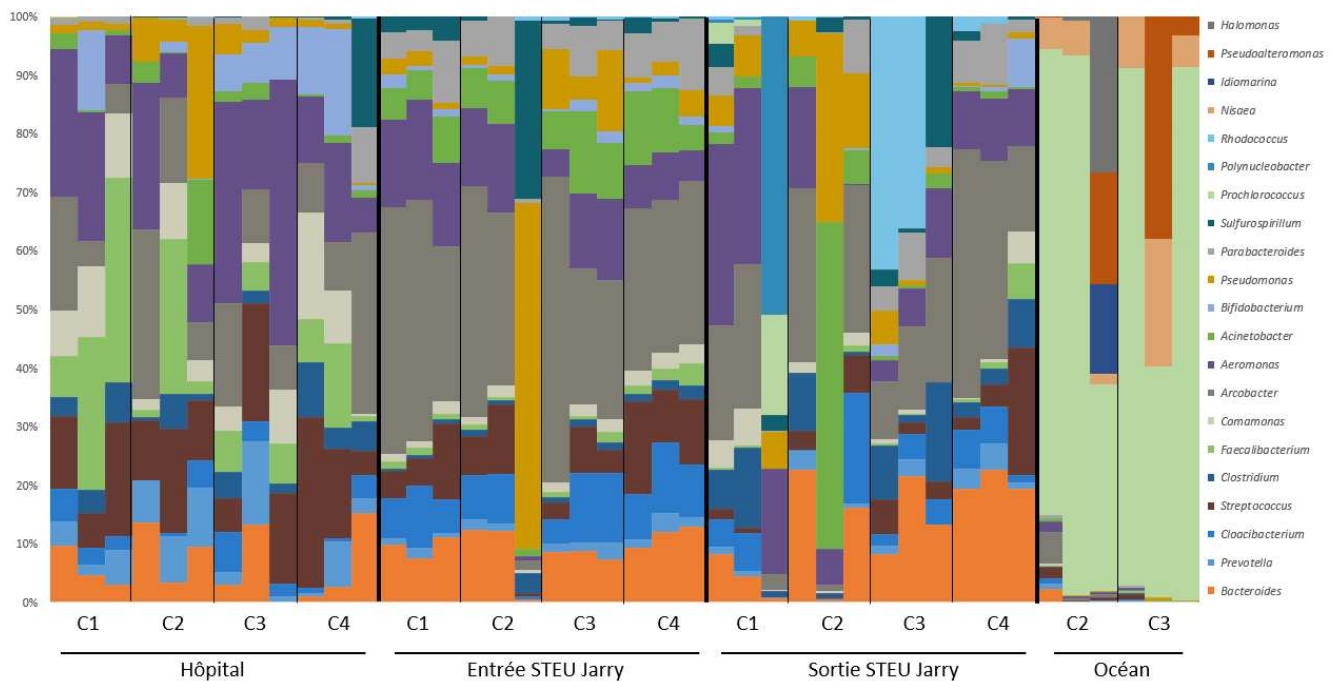


Figure 21 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons d'effluents de l'hôpital, de l'entrée et de la sortie de la STEU et à la sortie de l'émissaire dans l'océan, collectés lors des trois semaines de prélèvements des quatre campagnes entre 2021 et 2023. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3 et C4 = campagne 4



Dans notre étude, nous avons distingué deux populations d'animaux. La première population comprend les animaux vivant à l'intérieur de la station d'épuration de Jarry, incluant des cafards, des crapauds et des lézards endémiques de Guadeloupe appelés anolis. Les cafards et crapauds, de par leur habitat, sont les plus susceptibles d'être au contact direct des eaux de la station. La deuxième population recouvre les animaux vivant à l'extérieur de la station, dont font partie les vaches. Des animaux témoins, vivant loin de cette station et sans contact avec ces eaux usées, ont également été échantillonnés à des fins de comparaison. Les animaux vivant dans la station et les animaux témoins ont des habitats différents, ces habitats pouvant avoir une influence sur le résistome des animaux.

Chez les animaux, comme dans les eaux, les phyla *Pseudomonadota*, *Bacillota* et *Bacteroidota* composent majoritairement le microbiome. Ils représentent respectivement 19.7%, 41.7% et 40.2% du microbiome total chez l'anoli, 29.2%, 39.2% et 13.5% chez le cafard, 25.3%, 41.9% et 9.8% chez le crapaud et 29.6%, 30.8% et 30.1% chez la vache. Ces phyla ont déjà été retrouvés majoritairement dans d'autres études chez ces mêmes animaux (Vasconcelos et al. 2023; Dillard et al., n.d.; Williams et al., n.d.; Y. Q. Li et al. 2020; X. Song et al. 2021).

La diversité alpha au niveau du genre bactérien dans les fèces des animaux est plus faible que dans les autres échantillons. En effet, chez l'anoli le nombre d'espèces retrouvées est de 22, de 59 chez le cafard, 53 chez le crapaud et enfin 47 chez la vache.

Les résultats de l'abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants montrent des différences chez les animaux entre les campagnes de prélèvement. En effet, les cafards des campagnes 1, 3 et cafards témoins ont un microbiome similaire mais qui diffère de ce qui est observé pour la campagne 2. Il en est de même pour les anolis, le microbiome de la campagne 1 et le microbiome témoin se ressemblent tandis qu'ils sont très différents en campagnes 2 et 3.

Le microbiome des crapauds de la première campagne et témoins sont similaires, avec la même composition des genres bactériens majoritaires. Les vaches ont un microbiome différent sur chacune des campagnes. Il existe également des différences entre animaux, aucun animal n'ayant le même microbiome.

Les animaux ont au sein de leur microbiome des bactéries majoritairement anaérobies ou anaérobies facultatives provenant du microbiote intestinal des animaux. Dans le microbiome de la vache on trouve également des bactéries aérobies qui sont des bactéries environnementales et saprophytes, peut-être originaire des sols sur lesquels les fèces des vaches ont été récoltées.

Les microbiomes des anolis de la station sont caractérisés par une majorité de bactéries anaérobies du genre *Clostridium* en campagne 1 et 3 qui représentent respectivement 59.1% et 53.2% de leur microbiome complet et qui sont également majoritaires chez l'anoli témoin (38.9%), ne provenant pas de la station, tandis que le microbiome de l'anoli de la campagne 2 est composé majoritairement du genre *Bacillus* (34%). Le microbiome des cafards de la campagne 1 est plus ressemblant à celui des cafards témoins, dont le microbiome est composé principalement du genre *Enterococcus* (49.5% et 46% respectivement). Les microbiomes des fèces de cafards de la deuxième campagne sont composés majoritairement du genre *Proteus* (74.4%) tandis que ceux de la troisième campagne renferment les genres *Lactobacillus* (45.8%) et *Weissella* (31.8%). Les fèces des crapauds de la première campagne ont des microbiomes similaires à ceux des témoins avec une majorité de bactéries du genre *Clostridium* (40.9% et 25.9% respectivement) et *Bacillus* (29.9% et 22.4% respectivement). En campagne 2, le microbiome est principalement composé des genres *Enterococcus* et *Anaerorhabdus* (42.7 % et 24.9 % respectivement). Concernant les vaches la différence est plus marquée entre les campagnes. Les bouses des vaches de la campagne 1 et 2 sont plus proches en termes de microbiome, on y retrouve en commun les genres *Comamonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* et *Nocardioides*. Dans le cas de la troisième campagne, le genre *Clostridium*



est le plus abondant, représentant 74.5% du microbiome total (**Figure 22**). Ces genres majoritairement abondants chez les animaux sont différents des genres retrouvés dans les eaux du continuum CHUG – STEU de Jarry.

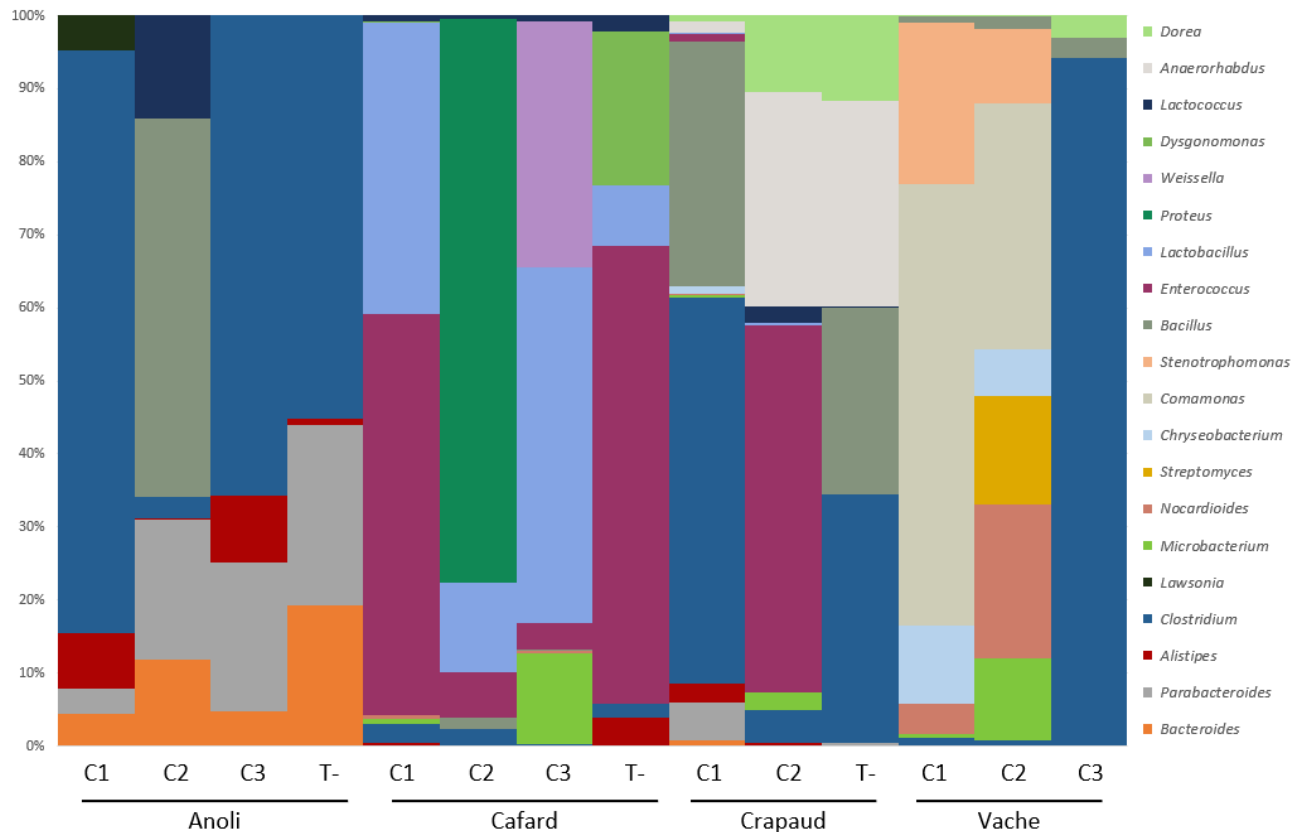


Figure 22 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons animaux (anolis, cafards, crapauds, vaches et animaux témoins), collectés lors des trois premières campagnes entre 2021 et 2022. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3, C4 = campagne 4 et T- = témoin

### 1.2.2. Continuum touristique et non-touristique

Tout comme dans les eaux du continuum du CHUG, les phyla majoritaires du microbiome des effluents collectés dans les toilettes d’avions sont *Pseudomonadota*, *Bacillota* et *Bacteroidota*. Ces trois phyla composent plus de 98 % du microbiome des échantillons des toilettes d’avions. Parmi eux, les *Bacillota* sont les plus abondants et représentent en moyenne 77.5 % du microbiome, suivi des *Bacteroidota* avec en moyenne 11.9 % et des *Pseudomonadota* avec 9.3 %. Comme dit précédemment, ces phyla correspondent aux phyla majoritaires du microbiote intestinal humain, ici ils représentent près de 100% du microbiome des toilettes d’avions, montrant l’impact de l’homme sur la constitution de ce microbiome. La diversité alpha au sein du microbiome des effluents collectés dans les effluents des avions est de 64. La diversité y est donc faible, cela pourrait être dû aux conditions strictes de la cuve recevant le contenu des toilettes car on y retrouve peu d’oxygène en raison de son herméticité et en raison de l’utilisation d’un désinfectant dans les toilettes, sélectionnant seulement les bactéries les mieux adaptées.

En effet, les bactéries retrouvées sont en très grande majorité des bactéries anaérobies, représentatives du microbiote intestinal. Par ailleurs, les réservoirs recevant le contenu des toilettes d'avions sont en conditions hermétiques et sous vide, laissant donc peu de place à l'oxygène, permettant ainsi la survie des bactéries anaérobies.

Ces bactéries sont quasiment toutes issues du microbiote intestinal humain et appartiennent en majorité au phyla des *Bacillota*. Parmi les genres les plus abondants, le genre *Atopostipes* est majoritaire, représentant en moyenne sur les 4 campagnes 18.9% du microbiome total. Peu d'informations sont disponibles sur ce genre dans la littérature.

Autre genre abondant dans les toilettes des avions, le genre *Tissierella*, plus particulièrement lors de la quatrième campagne, représentant entre 3.2 % et 31.7 % du microbiome total (**Figure 23**). Il s'agit d'une bactérie retrouvée à la fois dans le microbiote intestinal humain et dans l'environnement (Alauzet et al. 2014).

Sur les trois semaines de prélèvement les échantillons des effluents collectés dans les toilettes d'avions ont une signature du microbiome similaire. Il en est de même entre les quatre campagnes, notamment entre les campagnes 1 et 2 d'une part et les campagnes 3 et 4 d'autre part. Il ne semble donc pas y avoir de conséquences saisonnières sur la composition du microbiome.

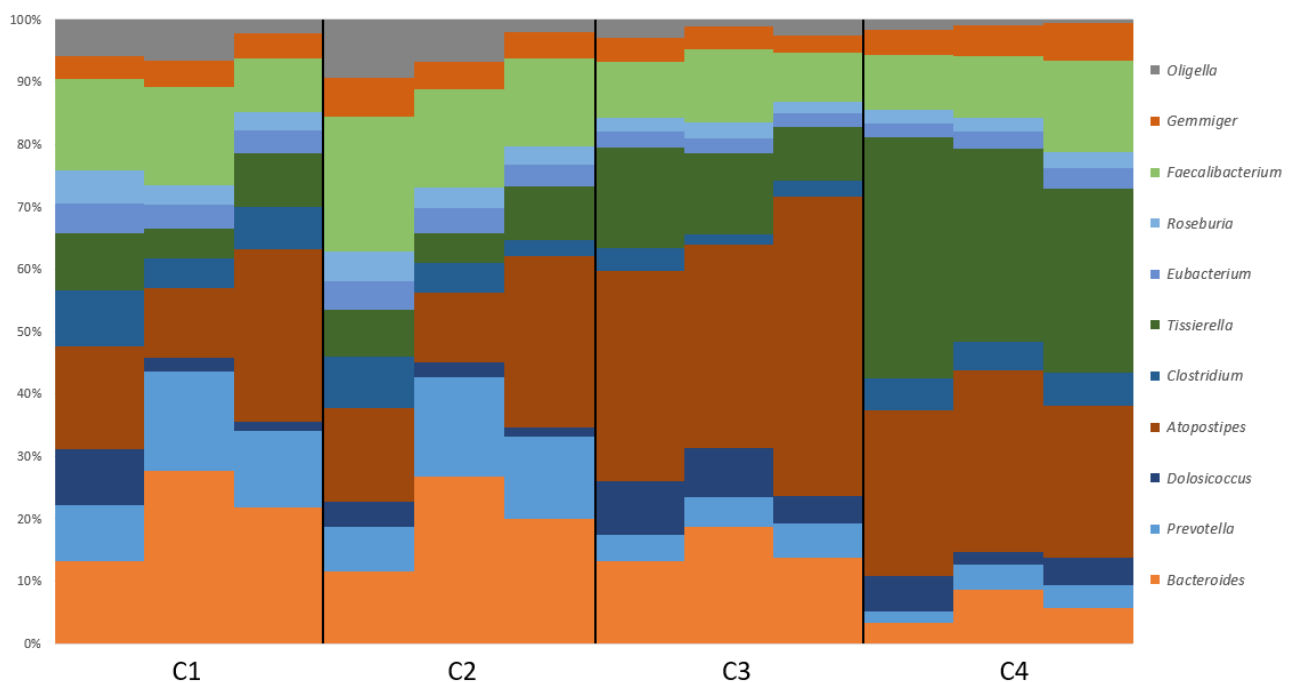


Figure 23 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons du contenu des toilettes d'avions, collectés lors des trois semaines de prélèvements des quatre campagnes d'échantillonnage entre 2021 et 2023. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3, C4 = campagne 4

Dans les échantillons de la ville du Gosier, avec une forte activité touristique, ce sont également les phyla majoritaires du microbiote intestinal humain qui façonnent le microbiome. En effet, ils représentent près de 90% du microbiome total, avec, contrairement aux toilettes des avions, une majorité de *Pseudomonadota* (52%), suivi des *Bacillota* (20,3%) et des *Bacteroidota* (15,1%).

La diversité alpha est très semblable au sein des échantillons d'eaux du poste de refoulement, de l'entrée et de la sortie de la station, étant de respectivement 120, 120 et 125. Dans la mangrove, la diversité est plus faible, elle est de seulement 76 genres. Les trois semaines de prélèvements montrent une signature du microbiome assez similaire pour chacun des sites. Entre les quatre campagnes pour un même site, le microbiome est assez semblable pour chacun des sites étudiés, excepté pour la sortie de la STEU où une plus grande variabilité des genres bactériens est observée.

Les eaux du poste de refoulement et de l'entrée de la STEU ont un microbiome très proche, ce qui montre l'influence du microbiome de l'effluent du poste de refoulement sur ce qui arrive au niveau de la station. À ces deux sites, les résultats montrent la présence de bactéries majoritairement anaérobies et à la fois provenant du microbiote intestinal (comme *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Blautia* ou encore *Faecalibacterium*) et des bactéries environnementales (*Cloacibacterium*, *Arcobacter* ou encore *Aeromonas*). Une grande majorité du microbiome du poste de refoulement et de l'entrée de la STEU est composé des genres *Arcobacter* et *Streptococcus* qui représentent respectivement entre 2.1% et 18.1% et entre 4.1% et 26.3% sur les quatre campagnes dans le poste de refoulement, entre 1.5% et 26.3% et entre 3.3% et 24.2% en entrée de STEU.

Dans le cas de la sortie de la STEU, dans la première campagne le genre *Arcobacter* est le plus abondant (en moyenne 23.4%) qui a sans doute persisté depuis l'entrée de la station. Dans les échantillons de la seconde campagne, le genre *Thauera* est majoritaire (41.1% en moyenne), tandis que pour la troisième et la quatrième campagne le genre *Brachymonas* est majoritaire (37.3% en moyenne sur les deux campagnes).

Au niveau de la mangrove recevant les eaux traitées de la station du Gosier, le genre majoritaire est *Prochlorococcus*, tout comme dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan du continuum précédent. Ce genre représente en moyenne 28% du microbiome total. En campagne 1 et 3 on retrouve également une proportion importante du genre *Arcobacter*. La mangrove est donc influencée par la réception des eaux de la station. Elle est composée d'un mélange de bactéries des effluents de sortie de la station et de bactéries marines (**Figure 24**).

Certains genres sont communs entre le microbiome des échantillons du continuum du Gosier et le microbiome des toilettes des avions, notamment les bactéries dont l'origine est le microbiote intestinal humain, tels que les genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Faecalibacterium*. Le microbiome des passagers des avions pourrait donc avoir une influence sur le microbiome retrouvés dans les eaux réceptrices en aval. En revanche les genres les plus abondants dans les toilettes des avions (*Atopostipes* et *Tissierella*) ne sont quasiment pas retrouvés dans ces eaux en aval, ils représentent moins de 0.1% du microbiome total de certains des échantillons. Ces genres semblent donc plus adaptés aux conditions des toilettes des avions qu'aux conditions environnementales.

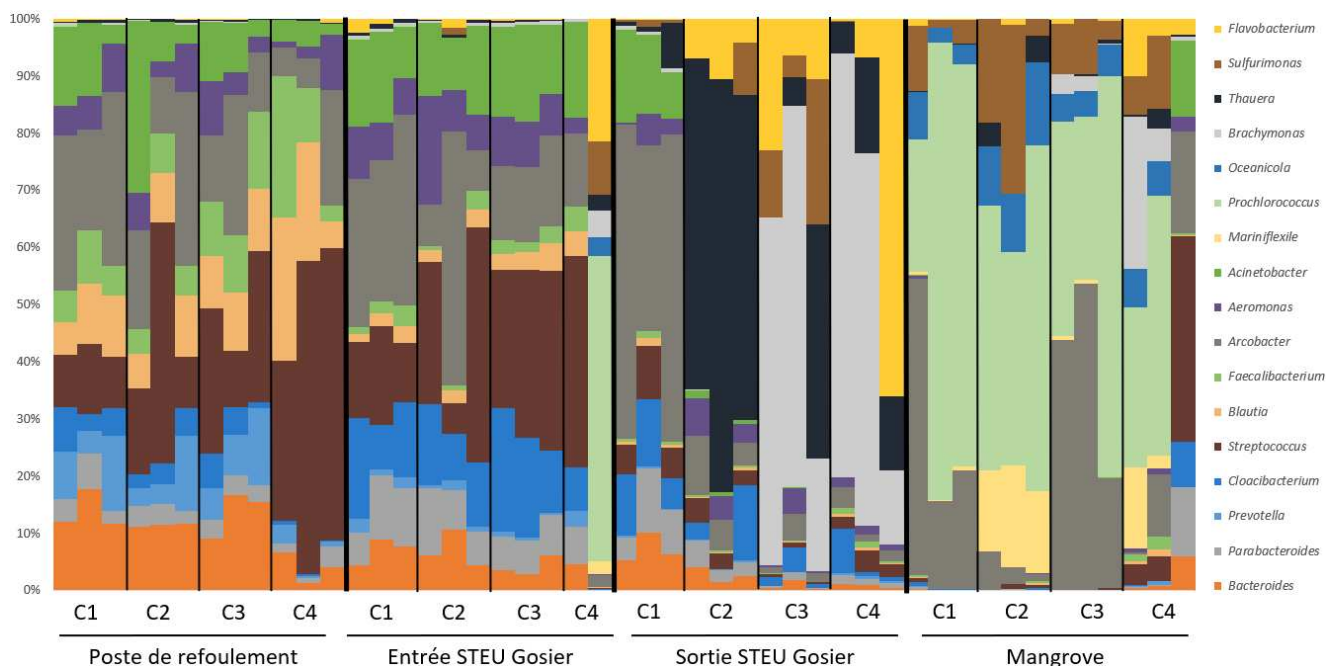


Figure 24 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons du continuum de la ville du Gosier, incluant le poste de refoulement, l’entrée et la sortie de la STEU du Gosier et la mangrove réceptrice des eaux traitées, échantillons collectés lors des trois semaines de prélèvement des quatre campagnes d’échantillonnage entre 2021 et 2023. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3, C4 = campagne 4

Dans les échantillons du Lamentin, ville avec une faible activité touristique, tout comme dans le continuum du Gosier, les phyla majoritaires du microbiote intestinal humain contribuent à leur microbiome. En effet, ils représentent également près de 90% du microbiome total, avec une majorité de *Pseudomonadota* (49.1%), suivi des *Bacillota* (20%) et des *Bacteroidota* (18.2%). Au sein du microbiome de l’entrée et de la sortie de la STEU ainsi que de la mangrove, la diversité alpha est similaire, avec 136, 126 et 134 genres bactériens en moyenne.

Le microbiome des trois semaines de prélèvement des quatre campagnes de l’entrée de la STEU du Lamentin et les deux premières campagnes de la sortie de la STEU se ressemblent. En revanche ce n’est pas le cas pour les campagnes 3 et 4 en sortie de STEU ni pour les quatre campagnes de la mangrove. C’est au niveau de la mangrove que l’on observe le plus de variabilité ; le microbiome diffère d’une semaine à l’autre mais également d’une campagne à l’autre.

Dans ces eaux, on retrouve majoritairement des bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatifs mais certains genres sont aussi aérobies. Les échantillons de l’entrée de la STEU du Lamentin sont caractérisés par la présence d’un mélange de bactéries dont l’habitat naturel est le microbiote intestinal mais aussi l’environnement. On y retrouve majoritairement les genres bactériens *Arcobacter*, *Acinetobacter* et *Streptococcus* avec en moyenne une abondance de 10.8 %, 8.7 % et 15.9 %. Ces genres bactériens sont ensuite retrouvés en sortie de STEU, en plus faible proportion pour *Acinetobacter* et *Streptococcus*, laissant place particulièrement aux genres bactériens *Arcobacter*, *Pseudomonas* et *Bacteroides*. Parmi ces genres, certains, incluant *Acinetobacter* et *Pseudomonas*, ont été détectés fréquemment dans les eaux usées et rapportés comme porteurs et vecteurs de gènes de résistance (Nguyen et al. 2021).

Cependant, contrairement à l’océan et à la mangrove du Gosier, on ne retrouve pas majoritairement de bactéries marines dans la mangrove du Lamentin. Il semble que la diversité retrouvée dans ces échantillons soit particulièrement influencée par le microbiome rejeté dans les effluents de la STEU. On y retrouve notamment les genres *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Prevotella* ou encore *Streptococcus* (**Figure 25**). Ce mélange de bactéries de la station et de bactéries environnementales peut être dû à la proximité du point de prélèvement dans la mangrove par rapport à la station, qui se situe seulement à 400m, lieu où l’effet filtrant de la mangrove n’a pas encore eu lieu.

Ainsi, les genres les plus abondants sont partagés entre l’entrée de la station du Gosier et l’entrée de la station du Lamentin, la suite du continuum se différenciant notamment au niveau de la mangrove.

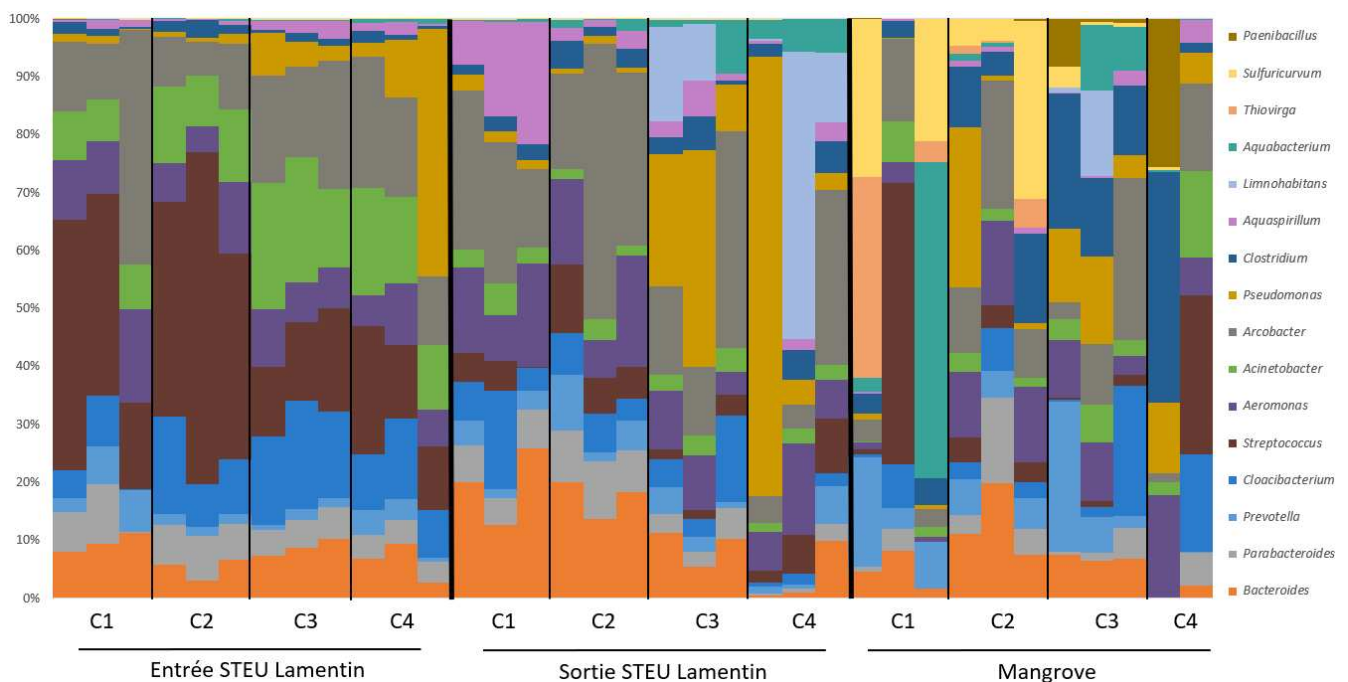


Figure 25 : Abondance proportionnelle des genres bactériens les plus abondants dans les échantillons du continuum de la ville du Lamentin, incluant l’entrée et la sortie de la STEU du Lamentin et la mangrove réceptrice des eaux traitées, échantillons collectés lors des trois semaines de prélèvement des quatre campagnes d’échantillonnage entre 2021 et 2023. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3, C4 = campagne 4

### I.3. Analyse du résistome

L’analyse du résistome a été réalisée par la méthode de qPCR haut-débit Fluidigm afin de détecter 95 gènes permettant de caractériser les échantillons en termes de gènes de résistance aux antibiotiques, aux biocides et aux métaux lourds ainsi que des EGM. L’abondance relative de chacun des gènes a été calculée par rapport au gène codant l’ARNr 16S (cf Matériels et Méthodes, **Partie V**).

#### I.3.1. Continuum CHUG – STEU de Jarry

Dans un premier temps, pour évaluer la résistance, l’abondance relative totale du résistome a été calculée en sommant l’abondance relative de chacun des gènes. La moyenne de l’abondance

relative totale sur les trois semaines de prélèvement des sites de ce continuum pour chacune des campagnes est représentée en **Figure 26**.

L'abondance relative totale est significativement plus élevée dans les échantillons du CHUG que dans les autres sites. Elle est de 1.06, 0.28, 0.16 et 0.17 en campagne 1, 2, 3 et 4 respectivement. Ces résultats ont déjà été observés dans différentes études à travers le monde (Hassoun-Kheir et al. 2020; Lepper et al. 2023). Ceci s'explique par le fait que l'hôpital est un lieu où la consommation d'antibiotiques est élevée, avec particulièrement l'usage d'antibiotiques de dernier recours. De plus, des biocides sont utilisés pour l'entretien des locaux.

L'abondance relative totale du résistome diminue ensuite une fois les eaux usées hospitalières arrivées en entrée de STEU, par effet de dilution avec les eaux usées urbaines. On y retrouve une abondance relative totale moyenne de 0.29 en campagne 1, 0.11 en campagne 2, 0.05 en campagne 3 et 0.10 en campagne 4. Suite au processus de traitement par la station, une diminution de l'abondance relative totale est également observée en sortie de celle-ci avec des abondances de 0.2, 0.02, 0.03 et 0.04 en campagne 1, 2, 3 et 4 respectivement. Enfin l'abondance relative est la plus faible dans l'environnement récepteur des eaux traitées qui est, dans ce cas, l'océan, l'effluent étant immédiatement dilué à la sortie de l'émissaire. Les résultats des prélèvements dans l'océan ne sont disponibles que pour les campagnes 2 et 3. L'abondance est beaucoup plus faible dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan lors de la campagne 2 ( $4.7 \cdot 10^{-7}$ ) que lors de la campagne 3 (0.001).

Des différences significatives sont observées entre les différentes campagnes effectuées. La campagne 1 est celle où l'abondance relative totale du résistome est la plus haute et ce pour chacun des sites. Cette campagne a eu lieu pendant la pandémie de Covid-19 en 2021, pandémie qui a pu avoir une influence sur les résultats du fait de la baisse du tourisme et du confinement des personnes. L'effet de cette période sera discuté ci-après. Des différences significatives sont observées entre la campagne 2 et la campagne 3 dans l'hôpital, en entrée de la STEU et dans l'océan et entre la campagne 2 et la campagne 4 dans l'hôpital et en sortie de la STEU. Des différences sont également significatives en entrée de la STEU entre la campagne 3 et la campagne 4. Mais ces différences sont moins importantes en comparaison avec la campagne 1. Par conséquent, il pourrait également y avoir un effet des saisons sur le résistome. L'effet de la saisonnalité sur la résistance est décrit plus loin.

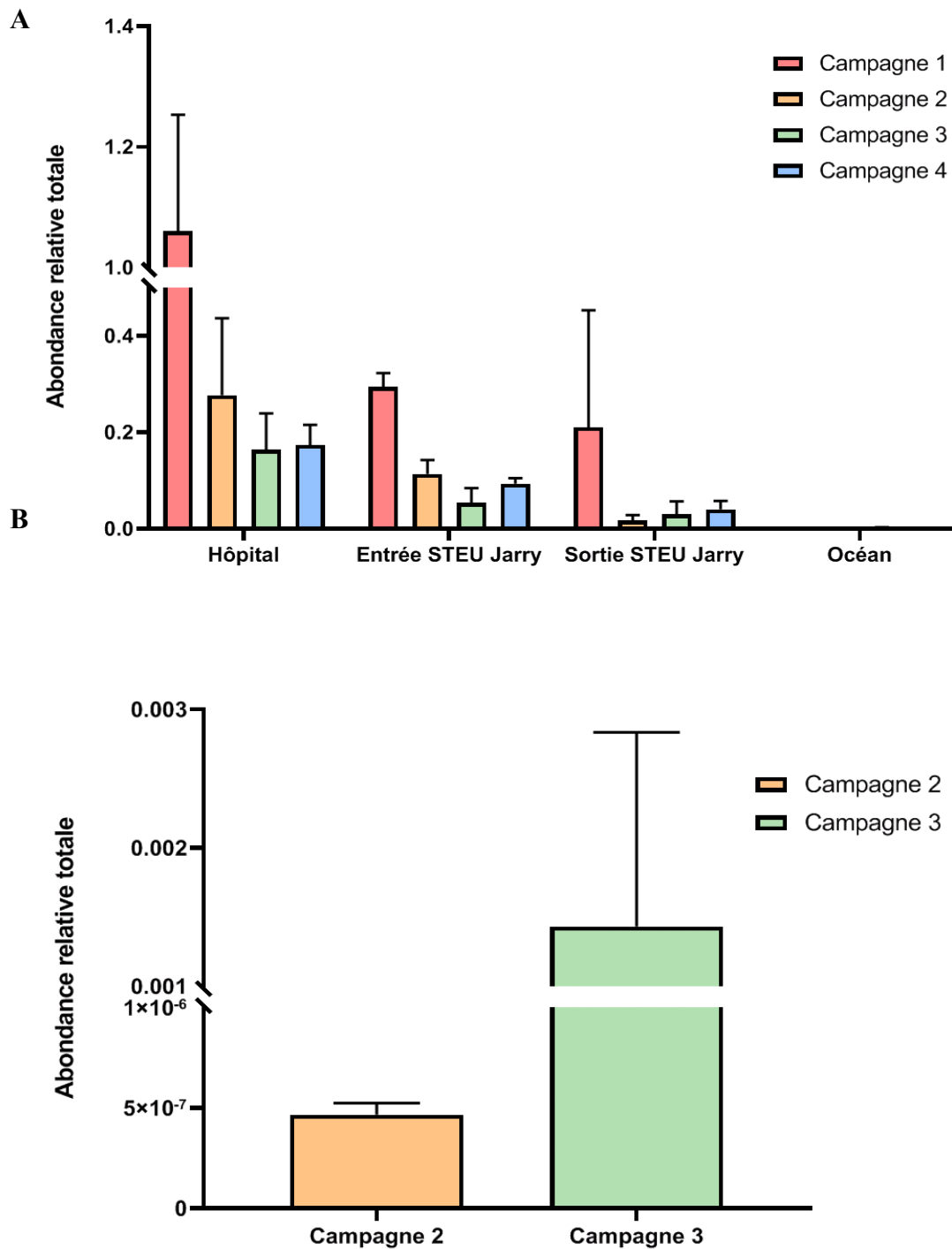


Figure 26 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$  SD) du résistome mesuré par Fluidigm PCR des échantillons collectés **A** : à l'hôpital, en entrée et en sortie de la STEU de Jarry et dans l'océan lors des 4 campagnes de prélèvements, **B** : zoom sur les échantillons de l'océan collectés lors des campagnes 2 et 3. La campagne 1 est représentée en rouge, la campagne 2 en orange, la campagne 3 en vert et la campagne 4 en bleu.

L'abondance proportionnelle en **Figure 27** montre la distribution des différentes classes de gènes dans les différents sites du continuum.

Les résultats montrent une signature similaire du résistome sur les trois semaines de prélèvements pour une même campagne d'échantillonnage, excepté pour les prélèvements dans

l'océan où la variabilité est plus marquée. Entre les différentes campagnes, la variabilité des résistomes est faible, plus particulièrement entre la campagne 1 et la campagne 2.

Les résistomes des prélèvements des eaux usées du CHUG, en entrée et en sortie de STEU sont, dans une première approche, similaires. Globalement, sur les quatre campagnes, les gènes de résistance aux aminosides sont les gènes les plus abondants dans les prélèvements. Ils représentent en moyenne 27% du résistome des eaux du CHUG, 16% de celui de l'entrée de la STEU de Jarry, 17% de la sortie de cette même STEU et 18% du résistome des eaux en sortie de l'émissaire dans l'océan. S'en suivent les gènes de résistance aux bêta-lactamines puis les gènes de résistance aux sulfamides qui composent respectivement 12.2% et 5.3% du résistome des eaux du CHUG, 10.3% et 8.5% du résistome de l'entrée de la STEU, 10.5% et 13.3% du résistome de la sortie de la STEU et enfin 12.4% et 5% du résistome des rejets au niveau de l'émissaire dans l'océan. Ces résultats sont en accord avec diverses études montrant également la forte prévalence des gènes conférant des résistances aux aminosides et aux bêta-lactamines dans ce type d'échantillons (Quintela-Baluja et al. 2019; Bengtsson-Palme et al. 2016). Pour la deuxième campagne, dans les prélèvements de la sortie de l'émissaire dans l'océan, outre les gènes de résistance aux aminosides et aux bêta-lactamines, le résistome est marqué par la forte présence d'intégrons (53,6%) en deuxième semaine et de gènes de résistance aux métaux lourds (42,3%) en troisième semaine.

Étonnamment, les résultats montrent également la très faible présence de gènes de résistance aux QAC dans chacun des échantillons lors de la troisième campagne (moins de 1% du résistome) tandis qu'ils représentent entre 4 et 5% du résistome dans les campagnes 1, 2 et 4.

En plus des gènes de résistance, les EGM représentent une grande proportion du mobilome des échantillons. Ils composent en moyenne 21%, 26%, 28% et 25% du résistome du CHUG, de l'entrée et de la sortie de la STEU de Jarry et de l'océan récepteur respectivement. La forte présence de ces éléments indique la possibilité de dissémination des gènes de résistance par transfert horizontal. Les intégrons ne représentent qu'une faible proportion (moins de 1%) du résistome des échantillons, excepté dans l'océan lors de la deuxième semaine de prélèvement de la seconde campagne.



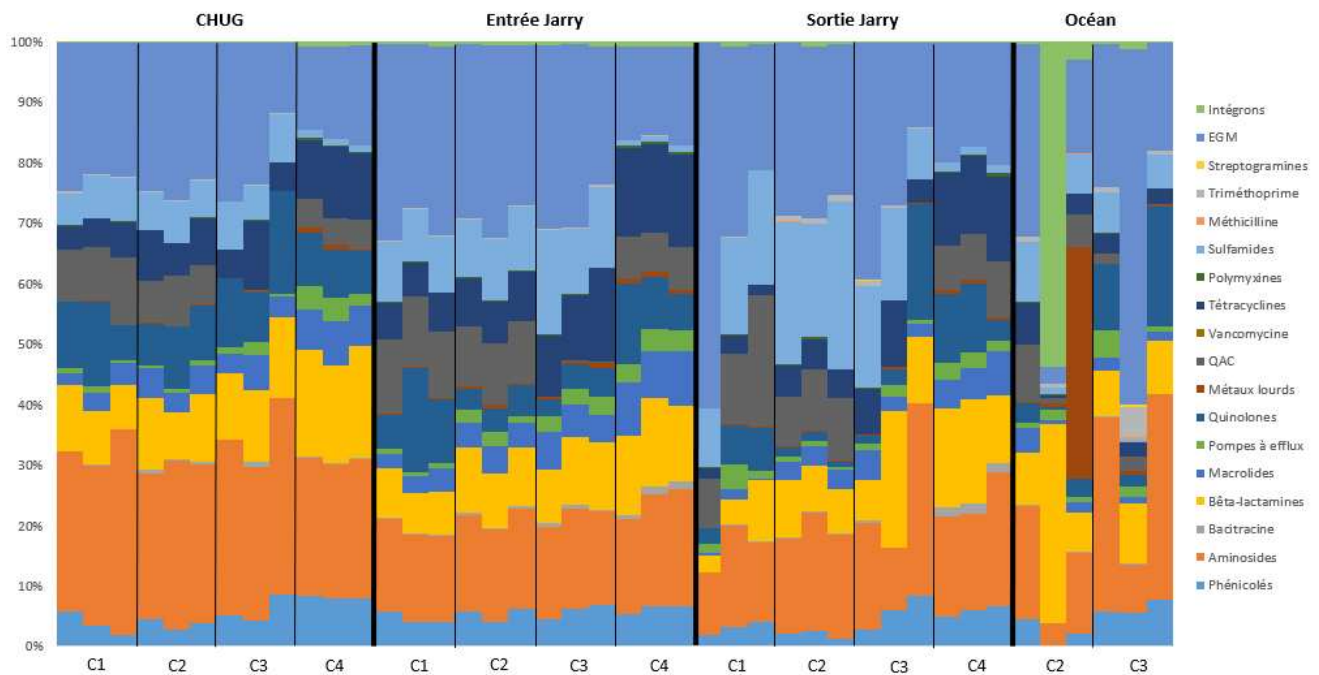


Figure 27 : Abondance proportionnelle des différentes classes de gènes et EGM dans les échantillons du CHUG, de l'entrée et de la sortie de la STEU de Jarry collectés lors des trois semaines de prélèvement des campagnes 1,2,3 et 4 et des échantillons de l'océan collectés lors des campagnes 2 et 3. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3 et C4 = campagne 4

Une liste de gènes d'intérêt a été établie en prenant en compte les gènes suggérés comme indicateurs, conférant des résistances à différentes classes d'antibiotiques et les gènes de résistance émergents comme le gène *mcr-1* conférant une résistance à la colistine (Berendonk et al. 2015a). Ces gènes sont présentés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Gènes d'intérêt sélectionnés et leurs classes correspondantes

Intégrons	Sulfamides	Bêta-lactamines	Quinolones	Aminosides	Méthicilline	Macrolides	Tétracyclines	Polymyxines
<i>int11</i>	<i>sul1</i>	<i>blaKPC</i> <i>blaOXA</i> <i>blaCTX-M</i> <i>blaTEM</i> <i>blaNDM</i> <i>blaVIM</i> <i>blaSHV</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i> <i>aph</i>	<i>mecA</i>	<i>ermB</i>	<i>tetM</i>	<i>mcr-1</i>

La représentation de l'abondance moyenne par campagne de ces gènes d'intérêt est réalisée sous forme de *heatmap* en **Figure 28**.

Les résultats montrent des différences entre les campagnes. En effet, certains gènes, *aph(3')-III*, *blaTEM*, *blaSHV*, *blaVIM*, *blaKPC*, *ermB*, *qnrS* et *sul1*, sont plus abondants en campagne 1 que dans les autres campagnes. Dans les rejets de l'émissaire dans l'océan, les deux campagnes sont également différentes, avec de plus faibles abondances dans la campagne 2. Les eaux usées collectées au niveau du CHUG sont caractérisées par une forte abondance du gène de résistance aux aminosides *aac(6')-Ib*, des gènes de bêta-lactamases *blaTEM*, *blaCTX-M* ou *blaVIM* et *blaKPC* codant une carbapénémase, du gène conférant une résistance aux macrolides *ermB*, du gène *qnrS* de résistance aux quinolones ainsi que du gène *sul1* de

résistance aux sulfamides. Leur abondance diminue ensuite au fil du continuum. Notamment, les gènes codant une BLSE (*blaCTX-M*) ou de carbapénémase (*blaKPC*, *blaVIM*) ne sont que très faiblement détectés, probablement du fait d'une dilution dans les eaux usées urbaines ne contenant pas ou que très peu ces gènes. Dans l'environnement récepteur, seuls les gènes *aac(6')-Ib* et *qnrS* ont une abondance plus élevée que les autres mais seulement en campagne 3. En campagne 2, tous les gènes d'intérêt sont présents seulement en faible abondance et le gène *mcr-1* est lui absent de cet échantillon. À noter qu'il y a très peu de signal pour le gène de carbapénémase NDM.

Tous les gènes présents en forte abondance font partie des gènes souvent retrouvés dans les eaux des stations d'épuration dans diverses études (Nguyen et al. 2021). Il est surprenant de retrouver des abondances relatives du gène *aac(6')-Ib* tout au long du continuum CHU – entrée et sortie de STEU car c'est un gène qui code une résistance aux aminosides, molécules utilisées essentiellement en milieu hospitalier.

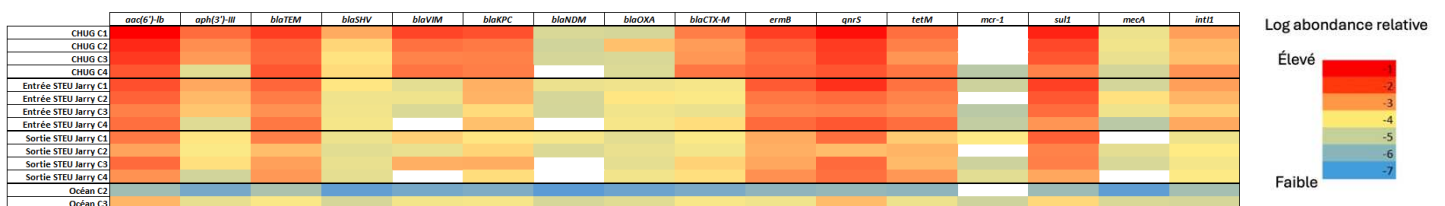


Figure 28 : Heatmap représentant l'abondance relative moyenne des gènes d'intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des sites étudiés : CHUG, entrée et sortie de STEU et océan. La couleur rouge représente les gènes les plus abondants, la couleur bleue les gènes les moins abondants, la couleur jaune les gènes avec une abondance moyenne et la couleur blanche signifie que le gène n'est pas détecté.

Les animaux font partie intégrante du concept One-Health. Parmi eux, les animaux de compagnie et les animaux de la ferme sont considérés comme d'importants contributeurs du développement de la résistance aux antibiotiques. Les animaux sauvages, moins étudiés, jouent également un rôle dans la dissémination de la résistance (Laborda et al. 2022).

L'abondance relative totale du résistome varie d'une campagne à une autre pour un même animal et varie également entre les animaux. En effet, pour les cafards, l'abondance est plus haute dans les deux premières campagnes de prélèvement, tandis que pour les crapauds et les anolis c'est la première campagne et les animaux témoins qui ont les plus fortes abondances relatives. Pour la vache c'est en campagne 2 et 4 que sont retrouvées les abondances les plus élevées du résistome. Les abondances sont également différentes entre les animaux. Les anolis sont les animaux pour lesquelles les résultats montrent une plus grande abondance relative totale du résistome, l'abondance maximale est de 0.1 en campagne 1 et de 0.06 chez les anolis témoins. Chez les cafards l'abondance relative varie de 0.004 à 0.04, chez les crapauds de 0.001 à 0.04 et chez les vaches de 0.01 à 0.04, sur les 4 campagnes (**Figure 29**).

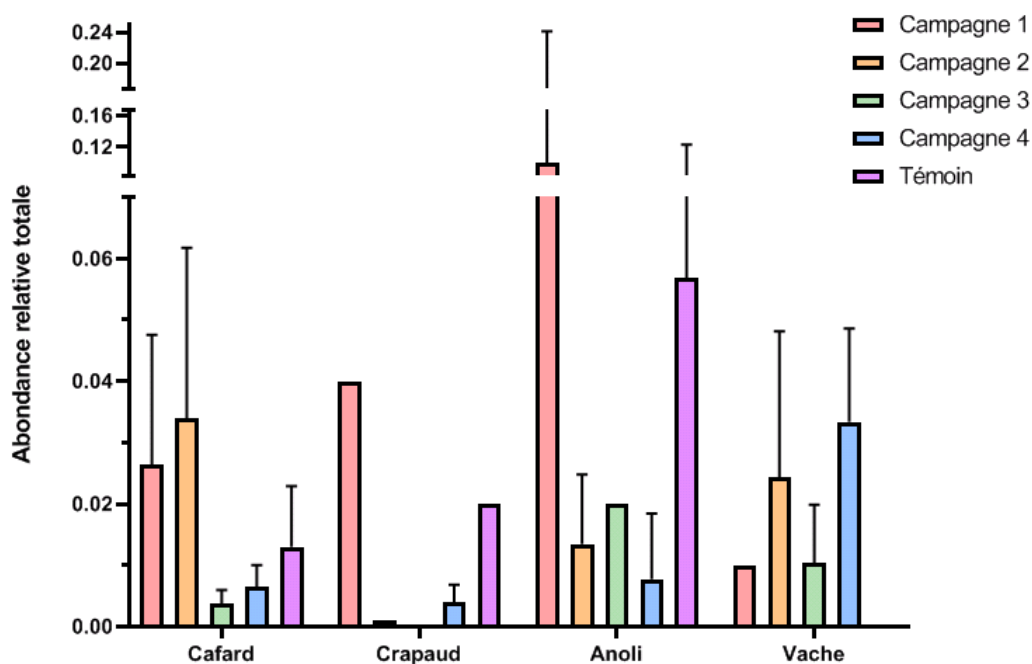


Figure 29 : Abondance relative totale ( $\pm$  SD) des gènes de résistance détectés par Fluidigm PCR dans les échantillons animaux (cafards, crapauds, anolis, vaches et animaux témoins) lors des campagnes 1, 2, 3 et 4. La campagne 1 est représentée en rouge, la campagne 2 en orange, la campagne 3 en vert, la campagne 4 en bleu et les animaux témoin en violet.

Les résultats sous forme d'abondance proportionnelle, présentés en **Figure 30**, montrent une variabilité de l'abondance des gènes détectés chez les animaux. Le résistome des animaux diffère d'un animal à l'autre, mais est globalement homogène d'une campagne à l'autre pour un même animal. En revanche, pour les anolis, le résistome de l'anoli témoin est très différent des anolis vivant dans la station. Les cafards, les crapauds et les anolis vivent tous les trois dans la station et sont les plus susceptibles d'être au contact des eaux de la STEU, mais ils présentent des résistomes distincts, différents de celui des vaches.

Le résistome des cafards en campagne 1 et 3 et des cafards témoins est composé majoritairement de gènes de résistance aux tétracyclines (47.4% en moyenne) et de gènes de résistance aux macrolides (36.6% en moyenne). En campagne 2, les gènes codant des résistances aux macrolides sont présents en plus grande proportion (76.5%) et dans la campagne 4 ce sont les gènes de résistance aux phénicolés et macrolides les plus abondants (41.6% et 27.7% respectivement). Les résistomes des anolis, quant à eux, sont caractérisés par une forte abondance de pompes à efflux, qui représentent en moyenne 52% de l'abondance sur les campagnes 1, 2 3 et 4. Chez les anolis témoins ce sont les gènes de résistance aux tétracyclines (48.9%) qui sont majoritaires. Les principaux gènes de résistance chez les crapauds confèrent des résistances aux quinolones, tétracyclines et bêta-lactamines, représentant respectivement 24.3%, 28.2% et 13.9% en campagne 1, 57.7%, 0.5% et 12% en campagne 2, 40.7%, 13.8% et 25% en campagne 4 et 41.5%, 4.6% et 38.5% chez les animaux témoins. Les vaches ont un résistome contenant en très grande majorité des résistances aux tétracyclines (76.9% en moyenne). Plusieurs études montrent d'ailleurs une prédominance des gènes de résistance aux tétracyclines chez les bovins (Doster et al. 2022; Noyes et al. 2016; Shin et al. 2015; Pinnell et al. 2023; Vikram et al. 2017). Aucune donnée n'est disponible sur la consommation d'antibiotiques de ces vaches échantillonnées en Guadeloupe mais les tétracyclines font partie

des antibiotiques les plus prescrits en médecine vétérinaire, notamment chez les bovins, ce qui pourrait expliquer la forte présence de ces gènes de résistance (www.anses.fr).

Globalement, les gènes de résistance majoritairement présents chez les animaux sont différents des gènes de résistance détectés dans les eaux de la STEU.

De plus, contrairement aux échantillons d'eau, les EGM ne sont pas très présents chez les animaux. Ils représentent en moyenne 7.5% chez les cafards, 3.8% chez les anolis, 5.4% chez les crapauds et 1.6% chez les vaches.

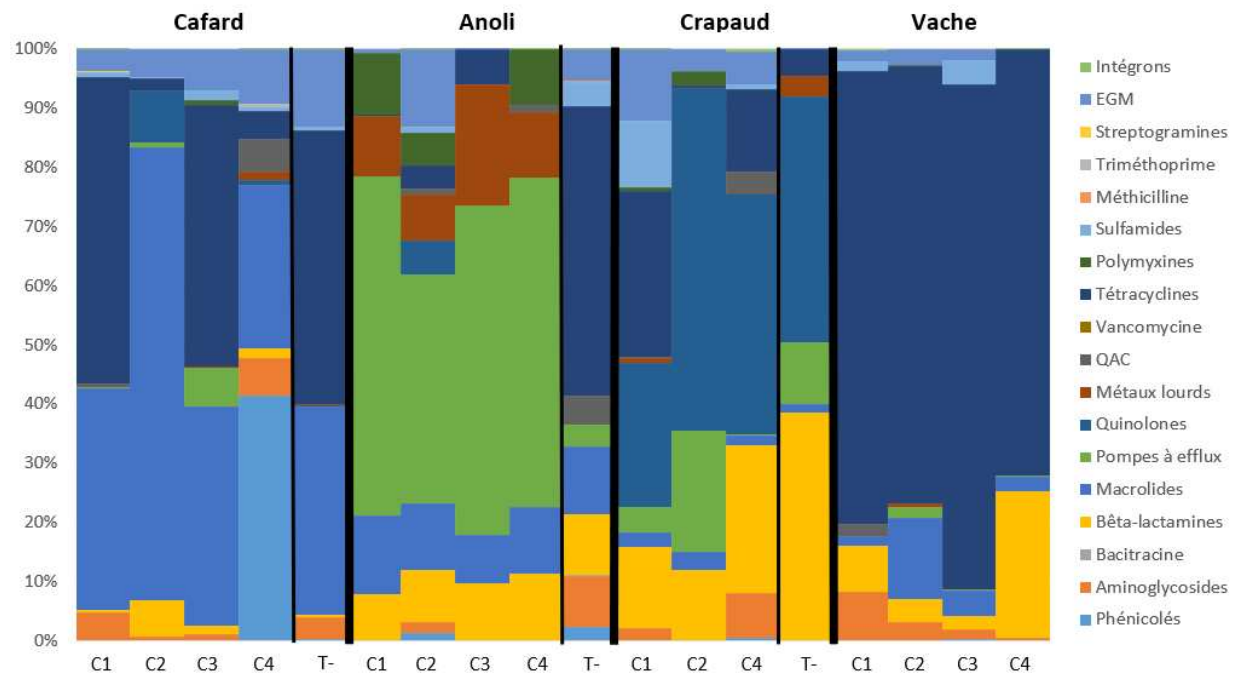


Figure 30 : Abondance proportionnelle des différentes classes de gènes et EGM dans les échantillons animaux (cafards, anolis, crapauds, vaches et animaux témoins), collectés lors des campagnes 1,2,3 et 4. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3, C4 = campagne 4 et T- = témoin

En considérant seulement les gènes d'intérêt sélectionnés précédemment, les résultats montrent une absence d'une grande partie des gènes, notamment des gènes *mcr-1* et *mecA*, conférant des résistances à la colistine et à la méthicilline respectivement, qui sont totalement absents de tous les échantillons. Seuls les gènes *ermB* et *tetM* sont retrouvés à une abondance élevée dans le résistome du cafard pour chacune des campagnes et chez le cafard témoin. Ces gènes sont également beaucoup retrouvés dans le résistome de l'anoli témoin en plus des gènes *blaTEM*, *blaVIM*, *blaCTX-M* et *sull*. Le gène de résistance *ermB* est également présent dans le résistome des crapauds de la première et de la seconde campagne. Enfin *sull* est abondamment présent dans le résistome des vaches de la troisième campagne (**Figure 31**).

En comparaison des échantillons de la STEU de Jarry, l'abondance des gènes d'intérêt est plus faible chez les animaux que dans les eaux de la station. Mais, les gènes *ermB* et *tetM* faisaient également partie des gènes les plus abondants au niveau de la station de Jarry. Ces gènes étant présents en forte abondance dans le résistome de certains animaux présents dans la station et au contact des eaux (cafards et crapauds) et peu présents chez les animaux qui ne sont pas au contact de ces eaux (anolis et vaches), il est possible que ces animaux aient été contaminés par contact avec les eaux de la station. La présence de ces mêmes gènes en forte abondance chez les anolis témoins pourrait venir d'une autre source de contamination.



Figure 31 : Heatmap représentant l'abondance relative moyenne des gènes d'intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des animaux étudiés : cafards, anolis, crapauds, vaches des campagnes de prélèvement 1, 2, 3 et 4 et des animaux témoins. La couleur rouge représente les gènes les plus abondants, la couleur bleue les gènes les moins abondants, la couleur jaune les gènes avec une abondance moyenne et la couleur blanche signifie que le gène n'est pas détecté.

### I.3.2. Continuum touristique et non-touristique

Concernant les effluents collectés dans les toilettes des avions, l'abondance relative totale moyenne des trois semaines de prélèvements est différente suivant les campagnes de prélèvement. En effet, elle varie de 0.08 à 0.23 entre les campagnes 1 à 4. L'abondance est significativement plus élevée en campagne 1 qu'en campagne 3 ( $p = 0.02$ ) et qu'en campagne 4 ( $p = 0.01$ ) mais il n'y a pas de différences significatives entre la campagne 1 et la campagne 2 ni entre toutes les autres campagnes ( $p > 0.05$ ) (Figure 32).

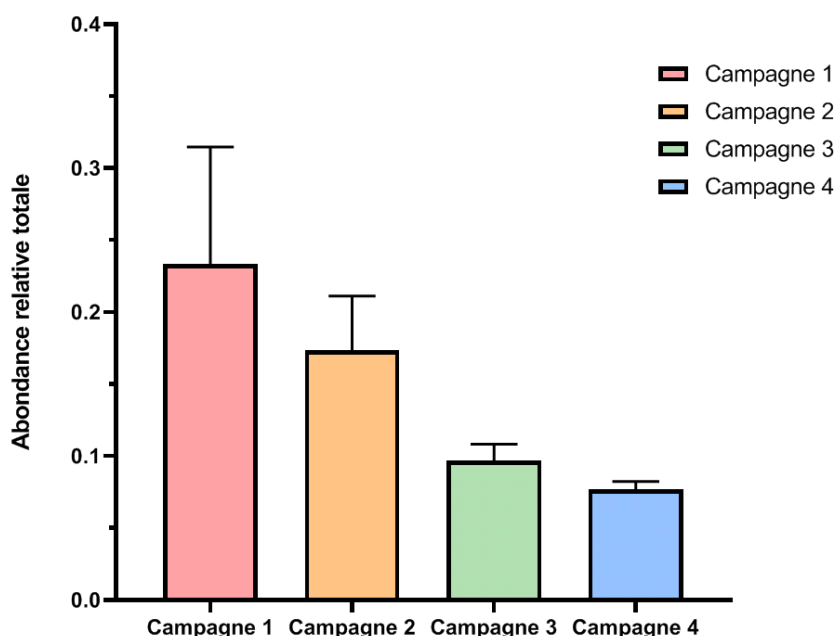


Figure 32 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$  SD) du résistome des échantillons collectés dans le contenu des toilettes d'avions lors des 4 campagnes de prélèvements. La campagne 1 est représentée en rouge, la campagne 2 en orange, la campagne 3 en vert et la campagne 4 en bleu.

Concernant l'abondance proportionnelle, le résistome des avions reste stable sur les 3 semaines de prélèvements réalisées mais également sur l'ensemble des campagnes 1 à 4. Les gènes de résistance aux tétracyclines composent majoritairement le résistome de ces toilettes des avions (33.7% en moyenne). Sont ensuite retrouvés, dans des proportions similaires, les gènes de résistance aux phénicolés (6.2%), aux aminosides (10.9%), aux bêta-lactamines (5.1%), aux macrolides (8.7%), aux QAC (6%, sans prendre en compte la troisième campagne) et aux sulfamides (8.4%) (**Figure 33**).

Comme dans le continuum du CHUG, les gènes de résistance aux QAC sont très faiblement présents dans les échantillons de la campagne 3 comparés aux autres campagnes.

En revanche, les EGM constitue une plus faible proportion du résistome dans les toilettes des avions puisqu'ils représentent en moyenne 19.3 % du résistome, indiquant, toute proportion gardée, une plus faible mobilité des gènes dans cette matrice, en gardant à l'esprit la présence systématique de désinfectant dans les toilettes des avions.

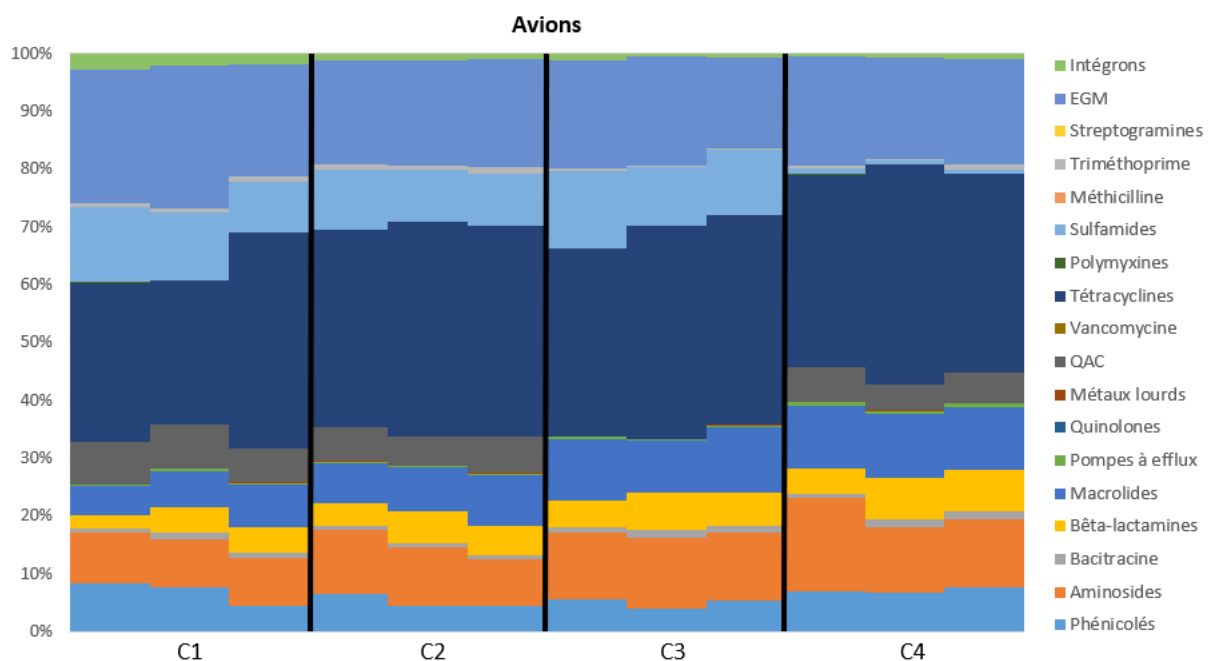


Figure 33 : Abondance proportionnelle des différentes classes de gènes et EGM dans les échantillons du contenu des toilettes des avions, collectés pendant trois semaines lors des campagnes 1,2,3 et 4. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3 et C4 = campagne 4

Pour les gènes d'intérêt sélectionnés, sur les 4 campagnes, les gènes *aac(6')-Ib*, *aph(3')-III*, *ermB*, *sulI* et *intI* sont les plus abondants. Le gène de résistance aux tétracyclines *tetM* est également très abondant dans les échantillons des toilettes d'avions. Il a l'abondance la plus élevée, en accord avec les résultats précédents qui montrait une forte proportion de gènes de résistance aux tétracyclines.

En revanche, les gènes de résistance aux carbapénèmes *blaKPC* et *blaNDM*, sont absents ou seulement faiblement abondants et ce uniquement lors de la première campagne, respectivement. Les touristes ne semblent donc pas importer ces gènes (**Figure 34**).

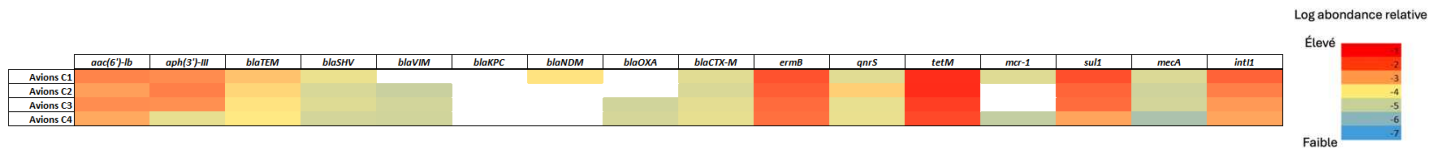


Figure 34 : Heatmap représentant l’abondance relative moyenne des gènes d’intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes d’échantillonnage dans les avions étudiés. La couleur rouge représente les gènes les plus abondants, le bleu les gènes les moins abondants, la couleur jaune une abondance moyenne et la couleur blanche signifie que le gène n’est pas détecté.

Les touristes atterrissant en Guadeloupe vont, pour une partie d’entre eux, séjourner dans les hôtels de l’île. La ville du Gosier est la ville ayant la plus grande offre hôtelière de la Guadeloupe, c’est donc dans cette ville que l’influence des touristes sera la plus visible. L’abondance relative totale du résistome dans le continuum touristique du Gosier est représenté en **Figure 35**.

Les résultats montrent que l’abondance est la plus élevée au niveau des eaux du poste de refoulement, recevant les eaux des hôtels, et est similaire à celle de l’entrée de la STEU du Gosier. En effet, il n’y a pas de différences significatives entre les abondances relatives du résistome du poste de refoulement et celui de l’entrée de la STEU en campagne 3 et 4 ( $p > 0.05$ ). Leur abondance varie entre 0.04 et 0.17 pour le poste de refoulement et entre 0.04 et 0.14 pour l’entrée de la station et ce pour les quatre campagnes de prélèvement. La première campagne est celle où l’abondance est significativement la plus élevée ( $p < 0.05$ ), phénomène peut-être toujours lié à la pandémie au SARS-Cov2. Les campagnes 3 et 4 ont les abondances les plus faibles mais similaires entre elles avec des abondances totales de 0.05 et 0.06.

Le traitement des eaux par la station éliminerait une partie du résistome, l’abondance relative étant plus faible en sortie de la station qu’en entrée avec des niveaux de 0.09, 0.06, 0.009 et 0.02 en campagne 1, 2, 3 et 4 respectivement. L’abondance diminue encore une fois arrivée au niveau de la mangrove. L’abondance relative totale y est de moins de 0,01.



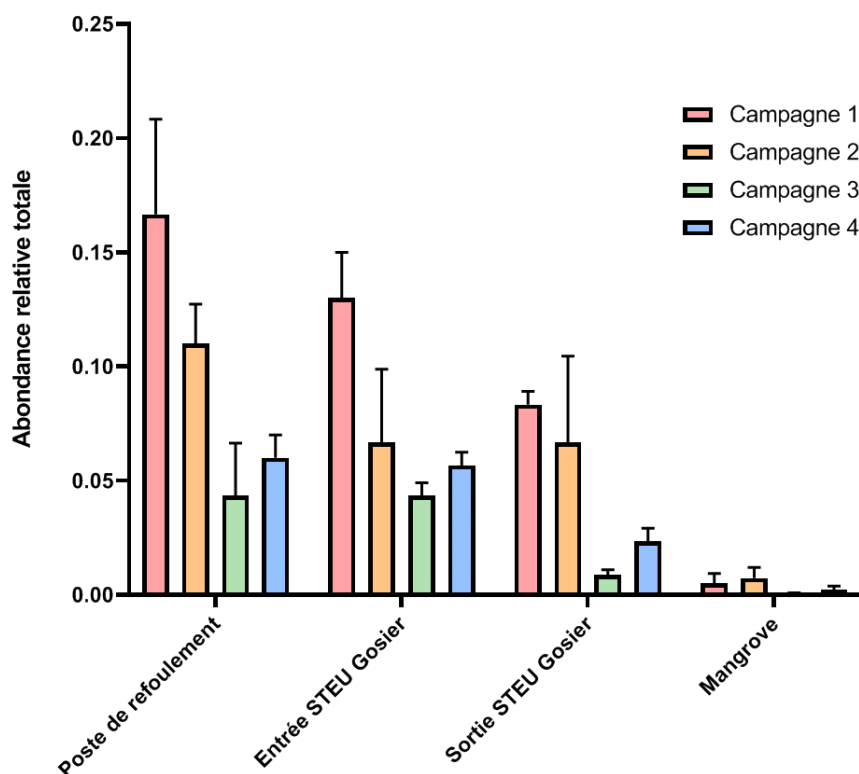


Figure 35 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$  SD) du résistome des échantillons collectés dans le continuum touristique de la ville du Gosier, incluant le poste de refoulement, l'entrée et la sortie de la STEU du Gosier ainsi que la mangrove recevant les eaux traitées, lors des 4 campagnes de prélèvements. La campagne 1 est représentée en rouge, la campagne 2 en orange, la campagne 3 en vert et la campagne 4 en bleu.

L'abondance proportionnelle, représentée en **Figure 36**, est similaire sur les trois semaines de prélèvement pour chacun des sites de ce continuum, elle est également semblable sur les quatre campagnes d'échantillonnage. Le poste de refoulement recevant les eaux usées provenant des hôtels et donc reflétant en partie le résistome des touristes contient une plus grande proportion de gènes de résistance aux tétracyclines que les autres sites. En effet, ils représentent une abondance proportionnelle moyenne de 20.4% contre 10%, 6.4% et 6.4% dans l'entrée et la sortie de la STEU du Gosier et dans la mangrove respectivement. Les gènes de résistance aux tétracyclines que l'on retrouvait dans les échantillons d'avions arriveraient donc au niveau des hôtels, rejoindraient les eaux usées et seraient ensuite dilués avec les eaux urbaines et cliniques au niveau de la station. Les pompes à efflux représentent également une grande proportion du résistome du poste de refoulement dans la campagne 3 (25.2%) et dans la campagne 4 (10.4%). Au niveau de l'entrée de la STEU, les gènes de résistance aux aminosides et aux macrolides sont les plus représentés. Ils composent en moyenne 13.7% et 14.1% du résistome sur les quatre campagnes. Puis, en sortie de STEU et dans la mangrove, les gènes de résistance aux sulfamides et aux QAC prennent une place plus importante dans le résistome au dépend des gènes de résistance aux macrolides dont sans doute une partie a été éliminé par le traitement de la STEU. Ils représentent en moyenne sur les 4 campagnes respectivement 20.4 % et 23.5 % du résistome de la sortie de la station et 21 % et 22.4 % du résistome de la mangrove.

Encore une fois, les gènes de résistance aux QAC sont quasiment absents de la troisième campagne de prélèvement, représentant moins de 1% du résistome alors qu'ils sont plus abondamment présents dans les trois autres campagnes.

Tout comme dans le continuum hospitalier les EGM représentent une grande proportion du résistome dans ces sites, en moyenne 23.7%, 26.6%, 25.3% et 23.9% dans le poste de



refoulement, l'entrée de la STEU, la sortie de la STEU et la mangrove respectivement. Ces sites pourraient être des lieux potentiels susceptibles de favoriser le transfert de gènes. Les intégrons sont quant à eux faiblement présents, ils composent en moyenne moins de 1.5 % du résistome.

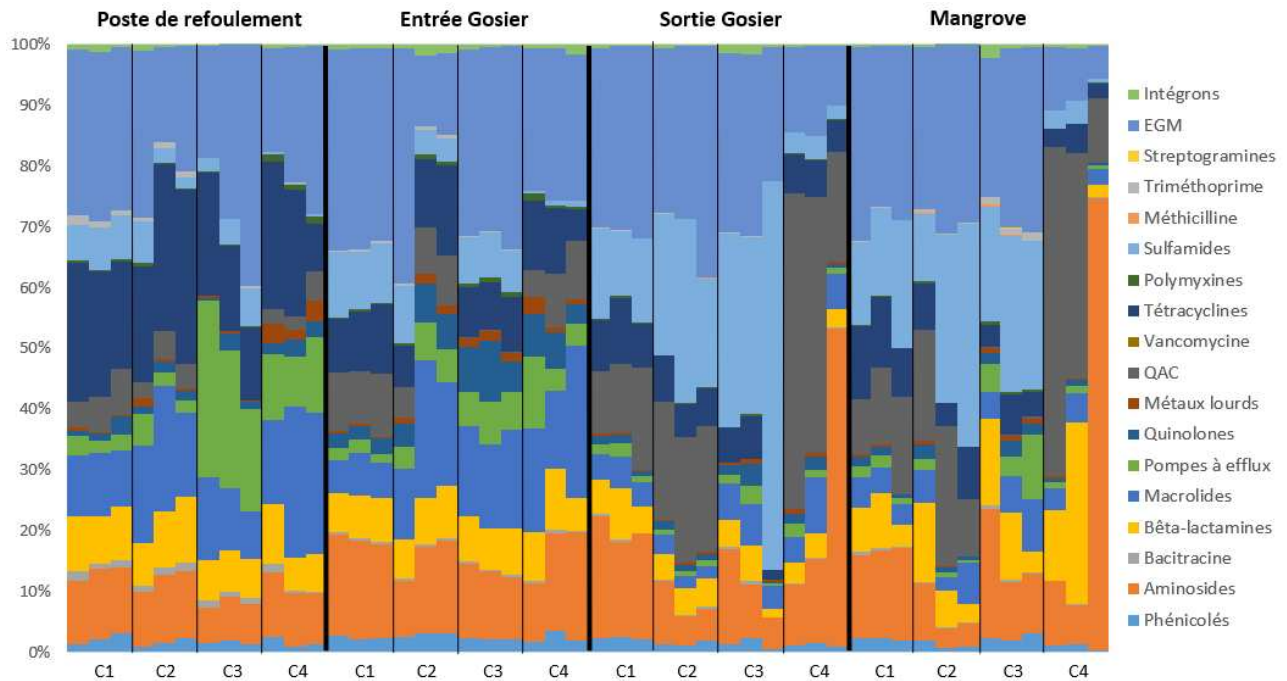


Figure 36 : Abondance proportionnelle du résistome des échantillons collectés dans le continuum touristique de la ville du Gosier, incluant le poste de refoulement, l'entrée et la sortie de la STEU du Gosier ainsi que la mangrove recevant les eaux usées, lors des 4 campagnes de prélèvements. C1 = campagne 1, C2 = campagne 2, C3 = campagne 3 et C4 = campagne 4

L'abondance relative de chacun des gènes d'intérêt a été moyennée sur les trois semaines de prélèvement pour chaque site et pour chacune des campagnes et est représenté sur la *heatmap* en **Figure 37**. Les gènes d'intérêt sont globalement plus abondants dans les deux premières campagnes de prélèvements.

Au niveau du poste de refoulement, les gènes d'intérêt les plus abondants sont les gènes *aac(6')-lb*, *aph(3')-III*, *blaTEM*, *ermB*, *qnrS*, *tetM* et *sull*. Ces mêmes gènes étaient retrouvés abondamment dans les eaux du continuum CHUG – STEU de Jarry. Les gènes qui étaient abondants dans les échantillons des toilettes des avions sont également abondants dans ces eaux. Ces mêmes gènes sont ensuite retrouvés à des abondances similaires en entrée de la STEU du Gosier recevant les eaux provenant du poste de refoulement, excepté pour le gène *aph(3')-III* qui est lui un peu moins abondant. Leur abondance diminue ensuite après le traitement de la station pour finir à une faible abondance dans les eaux de la mangrove recevant les eaux traitées, à l'exception du gène *sull* en première mais surtout en seconde campagne qui reste lui très abondant.

Les gènes codant des BLSE ou carbapénémases sont absents ou faiblement détectés.

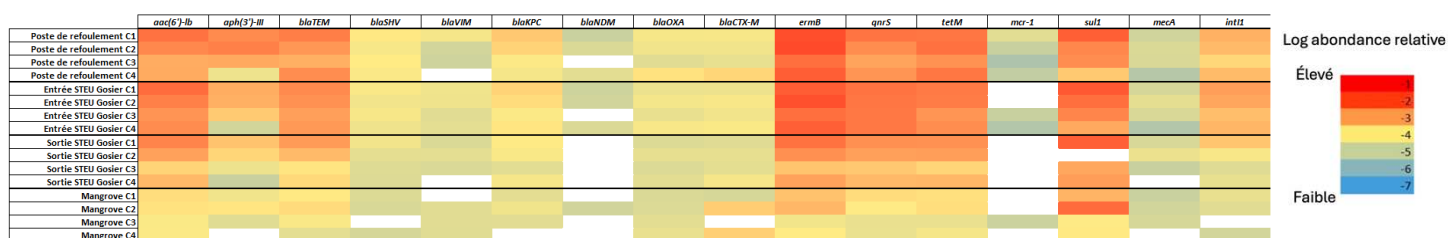


Figure 37 : Heatmap représentant l’abondance relative moyenne des gènes d’intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des sites étudiés : poste de refoulement, entrée et sortie de STEU du Gosier et mangrove. La couleur rouge représente les gènes les plus abondants, le bleu les gènes les moins abondants, la couleur jaune une abondance moyenne et la couleur blanche signifie que le gène n’est pas détecté.

En comparaison à la ville très touristique du Gosier, la ville du Lamentin a été sélectionnée car elle a une faible activité touristique, où moins de touristes séjournent, reflétant donc plus le résistome des habitants de la Guadeloupe.

L’abondance relative totale au niveau de ce continuum dans les campagnes 1 et 2 est significativement ( $p < 0.05$ ) plus élevée pour chacun des sites à l’exception de la mangrove ( $p > 0.05$ ). Il n’y a pas de différences significatives entre les prélèvements de la campagne 1 et 2 et entre les prélèvements de la campagne 3 et 4 ( $p > 0.05$ ). Au contraire, il en existe entre les campagnes 1, 2 et 3, 4. L’abondance totale est à des niveaux similaires de ceux du continuum touristique du Gosier. En effet, l’abondance moyenne se situe entre 0.04 et 0.16 au niveau de l’entrée de la STEU, entre 0.01 et 0.10 à la sortie de celle-ci et entre 0.003 et 0.06 au niveau de la mangrove (**Figure 38**).

L’abondance reste à un niveau élevé dans la mangrove, surtout en campagne 2. Ceci pourrait être dû à des dysfonctionnements de la station lors de cette campagne. La station n’opérait pas de façon optimale, et une partie du résistome a pu se retrouver dans l’environnement récepteur (la mangrove). Ce manque d’efficacité de la station représente un risque sanitaire, notamment dans les zones de baignades ou de pêche.

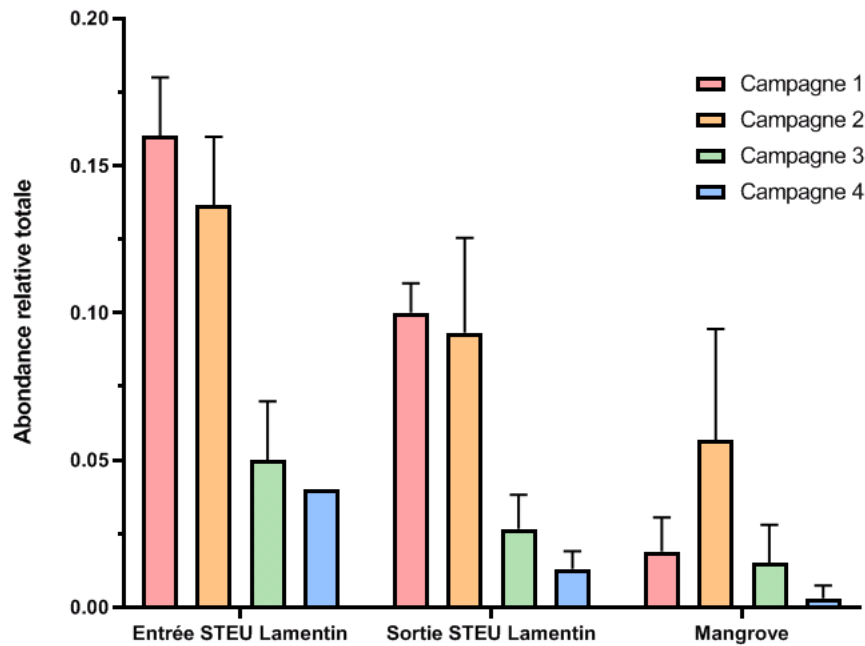


Figure 38 : Abondance relative totale moyenne ( $\pm$  SD) du résistome des échantillons collectés dans le continuum non touristique de la ville du Lamentin, incluant l'entrée et la sortie de la STEU du Lamentin ainsi que la mangrove recevant les eaux traitées, lors des 4 campagnes de prélèvements. La campagne 1 est représentée en rouge, la campagne 2 en orange, la campagne 3 en vert et la campagne 4 en bleu.

D'après les données de l'abondance proportionnelle, le résistome semble stable sur les trois semaines de prélèvement, il varie également peu entre les campagnes. La troisième campagne est la plus différente des quatre, avec ici aussi la quasi-absence de gènes de résistance aux QAC.

Les trois sites ont aussi un résistome très similaire. Les gènes de résistance aux aminosides y sont les plus abondants, ils représentent en moyenne 13.8% dans les eaux de l'entrée de la STEU, 22% en sortie et 20% dans la mangrove. Dans la mangrove, outre les gènes de résistance aux aminosides, les gènes de résistance aux QAC et aux sulfamides font partie des plus abondants, avec en moyenne respectivement 8.2 % et 5.6 %, 10.9 % et 8.3 % et 27.3 % et 13.7 % en entrée, en sortie et dans la mangrove (moyenne calculée sans prendre en compte la troisième campagne pour les gènes de résistance aux QAC car ils étaient étonnamment peu présents).

Les EGM représentent ici aussi une grande proportion du résistome. Leur abondance moyenne est de 30.2 %, 30.3 % et 24.2 % en entrée de STEU, en sortie de STEU et dans la mangrove respectivement, offrant donc la possibilité d'échanges de gènes de résistance entre les bactéries (**Figure 39**). L'entrée et la sortie de la STEU ainsi que la mangrove ont également un profil de résistance ressemblant à celui du continuum du Gosier.

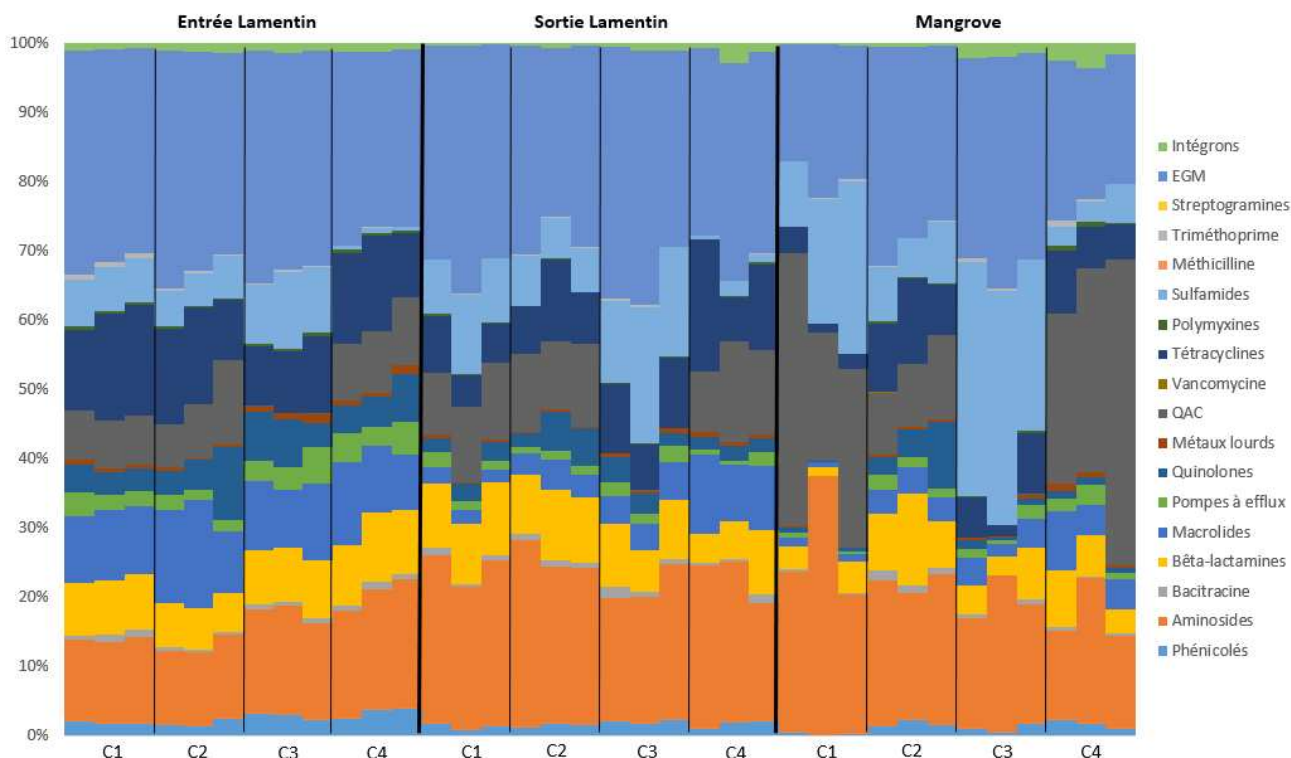


Figure 39 : Abondance proportionnelle du résistome des échantillons collectés dans le continuum non touristique de la ville du Lamentin, incluant l'entrée et la sortie de la STEU du Lamentin ainsi que la mangrove recevant les eaux usées, lors des trois semaines de prélèvement de chacune des quatre campagnes d'échantillonnage

Concernant la sélection de gènes d'intérêts, les gènes *aac(6')-Ib*, *aph(3')-III*, *blaTEM*, *ermB*, *qnrS*, *tetM* et *sulI* sont les plus abondants particulièrement dans le résistome en entrée de STEU, tout comme ils l'étaient dans le continuum touristique et dans le continuum du CHUG. L'abondance de certains de ces gènes est favorisée ou se maintient élevée le long du continuum ; c'est le cas des gènes *blaTEM*, *ermB*, *qnrS* et *tetM* ou des gènes *aac(6')-Ib* et *sulI*. Ces deux gènes sont toujours fortement présents dans les eaux de la mangrove, présentant donc un risque pour la santé humaine si la population rentre en contact avec celle-ci. Ces gènes sont d'autant plus abondants dans les deux premières campagnes de prélèvement. Les autres gènes sont, quant à eux, présents à de faibles abondances (**Figure 40**).

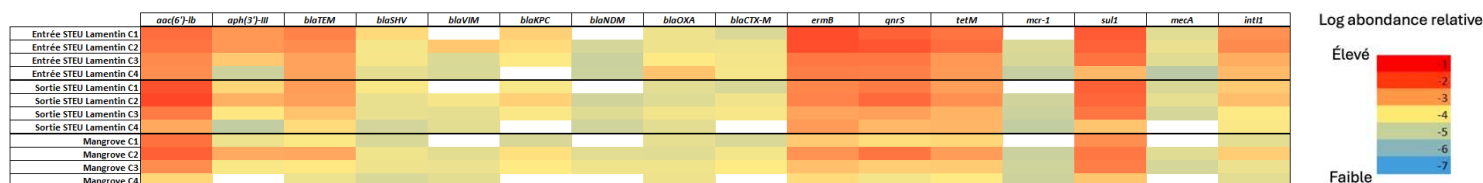


Figure 40 : Heatmap représentant l'abondance relative moyenne des gènes d'intérêt sélectionnés pour les quatre campagnes dans chacun des sites étudiés : entrée et sortie de la STEU du Lamentin et la mangrove. La couleur rouge représente les gènes les plus abondants, le bleu les gènes les moins abondants, la couleur jaune une abondance moyenne et la couleur blanche signifie que le gène n'est pas détecté.

En conclusion, chacun des continuums est caractérisé par une grande diversité bactérienne potentiellement porteuse de gènes de résistance dont une importante diversité a été retrouvée et un exposome complexe.

Dans le premier continuum allant du CHUG à la STEU de Jarry pour finir dans l'océan, qui représente ici l'environnement récepteur, avec ses populations animales locales, les eaux usées de l'hôpital sont les eaux où l'on retrouve les plus grandes concentrations en exposome et les plus grandes abondances du résistome. Celles-ci diminuent le long du continuum notamment grâce au traitement de la STEU. Le résistome des animaux est lui très faible en comparaison avec les eaux de l'hôpital et de l'entrée de la STEU. Une grande diversité de bactéries, correspondant majoritairement au microbiote intestinal humain, a été retrouvée dans ce continuum montrant l'impact humain sur le microbiome des eaux des STEU.

Le second continuum, comparant les effluents du contenu des toilettes d'avions avec une ville ayant une forte activité touristique, Gosier, et une ville avec une faible activité touristique, Lamentin, a montré une abondance du résistome plus élevée dans les toilettes d'avions que dans les autres sites. Les bactéries sont exposées à un exposome plus important dans le poste de refoulement recevant les eaux usées des hôtels et dans les eaux de l'entrée des deux STEU. Une diminution de l'exposome et du résistome est observée le long du continuum suite au traitement par les STEU. Le microbiome des toilettes des avions est fortement influencé par le microbiome des passagers, il est caractérisé par la présence uniquement de bactéries du microbiote intestinal humain. Comme dans le premier continuum une partie du microbiome des eaux collectées au niveau des STEU est composé de bactéries du microbiote intestinal humain mélangé à des bactéries environnementales.

La **Figure 41** résume l'évolution des concentrations des composés de l'exposome et de l'abondance relative du résistome.

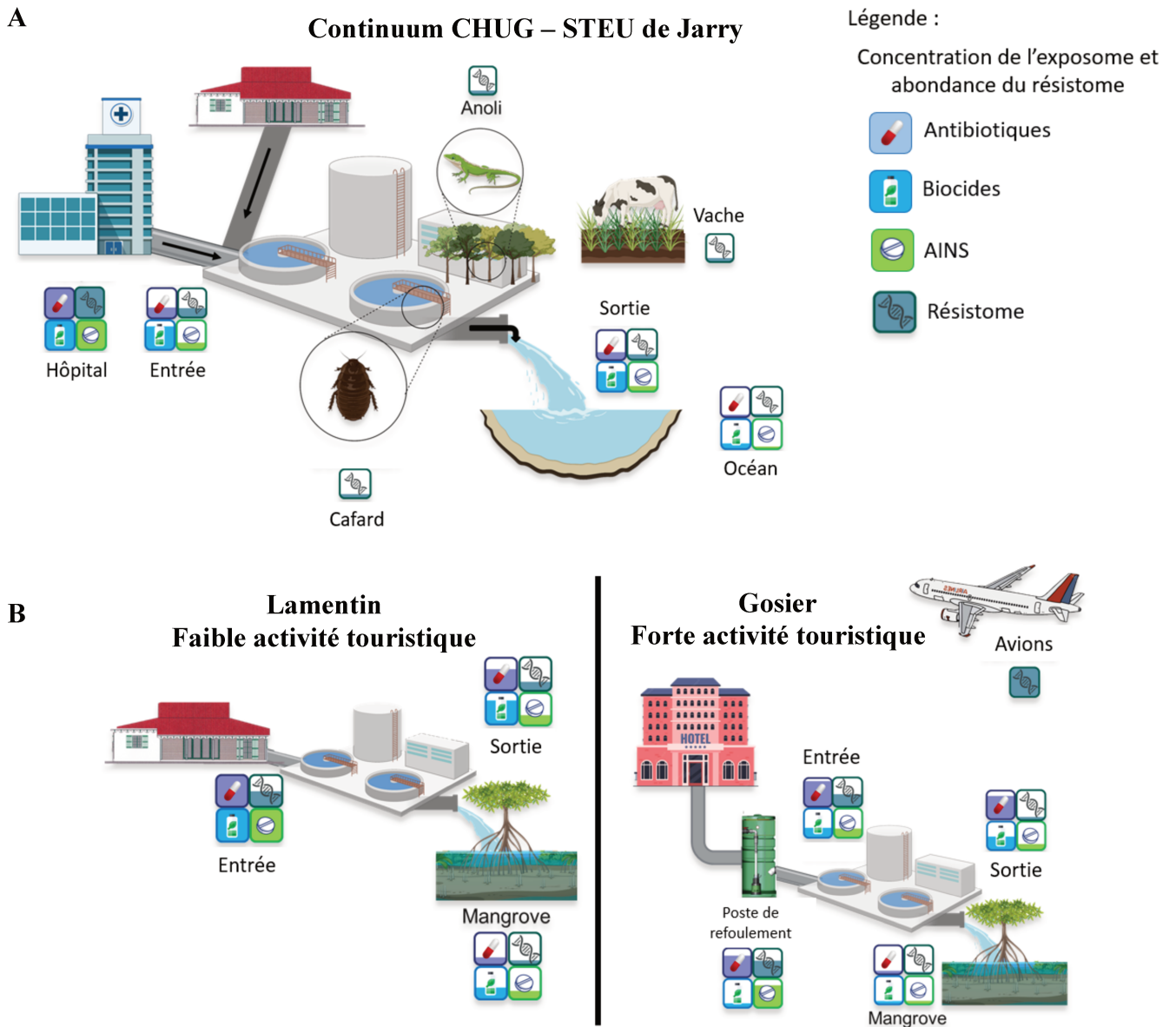


Figure 41 : Évolution des concentrations des composés de l'exposome (antibiotiques, biocides et AINS) et de l'abondance relative du résistome le long du continuum **A.** CHUG – STEU de Jarry et **B.** non touristique (Lamentin) et touristique (Gosier). Plus la box est remplie plus la concentration ou l'abondance est élevée.

## II. Facteurs pouvant impacter la résistance

### II.1. Impact de la pandémie de COVID-19 sur la résistance

La maladie infectieuse dénommée COVID-19 apparue en 2019 et devenue pandémique est d'origine virale, due au virus Sars-CoV-2 et n'est donc pas traitable par antibiothérapie. Cependant, dans certaines infections respiratoires virales, comme la grippe, des surinfection par des bactéries sont possibles nécessitant alors l'administration d'antibiotiques (Rizvi and Ahammad 2022). De ce fait, et devant la non-connaissance de cette pathologie nouvelle, environ 70% des patients ont été traités avec des antimicrobiens, antibiotiques, biocides, durant

la pandémie de COVID-19, tandis que seulement 3 à 8% de ces patients avaient une co-infection bactérienne ou fongique. On s'interroge par ailleurs sur cette surconsommation d'antibiotiques (Sulayyim et al. 2022; Langford et al. 2023; Lansbury et al. 2020). Pendant cette période les pénicillines, les associations avec inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, les céphalosporines, les carbapénèmes, les macrolides et les anti-SARM ont vu leur consommation augmenter de 7 %, 17 %, 30 %, 66 %, 138 % et 48 % respectivement (Junot et al. 2020). Les antibiotiques n'étaient pas les seuls composés massivement utilisés pendant la pandémie : les biocides ont aussi été largement employés, pouvant provoquer indirectement une pression plus importante conduisant à la résistance aux antibiotiques.

La majorité des études ont fait état d'un taux de résistance élevé pendant la pandémie de COVID-19. La résistance a particulièrement augmenté chez les bactéries pathogènes à Gram négatif comme *Acinetobacter* spp ou les entérobactériales productrices de BLSE. De plus, c'est dans les pays à revenus faibles et moyens que la probabilité que les isolats soient résistants aux antimicrobiens était plus élevée, jusqu'à 10 fois plus que dans les pays à revenus élevés (Langford et al. 2023). Les facteurs de risque associés à un niveau élevé de résistance pendant la pandémie étaient l'auto-médication, l'administration empirique d'antibiotiques et les antibiotiques prescrits de manière trop systématique en médecine de ville (Sulayyim et al. 2022).

La première campagne de prélèvement de cette étude ayant commencé fin juin 2021, elle a été impactée par la pandémie. En effet, à cette période, le taux d'incidence en Guadeloupe était en augmentation avec un taux d'incidence de 721/100 000 habitants et un taux de positivité de 20.9% lors de la première semaine de prélèvement. Ce phénomène s'est intensifié au cours des semaines pendant lesquelles la campagne de prélèvement a eu lieu : lors de la troisième semaine de cette campagne le taux de positivité était de 22.5%, avec un taux d'incidence de 1 056/100 000 habitants ([www.guadeloupe.gouv.fr](http://www.guadeloupe.gouv.fr)).

Pour constater un effet de la pandémie de COVID-19 sur cette étude nous allons nous intéresser plus particulièrement au continuum CHUG – STEU de Jarry, comprenant à la fois les données de l'hôpital mais aussi de la communauté, en comparant la campagne 1 impactée par la pandémie et les trois autres campagnes non impactées, sur les données de résistance, de microbiome et d'exposome.

### II.1.1. Influence sur l'exposome

L'analyse de l'exposome dans la partie précédente a montré que les résidus d'antibiotiques et les résidus de biocides ne sont pas retrouvés en plus forte concentration dans les échantillons de la première campagne alors que leur utilisation a été plus importante lors de la pandémie de COVID-19 (Junot et al. 2020). À l'inverse, les concentrations en molécules pharmaceutiques non-antibiotiques sont significativement plus élevées dans les eaux hospitalières lors de la campagne 1 que dans les trois autres campagnes. Le fait d'en retrouver une plus grande abondance peut avoir pour conséquence une augmentation des transferts de gènes de résistance, notamment par le phénomène de transformation (Yue Wang et al. 2020).

Une analyse en composante principale a été réalisée sur les données d'exposome des échantillons d'eaux de l'hôpital, de l'entrée et de la sortie de la STEU de Jarry en campagne 1, 2, 3 et 4, sans prendre en compte les métaux lourds pour ne pas biaiser les résultats puisqu'ils sont étonnement peu abondants en première et deuxième campagne. Les deux composantes principales extraites, Dim1 et Dim2, expliquent respectivement 29% et 23.2 % des différences



totales entre les résistome des eaux de l'hôpital, 30.9% et 16.9% de l'entrée de la STEU de Jarry et 25.9% et 20.3% de la sortie de cette même STEU.

Les ACP montrent pour les effluents de l'hôpital que toutes les campagnes sont différentes les unes des autres, avec des exposomes qui semblent spécifiques. Dans le cas de l'entrée de la station, la campagne 1 forme un cluster avec la campagne 4 tandis que les deux autres campagnes sont totalement différenciées. Il en est de même pour la sortie, la campagne 1 et 4 semble être proche tandis que les deux autres campagnes ne forment pas de cluster (**Figure 42**).

Les mesures de l'exposome n'ont été réalisées qu'en triplicat pour chaque campagne ne permettant donc pas d'avoir un grand nombre de points pour faire les analyses et d'être très représentatifs et donc peut-être de bien comprendre l'effet de la pandémie sur l'exposome.

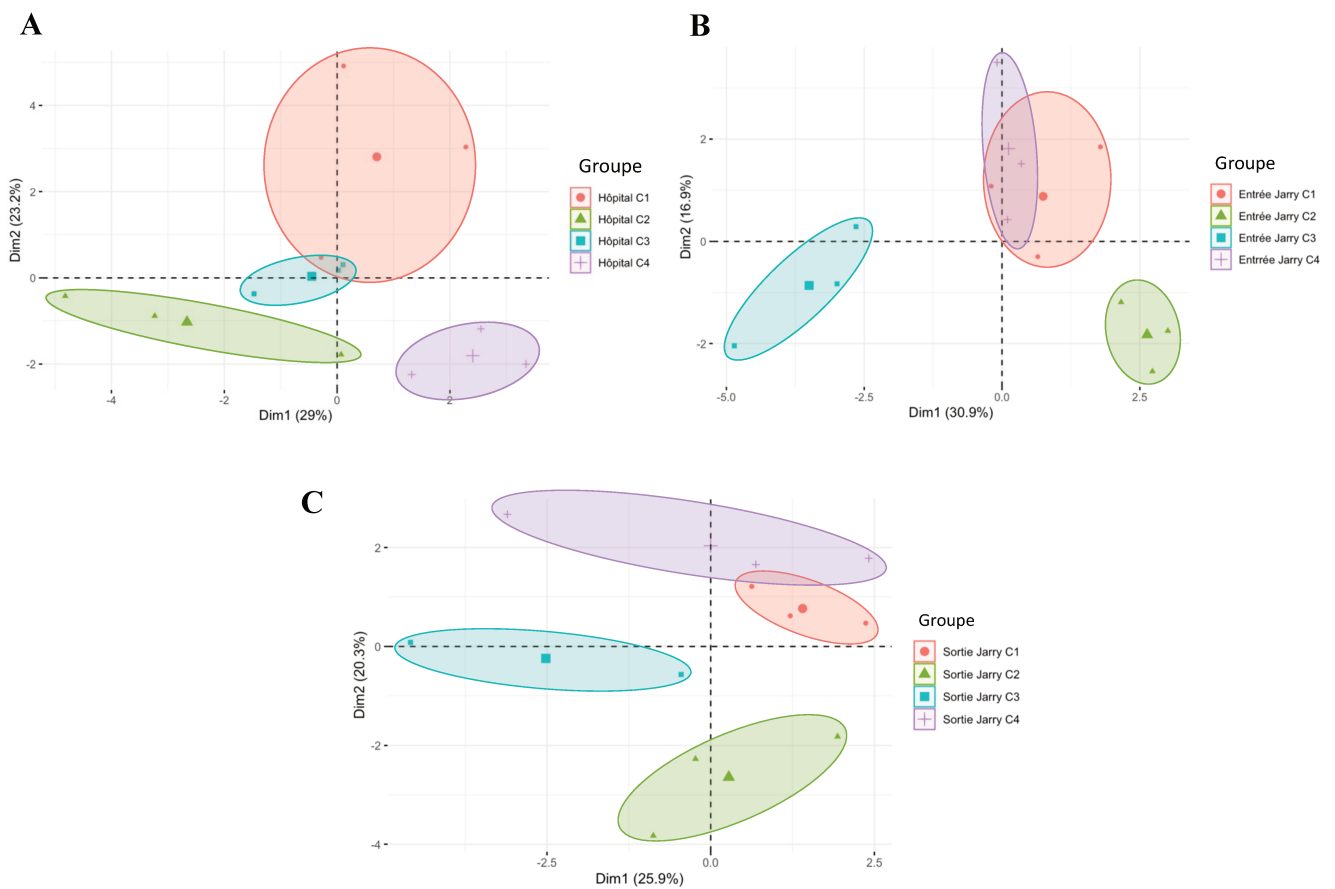


Figure 42 : Analyses en composantes principales de l'exposome des échantillons **A.** de l'hôpital, **B.** de l'entrée de la STEU de Jarry et **C.** de la sortie de la STEU de Jarry, collectés lors des quatre campagnes d'échantillonnage entre 2021 et 2023. Les points rouges représentent la campagne 1, les points verts la campagne 2, les points bleus la campagne 3 et les points violets la campagne 4.

### II.1.2. Influence sur le microbiome

Les résultats précédents de l'analyse du microbiome montraient peu de variation dans la composition du microbiome entre les quatre campagnes au niveau de l'entrée de la STEU. Au contraire, plus de variabilité était observée dans les eaux du CHUG et de la sortie de la STEU. Cette variation était observée sur les quatre campagnes et pas uniquement sur la première.



Des ACP du microbiome dans les échantillons du continuum CHUG – STEU de Jarry, des campagnes 1 à 4 ont été réalisées et présentées en **Figure 43**. Les deux dimensions expliquent respectivement 35.1% et 18.4% des différences du microbiome des échantillons des effluents du CHUG, 43.2% et 14.3% des différences dans les eaux de l'entrée de la STEU et enfin 37.3% et 14.9% des différences dans les eaux de la sortie de la station.

Les résultats montrent que les échantillons de chacune des campagnes se regroupent à l'exception de l'entrée de la station où les échantillons de la première campagne semblent se séparer des autres campagnes. Les résultats montrent de plus grandes différences du microbiome au niveau de l'entrée de la station entre la campagne 1 et les deux autres campagnes mais peu de différences au niveau des autres sites.

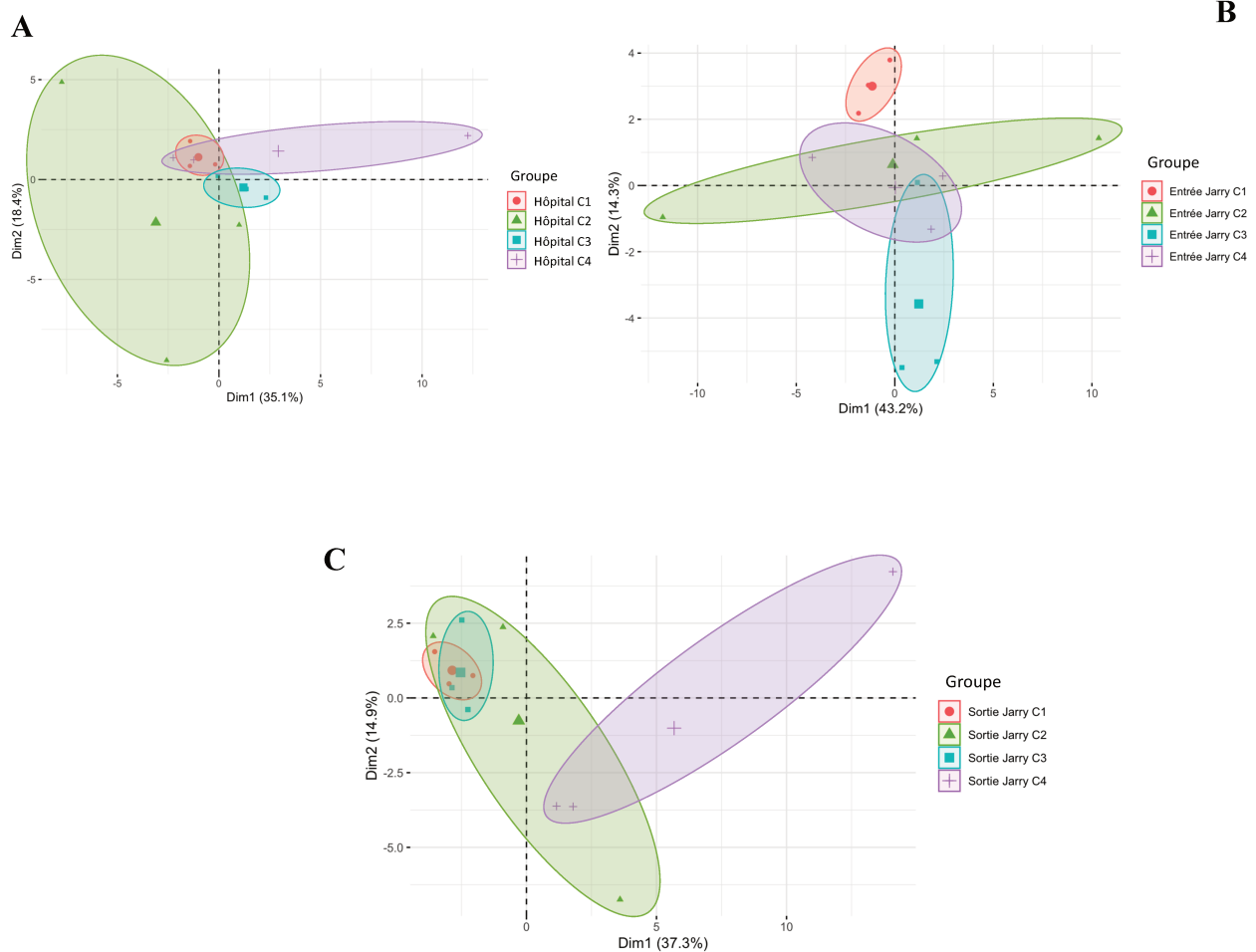


Figure 43 : Analyses en composantes principales du microbiome des échantillons **A.** de l'hôpital, **B.** de l'entrée de la STEU de Jarry et **C.** de la sortie de la STEU de Jarry, collectés lors des quatre campagnes d'échantillonnage entre 2021 et 2023. Les points rouges représentent la campagne 1, les points verts la campagne 2, les points bleus la campagne 3 et les points violets la campagne 4.

### II.1.3. Influence sur le résistome

Comme il a été montré précédemment dans les résultats de l'analyse du résistome, l'abondance relative totale du résistome était significativement plus élevée lors de la première campagne dans les échantillons des eaux usées hospitalières, en entrée et en sortie de station d'épuration. La différence est d'autant plus marquée dans les eaux usées hospitalières. Toutefois, il y avait également des différences significatives entre les campagnes 2, 3 et 4 mais qui étaient moins importantes qu'avec la campagne 1.

La **Figure 44** représente le logarithme de l'abondance relative de chacune des familles de gènes dans les échantillons d'eaux usées hospitalières collectés lors de chacune des campagnes de prélèvement.

Les résultats montrent que l'abondance relative de la majorité des familles de gènes est également plus élevée dans les échantillons de la première campagne. En effet, dans les eaux usées hospitalières, les gènes de résistance aux phénicolés, aux aminosides, aux bêta-lactamines, aux macrolides, aux quinolones, aux QAC, aux tétracyclines, aux polymyxines, aux sulfamides et au triméthoprime sont retrouvés significativement en plus forte abondance dans la première campagne que dans les 3 autres. Les éléments génétiques mobiles ainsi que les intégrons sont également plus abondants dans la campagne 1. Le fait de retrouver ces éléments permet d'augmenter les transferts horizontaux des gènes de résistance chez les bactéries. Dans la littérature il a notamment été montré l'augmentation de l'abondance des gènes de résistance aux aminosides et sulfamides durant la pandémie (Liang Zhao et al. 2023).

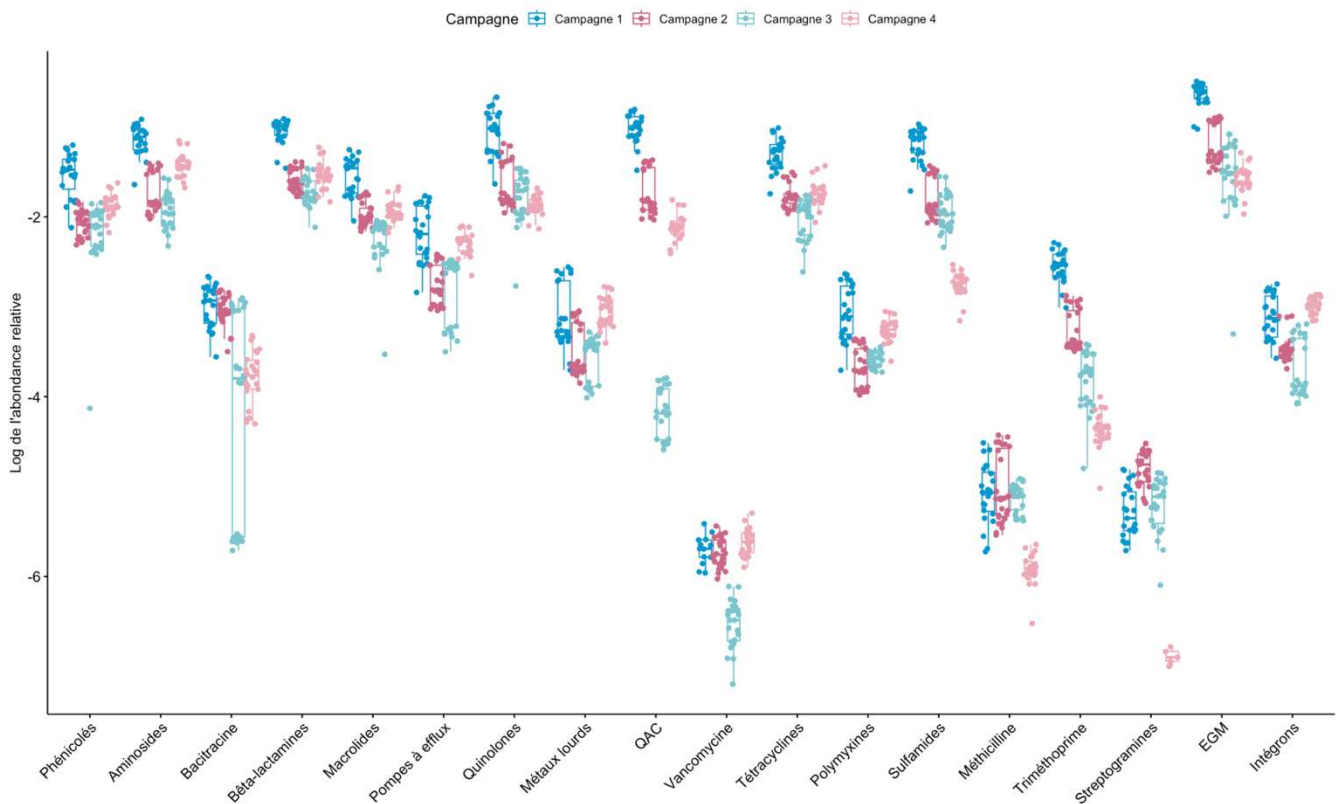


Figure 44 : Logarithme de l'abondance relative des différentes familles de gènes dans les eaux hospitalières des échantillons collectés lors des campagne 1, 2, 3 et 4. Sont représentés en bleu foncé tous les réplicats de la campagne 1, en rose foncé la campagne 2, en bleu clair la campagne 3 et en rose clair la campagne 4.

Dans la liste des gènes d'intérêt sélectionnés, certains gènes étaient également plus abondants dans la première campagne de prélèvements que dans les 3 autres. Il s'agissait du gène de résistance aux aminosides *aac(6')-Ib*, des gènes de résistance aux bêta-lactamines *blaTEM*, *blaVIM* et *blaKPC*, du gène de résistance aux macrolides *ermB*, du gène de résistance aux quinolones *qnrS* et du gène de résistance aux sulfamides *sull*. L'abondance des gènes de résistance aux sulfamides, incluant le gène *sull*, a notamment été montré comme significativement plus élevée pendant la pandémie dans une autre étude (Liang Zhao et al. 2023).

Des ACP du résistome ont été réalisées sur les échantillons des effluents de l'hôpital, de l'entrée et de la sortie de la STEU de Jarry, pour chacune des campagnes. Deux composantes principales extraites, Dim1 et Dim2, expliquent respectivement 62.6% et 16 % des différences totales entre les résistomes des eaux de l'hôpital, 57.9% et 25.1% de l'entrée de la STEU de Jarry et 30.4% et 22.9% de la sortie de cette même STEU.

Les données montrent que les eaux de l'hôpital, l'entrée et la sortie de la STEU de la première campagne semblent former un cluster différent des échantillons des autres campagnes. Pour chacun des sites les campagnes 2 et 3 forment un seul et même cluster. En revanche la campagne 4 n'appartient pas non plus à ce cluster, sauf exception au niveau de la sortie de la STEU où elle est incluse dans le cluster avec les campagnes 2 et 3 (**Figure 45**). Les résultats indiquent donc un résistome différent dans les échantillons de la campagne 1 par rapport aux autres campagnes.

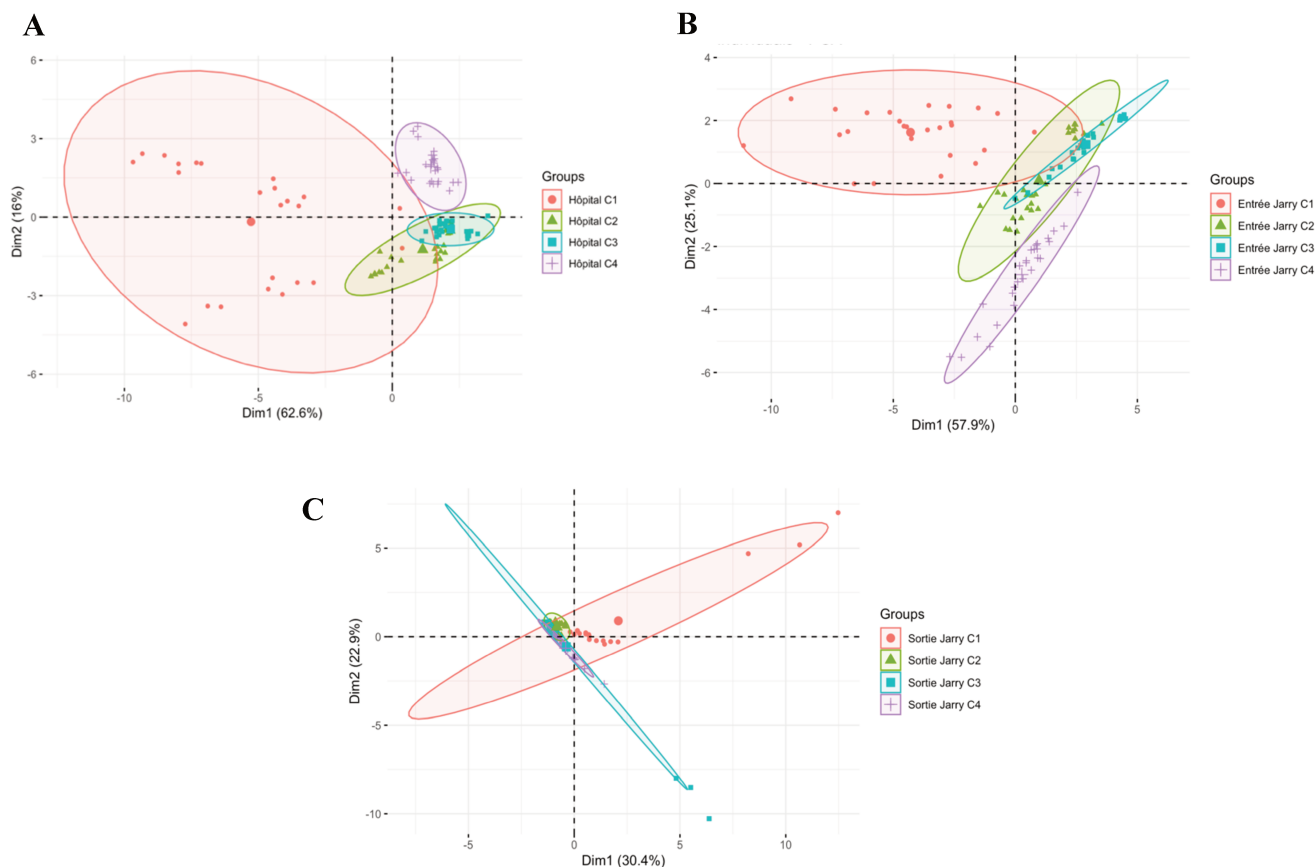


Figure 45 : Analyses en composantes principales du résistome des échantillons **A.** de l’hôpital, **B.** de l’entrée de la STEU de Jarry et **C.** de la sortie de la STEU de Jarry, collectés lors des quatre campagnes d’échantillonnage entre 2021 et 2023. Les points rouges représentent la campagne 1, les points verts la campagne 2, les points bleus la campagne 3 et les points violets la campagne 4

Les résultats nous permettent de confirmer que la pandémie a pu avoir des conséquences sur le résistome. En effet, les échantillons de cette campagne avaient des abondances relatives totales du résistome plus élevées que dans les autres campagnes, une plus forte présence de certaines classes de gènes et de certains gènes d’intérêt. Ces conséquences ont pu être détectées grâce à la surveillance des eaux usées réalisée dans ce travail de thèse indiquant que les effluents seraient bien un reflet de l’activité humaine. Mais il est plus difficile de modifier les microbiomes. Changer le microbiome des écosystèmes demanderait sûrement un temps de pression de sélection plus long. L’influence sur l’exposome est aussi complexe à évaluer et ne nous permet pas ici de voir si la pandémie a eu un impact mais dans le cadre de la surveillance des eaux usées il est important de le mesurer puisqu’il pourrait expliquer certains phénomènes que l’on observerait au niveau du résistome.

La première campagne ayant été impactée par la pandémie et pour éviter des biais d’interprétation des résultats, elle ne sera pas prise en compte dans les analyses des prochaines parties.

## II.2. Influence de la saisonnalité sur la résistance

Plusieurs études ont montré une variabilité de la consommation en antibiotiques en fonction des saisons dans des pays soumis à des climats tempérés, considérant que lors de la saison hivernale,

les prescriptions d'antibiotiques étaient plus élevées que pendant le reste de l'année. Globalement une augmentation de 21% à 42% était observée (Suda et al. 2014; Ferech et al. 2006; Elseviers et al. 2007; Achermann et al. 2011; L. Sun, Klein, and Laxminarayan 2012). Cet accroissement de l'utilisation des antibiotiques serait lié à une plus grande incidence des infections des voies respiratoires pendant l'hiver avec des surinfections bactériennes qui nécessiteraient une antibiothérapie. Il a été montré que la prévalence de *E. coli* résistants était significativement corrélée aux prescriptions d'antibiotiques, avec un décalage de 1 mois, pour les aminopénicillines et les fluoroquinolones qui étaient fortement prescrites, mais n'était pas corrélée aux classes d'antibiotiques dont les niveaux de prescription étaient plus faibles. Les prescriptions de fluoroquinolones étaient également significativement corrélées, avec un décalage d'un mois, à la prévalence du SARM résistant à la ciprofloxacine (L. Sun, Klein, and Laxminarayan 2012).

Deux saisons se distinguent en Guadeloupe, une saison sèche et une saison humide. La saison sèche est la saison la plus chaude, avec moins de pluie et l'humidité est plus faible. La saison humide est caractérisée par plus d'averses ; les ouragans et les cyclones sont également plus fréquents à cette période.

Les caractéristiques météorologiques, températures moyennes et précipitations, des différentes villes sélectionnées dans cette étude sont décrites dans le **Tableau 16** pour les campagnes 2, 3 et 4.

Tableau 16 : Températures minimales et températures maximales moyennes (en °C), précipitation pour chacun des sites 2 jours, 1 jour avant ou le jour du prélèvement (en mm) pour les villes de Jarry, Gosier et Lamentin des campagnes d'échantillonnage 2, 3 et 4.

		Température minimale moyenne	Température maximale moyenne	Précipitation J-2 (mm)	Précipitation J-1 (mm)	Précipitation J0 (mm)
Jarry	Campagne 2	23	27,7	2,33	1,67	1,67
	Campagne 3	26,3	31	3,47	1,6	1,47
	Campagne 4	23	28	1,47	1,33	0,8
Gosier	Campagne 2	23	28	1,67	1,33	1,67
	Campagne 3	25,3	31	2	1	1,67
	Campagne 4	24	26,3	1,67	0,67	0,8
Lamentin	Campagne 2	23	28	1,67	1,33	1,67
	Campagne 3	25,3	31	2	1	1,67
	Campagne 4	22,7	28,3	2,57	1,47	1,8

Les campagnes qui ont été réalisées pendant la saison sèche (campagnes 2 et 4) sont caractérisées par des températures minimales et maximales moyennes moins élevées que lors de la saison humide (campagne 3) mais des précipitations à J-2, J-1 et J0 plus faibles même si les différences ne sont pas grandes pendant la période de prélèvement. Nous nous sommes demandé si ces différences entre les deux saisons pourraient avoir des conséquences sur le résistome, le microbiome et l'exposome des différents sites étudiés.

Pour la suite, les analyses ont été basées sur les échantillons de chacun des continuums et ce pour les campagnes 3 et 4 qui ont eu lieu à deux saisons différentes, la campagne 3 en saison humide et la campagne 4 en saison sèche. La campagne 4 a été choisie car elle est plus représentative de la saison sèche, avec moins de précipitations que la saison 2.

### II.2.1. Influence sur l'exposome

Les analyses de l'exposome sur ces échantillons avaient montré globalement que dans la majorité des cas les concentrations des composés mesurés étaient plus élevées dans les échantillons de la campagne 3 que de la campagne 4. C'était notamment le cas pour les concentrations d'AINS et de biocides dans le continuum CHUG - STEU de Jarry, les concentrations en AINS et en métaux lourds pour le continuum du Gosier, les concentrations en antibiotiques, en AINS, en biocides et en métaux lourds pour le continuum du Lamentin, à l'exception de certains sites comprenant les eaux usées de l'hôpital pour les AINS et les biocides et la sortie de la STEU du Gosier pour les métaux lourds.

Une ACP a été réalisée afin de visualiser les données de l'exposome sur les échantillons des campagnes 3 et 4. Les deux composantes principales extraites, Dim1 et Dim2, expliquent respectivement 27.3 % et 16.3 % des différences totales entre l'exposome des échantillons du continuum CHUG – STEU de Jarry, 26.6 % et 22.1 % du continuum du Lamentin et 22.3 % et 15.2 % du continuum du Gosier.

Pour le continuum du CHUG, seuls les échantillons de la sortie de station des deux campagnes et l'entrée de la STEU de la campagne 4 se regroupent, les autres échantillons sont dispersés et ont donc un exposome plus différent. L'ACP du continuum du Lamentin montre, quant à elle, que tous les échantillons sont regroupés au sein d'un même cluster, à l'exception de l'entrée de la STEU en campagne 3, éloignée de ce cluster. Enfin pour le continuum du Gosier, les résultats de l'ACP montrent que le poste de refoulement ainsi que l'entrée et la sortie de la STEU de la campagne 3 forment un cluster, l'entrée et la sortie de la STEU de la campagne 4 forment un deuxième cluster puis les mangroves des deux campagnes forment également un troisième cluster. Le poste de refoulement de la quatrième campagne quant à lui n'appartient à aucun de ces clusters (**Figure 46**).

Une distinction est donc bien présente entre les échantillons de la saison humide et ceux de la saison sèche montrant un effet de la saisonnalité sur l'exposome dans ces continuums à l'exception de la mangrove.

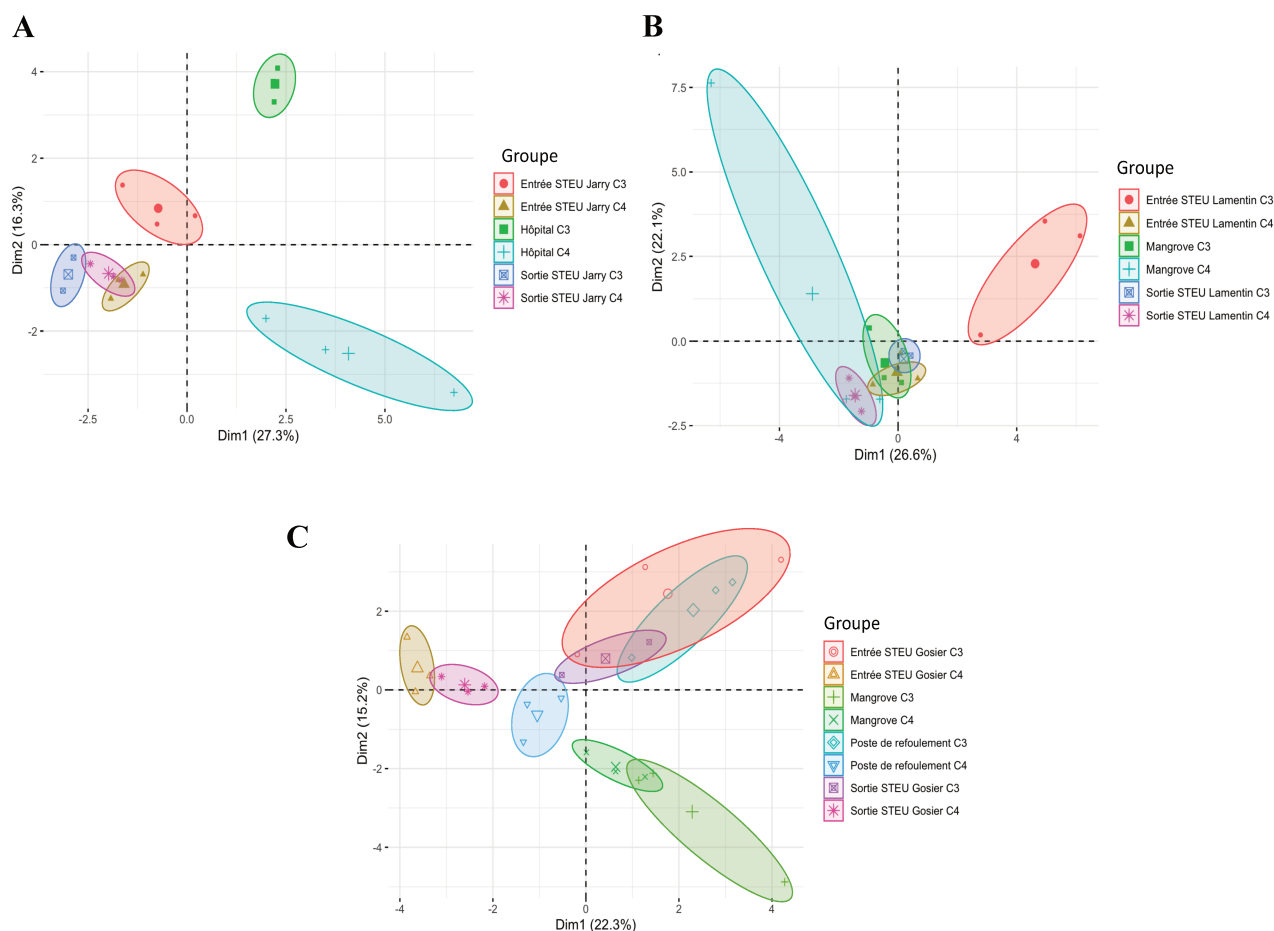


Figure 46 : Analyse en composantes principales de l'exposome des échantillons collectés **A.** à l'hôpital, en entrée et en sortie de la STEU de Jarry, **B.** en entrée et en sortie de la STEU du Lamentin et dans la mangrove et **C.** dans le poste de refoulement, en entrée et en sortie de la STEU du Gosier et dans la mangrove, au cours des campagnes d'échantillonnage 3 et 4.

## II.2.2. Influence sur le microbiome

Les résultats de l'analyse du microbiome dans les différents continums montraient une ressemblance dans la composition du microbiome entre les campagnes 3 et 4, plus particulièrement pour les sites des continums CHUG – STEU de Jarry et du Gosier. La ressemblance était également visible au niveau de l'entrée de la STEU du Lamentin mais ce n'était pas le cas dans les échantillons de la sortie de cette STEU et dans la mangrove.

Dans le cas présent, d'après les ACP, les dimensions 1 et 2 n'expliquent au total que 53.9%, 59.3% et 49.5% de la variance du microbiome dans les échantillons du continuum du CHUG, du Lamentin et du Gosier respectivement. Les ACP du microbiome ne montrent pas la même nette distinction qu'il y avait entre les deux saisons pour le résistome. En effet, pour le continuum du CHUG les échantillons des eaux usées de l'hôpital des 2 saisons se regroupent : les différences ne sont observées qu'au niveau de l'entrée et de la sortie de la STEU car les échantillons de ces sites ne se regroupent pas. Il en est de même pour le continuum du Lamentin,

les échantillons de l'entrée de la station des deux campagnes forment un cluster et les échantillons de la sortie de la STEU et de la mangrove forment un deuxième cluster, sans distinctions entre la saison sèche et la saison humide. Concernant le continuum du Gosier, il n'y a pas non plus de distinctions entre les deux campagnes de prélèvements. Les échantillons du poste de refoulement, de l'entrée de la station et de la mangrove se regroupent tandis que les échantillons de la sortie de la STEU des campagnes 3 et 4 sont plus distincts mais sont proches l'un de l'autre, indiquant donc peu de différences (**Figure 47**).

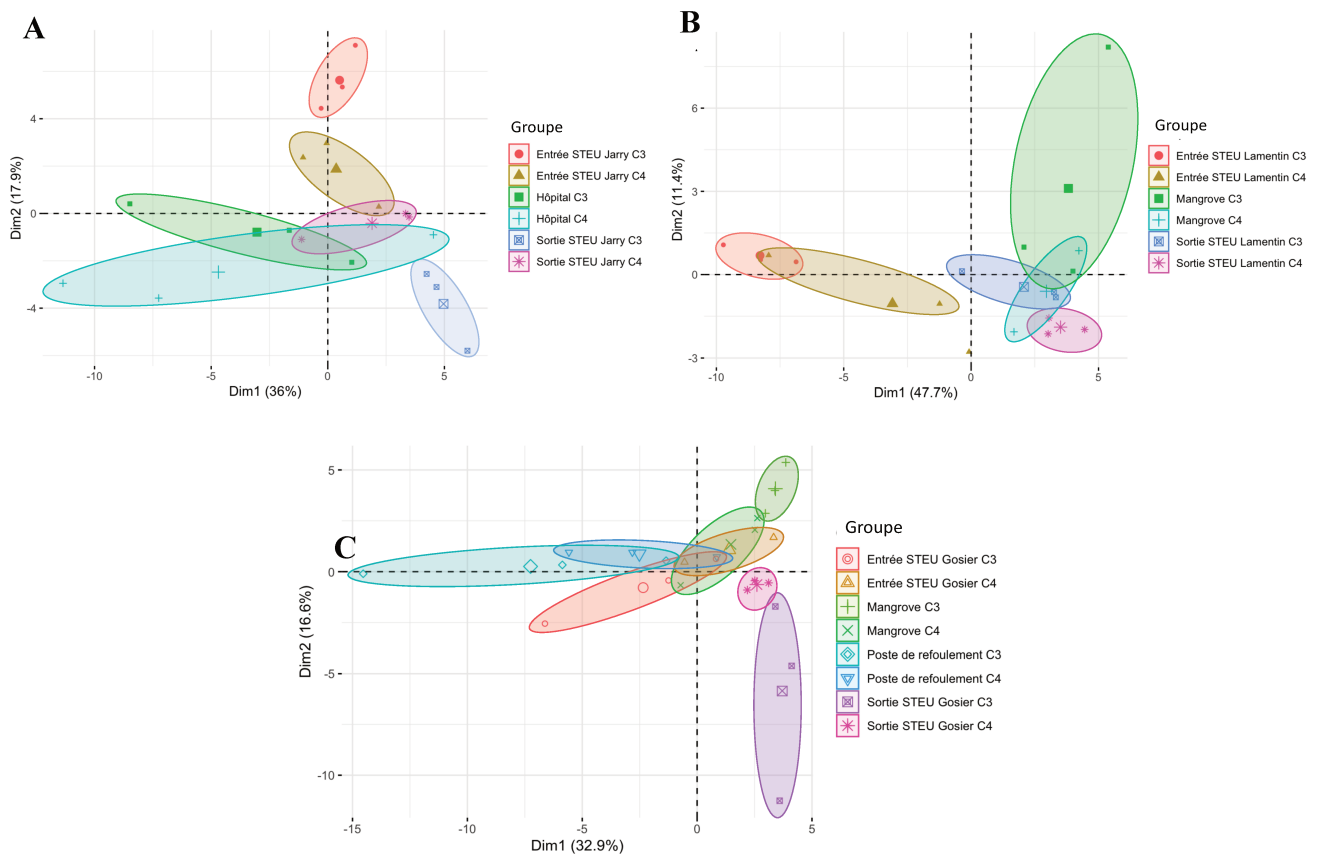


Figure 47 : Analyse en composantes principales du microbiome des échantillons collectés **A.** à l'hôpital, en entrée et en sortie de la STEU de Jarry, **B.** en entrée et en sortie de la STEU du Lamentin et dans la mangrove et **C.** dans le poste de refoulement, en entrée et en sortie de la STEU du Gosier et dans la mangrove, au cours des campagnes d'échantillonnage 3 et 4.

### II.2.3. Influence sur le résistome

Comme indiqué dans les parties précédentes sur l'analyse du résistome, outre la campagne 1 qui comme mentionné précédemment a été impactée par la pandémie de COVID-19, des différences significatives au niveau de l'abondance relative totale ont été observées entre la campagne 2 et 3 et entre la campagne 3 et 4 dans certains sites du continuum CHUG – STEU de Jarry. À l'inverse, aucune différence significative n'a été montrée entre ces deux campagnes pour les continuums du Gosier et du Lamentin. De plus, dans chacun des continuums, le résistome avait une signature similaire entre les deux saisons. Concernant les gènes d'intérêt, certains d'entre eux avaient une abondance différente entre les deux campagnes.



Pour étudier l'effet des saisons sur le résistome, des ACP ont été réalisées sur les données des prélèvements des échantillons des continuums du CHUG – STEU de Jarry, du Lamentin et du Gosier pour les campagnes 3 et 4 et sont présentées en **Figure 48**. Les deux dimensions extraites expliquent une grande proportion de la variance, au total 80.2%, 84.9% et 63.5% des différences du résistome dans le continuum CHUG – STEU de Jarry, le continuum non-touristique du Lamentin et le continuum touristique du Gosier respectivement.

Les résultats montrent une séparation entre les 2 saisons. En effet, nous observons, notamment pour le début des continuums, deux clusters distincts, un cluster regroupant les échantillons de la saison humide tandis que l'autre regroupe les échantillons de la saison sèche. Les points de prélèvements de fin de continuums, sortie de station et mangroves, sont en revanche moins différents entre les deux saisons.

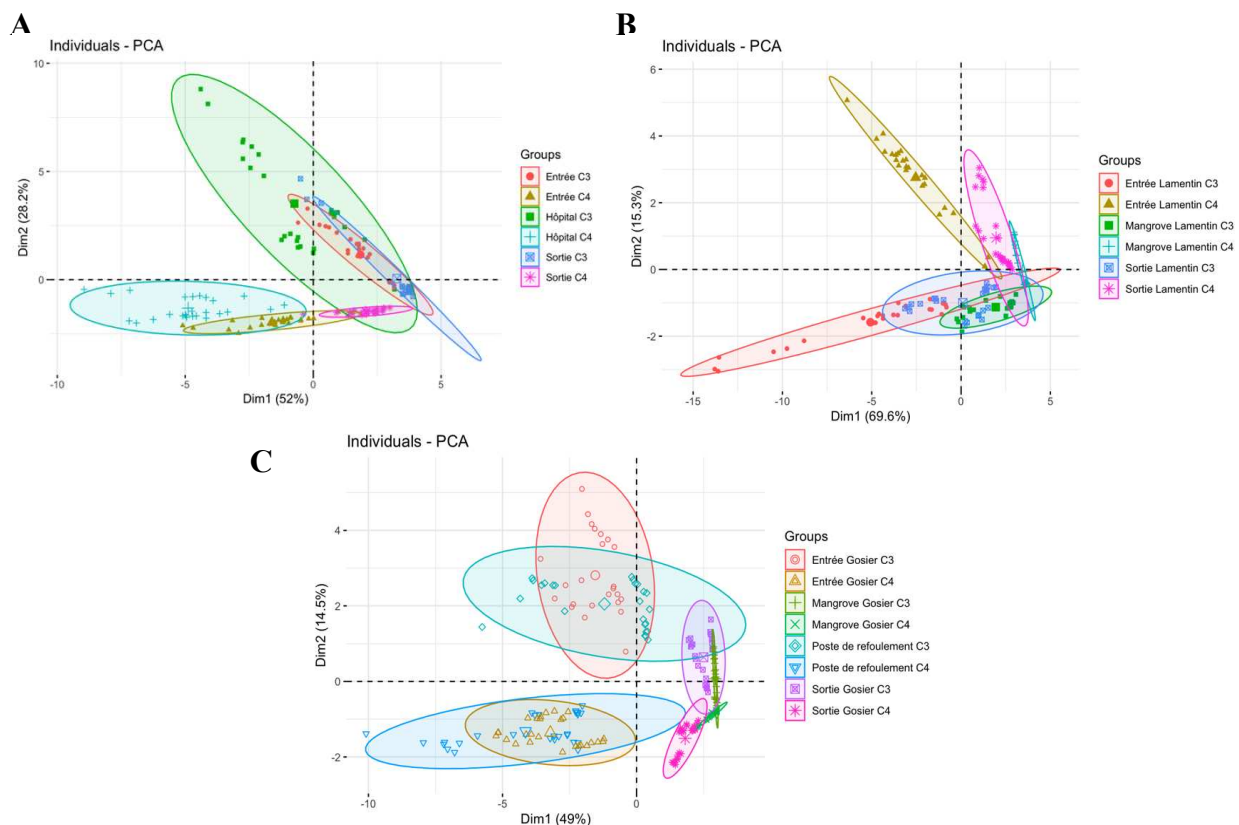


Figure 48 : Analyse en composantes principales du résistome des échantillons collectés **A.** à l'hôpital, en entrée et en sortie de la STEU de Jarry, **B.** en entrée et en sortie de la STEU du Lamentin et dans la mangrove et **C.** dans le poste de refoulement, en entrée et en sortie de la STEU du Gosier et dans la mangrove, au cours des campagnes d'échantillonnage 3 et 4.

Les résultats montrent que la saisonnalité aurait plus particulièrement un impact sur le résistome et l'exposome et ce dans chacun des continuums, mais son impact est diminué en arrivant à la fin du continuum, notamment dans les eaux de la mangrove.

L'effet des saisons est discuté dans la littérature, certains montrent un effet sur la résistance suivant les saisons (Honda et al. 2023), d'autres non (Buelow et al. 2020). L'effet pourrait dépendre de la différence entre les saisons, plus les saisons seraient contrastées plus on pourrait

s'apercevoir de l'impact des saisons. Le changement climatique et les conséquences associées pourraient notamment avoir un rôle important sur la résistance (Burnham 2021).

Il n'est donc pas simple de déterminer l'effet de la saison, mais c'est un paramètre important à prendre en compte dans les métadonnées en ayant au moins un point à un temps sec et un point à un temps humide.

### II.3. Évaluation du risque de l'exposome sur la résistance

Comme il a été décrit en introduction, une controverse existe quant à l'effet de l'exposome sur la résistance aux antibiotiques. Certaines études ne montrent pas d'effets tandis que d'autres montrent des effets de co- et cross-sélection de la résistance aux antibiotiques par le biais de la présence de résidus de molécules pharmaceutiques, de biocides ou encore de métaux lourds.

Leur impact dans l'environnement et sur la résistance dépend notamment de leur élimination par la STEU. C'est pourquoi l'efficacité de l'élimination de ces composés par les différentes STEU échantillonnées dans cette étude a été estimée. Suivant leur élimination, les concentrations des résidus de ces molécules de l'exposome vont potentiellement exercer un effet de (co-)sélection et représenter un risque plus ou moins élevé pour l'environnement. Ces risques sont estimés grâce à la comparaison avec les concentrations prédites sans effet (PNEC), les concentrations co-sélectives minimales (CCM) et par le calcul du quotient de risque. Nous avons donc étudié ces différents paramètres ainsi que la relation entre les résidus d'antibiotiques présents dans les échantillons d'eau et la présence des gènes de résistance.

#### II.3.1. Élimination des molécules par les STEU

Les efficacités moyennes d'élimination des molécules analysées sur les campagnes 2, 3 et 4 dans les stations d'épuration de Jarry, Lamentin et Gosier sont présentées en **Figure 49**.

L'efficacité d'élimination des composés mesurés par la station d'épuration varie suivant les molécules. Pour les antibiotiques, l'élimination moyenne varie de 15.6% (sulfaméthoxazole, STEU du Lamentin) à 77.5% (azithromycine, STEU de Jarry), tandis que pour les AINS elle varie de 10.4% (ibuprofène, STEU de Gosier) à 84.9% (kétoprofène, STEU de Jarry). Pour les biocides et les métaux lourds, l'élimination moyenne varie de 0% (pyriméthamine et sulfoxaflor, STEU de Gosier) à 100% (pyriméthamine et sulfoxaflor, STEU de Jarry) et de 5.2% (Pb, STEU de Jarry) à 44.6% (Zn, STEU du Lamentin) respectivement.

Les composés ne sont également pas éliminés avec la même efficacité selon la station d'épuration. La STEU de Jarry est globalement plus efficace dans l'élimination des résidus d'antibiotiques et d'AINS que les deux autres stations. Pour les biocides et les métaux lourds ce sont les deux autres stations qui sont plus efficaces. Les stations de Jarry et du Gosier sont catégorisées comme non-conformes pouvant expliquer pourquoi certaines molécules sont moins éliminées.

Seuls les biocides pyriméthamine et sulfoxaflor sont totalement éliminés mais seulement au niveau de la station de Jarry alors que l'élimination moyenne des métaux lourds ne dépasse pas les 50% dans chacune des stations. Outre ces composés, la ciprofloxacine, l'azithromycine, l'érythromycine, le triméthoprime, le kétoprofène et le diclofénac sont, en moyenne, les molécules les plus efficacement éliminées pendant le processus de traitement de la station, l'efficacité d'élimination de ces molécules atteint jusqu'à 84.9 %. Au contraire, certaines molécules sont peu éliminées, l'efficacité d'élimination la plus faible concerne les composés

de tébuconazole, As, Pb et le Cr, avec une efficacité d'élimination moyenne comprise entre 5.2 % et 29.7 %.

La présence de ces résidus dans les eaux pourrait mener à des phénomènes de sélection des gènes de résistance aux antibiotiques mais aussi, suivant leur concentration, à un effet délétère pour les bactéries exposées à ces composés. Les molécules n'étant pas bien éliminées représentent donc un risque pour l'environnement.

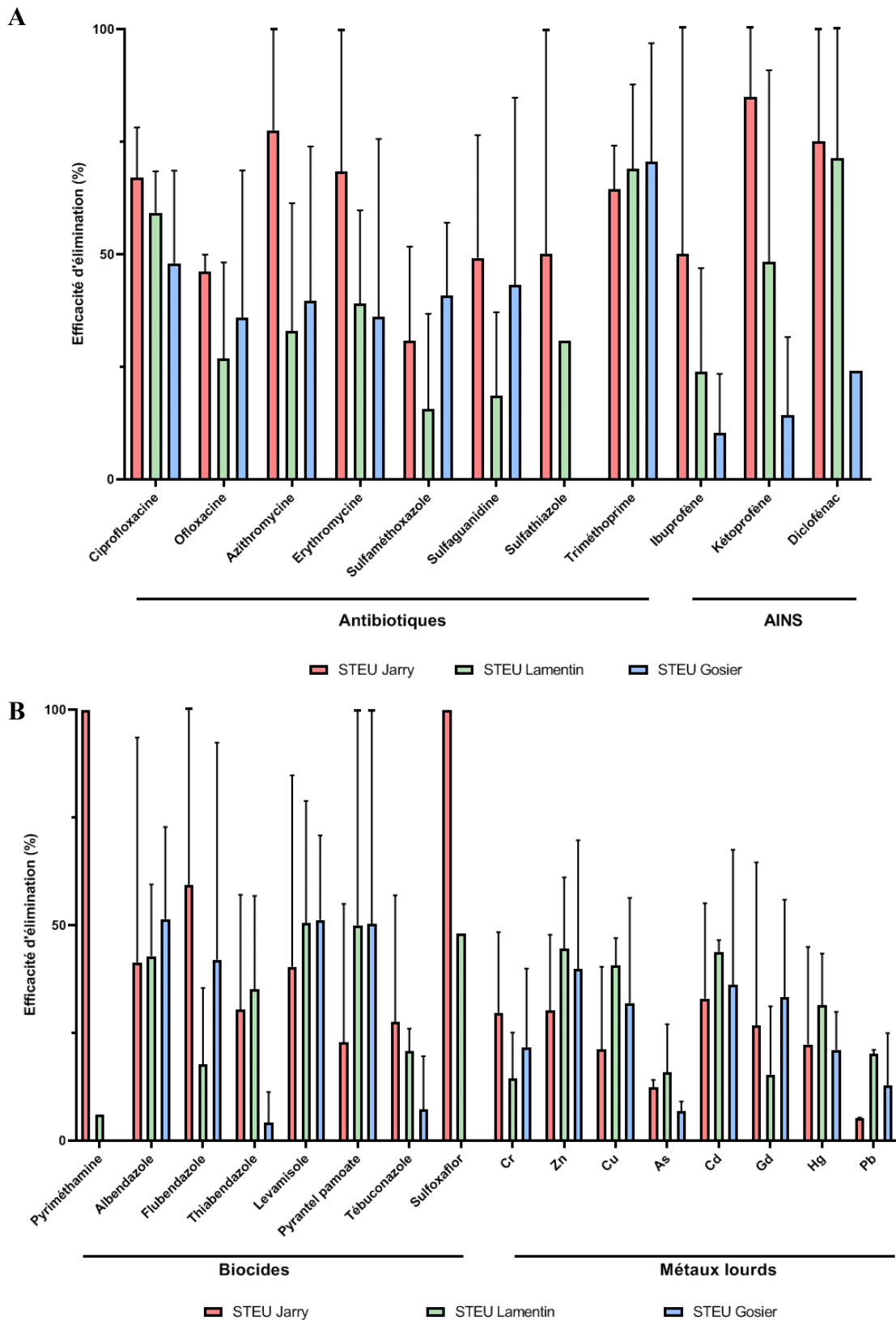


Figure 49 : Élimination moyenne (en %  $\pm$  SD) sur les quatre campagnes des composés de l'exposome mesurés dans les trois STEU (Jarry, Lamentin et Gosier) **A**. Composés antibiotiques et anti-inflammatoires non-stéroïdien (AINS) et **B**. Biocides et métaux lourds. La STEU de Jarry est représentée en rouge, la STEU du Lamentin en vert et la STEU du Gosier en bleu.

### II.3.2. Évaluation du risque

Les concentrations obtenues pour les molécules antibiotiques ont été comparées avec les concentrations prédites sans effet (PNEC) déterminées dans la littérature, qui pourraient mener à une sélection de la résistance (Bengtsson-Palme and Larsson 2016). Dans le cas du continuum CHUG – STEU de Jarry, les résultats montrent que certaines concentrations d'antibiotiques (ciprofloxacine et le triméthoprime) dépassent la PNEC de sélection de résistance dans les eaux usées de l'hôpital lors de la deuxième campagne, tandis que la concentration de l'ofloxacine reste à la limite de la PNEC (**Tableau 17**). La présence de ces résidus dans les eaux usées hospitalières représente donc un risque en ayant le potentiel d'être sélectifs pour la résistance. Néanmoins, une fois à la station d'épuration les concentrations ne dépassent plus les PNEC, représentant donc moins de risque pour la sélection de la résistance dans l'environnement. Les eaux usées de l'hôpital ne représentant qu'un faible pourcentage des eaux usées arrivant à la station, celles-ci sont diluées avec les eaux communautaires permettant donc également une dilution des résidus. Pour les deux autres continuums, aucune des concentrations retrouvées dans les échantillons n'est supérieure aux PNEC de sélection de résistance.

Les concentrations des métaux lourds mesurées ont été comparées avec les concentrations co-sélectives minimales (CCM) déterminées dans la littérature, qui pourraient entraîner une co-sélection de la résistance aux antibiotiques (Seiler and Berendonk 2012). Actuellement, seule une CCM a été définie pour la concentration totale de Cadmium (Cd) dans l'eau, elle est de 0.11 mg/L. Les concentrations obtenues pour les échantillons d'eaux de l'hôpital, de l'entrée et de la sortie de la station de Jarry ainsi qu'au niveau de l'émissaire dans l'océan ne dépassent pas cette CCM pour chacune des campagnes. Il en est de même pour les échantillons des autres continuums. Pour tous les autres métaux, les informations sur les concentrations inhibitrices ou sélectives sont encore rares et ne permettent pas une interprétation fondée des données.

L'évaluation du risque des résidus antibiotiques, AINS et biocides pour les bactéries dans l'environnement a été évaluée par le calcul du quotient de risque (RQ). Le RQ d'un composé est calculé par la division de sa concentration maximale mesurée dans l'environnement par sa PNEC<sub>env</sub> correspondante. La classification des risques se fait comme suit, un  $RQ \leq 0.1$  représente un risque faible ou négligeable, un RQ compris entre 0.1 et 1 confère un risque modéré et un  $RQ \geq 1$  présente un risque élevé.

Le risque environnemental le plus élevé est observé pour l'antibiotique ofloxacine dans les effluents de l'hôpital, en entrée et en sortie de STEU, pour les biocides albendazole dans les eaux usées de l'hôpital, flubendazole en entrée et sortie de STEU et thiabendazole dans tous les sites étudiés, avec un RQ supérieur à 1. La ciprofloxacine, l'ofloxacine, le sulfaméthoxazole, l'ibuprofène, le kétoprofène, le diclofénac, le flubendazole et le thiabendazole présentent également un risque moyen dans certains des sites étudiés. Même dans le milieu récepteur des eaux des stations, les produits pharmaceutiques et les biocides présentent toujours un risque. En effet, l'ofloxacine, le diclofénac, l'albendazole, le flubendazole et le thiabendazole ont un RQ supérieur à 0,1 (**Tableau 17**). La présence de toutes ces molécules représente donc un risque environnemental à titre individuel. Leur présence conjointe peut interroger sur une augmentation proportionnelle ou exponentielle de risque de favoriser la dissémination des gènes de résistance.

Tableau 17 : PNEC de sélection de résistance (en µg/L), PNEC de l'environnement (en µg/L) et quotient de risque (RQ) des composés pharmaceutiques et biocides de l'exposome mesurés par LC-MS dans les échantillons de l'hôpital, l'entrée et la sortie de STEU et dans l'océan/mangrove pour chacun

	PNEC <sub>résistance</sub> (µg/L)	PNEC <sub>env</sub> (µg/L)	RQ				Références EC50
			Hôpital	Entrée STEU	Sortie STEU	Océan/Mangrove	
<b>Composés pharmaceutiques</b>							
Ciprofloxacine	0.064	0.61	0.50	0.03	0.02	0.07	(Halling-Sørensen et al. 2000)
Ofloxacine	0.5	0.01	104.8	5.9	3.3	0.6	(Ferrari et al. 2004)
Azithromycine	0.25	NE 10 mg/L	-	-	-	-	(Harada et al. 2008)
Erythromycine	1	NE 100 mg/L	-	-	-	-	(Isidori et al. 2005)
Sulfaméthoxazole	16	23.3	0.18	0.01	0.007	0.02	(Kim et al. 2007); (Isidori et al. 2005)
		78.1	0.05	0.003	0.002	0.005	
Sulfaguandine	-	-	-	-	-	-	
Sulfathiazole	-	>1 000	-	-	-	-	(Kim et al. 2007)
Triméthoprime	0.5	176.7	0.006	0.001	0.0005	0.0001	(Kim et al. 2007); (Halling-Sørensen et al. 2000)
		17.8	0.06	0.01	0.005	0.001	
Ibuprofène	-	11.3	0.03	0.39	0.18	0.05	(Harada et al. 2008)
Kétoprofène	-	20.4	0.19	0.04	0.03	0.01	(Harada et al. 2008)
Diclofénac	-	17.37	0.14	0.18	0.18	0.19	(Gheorghe et al. 2016)
<b>Biocides</b>							
Pyriméthamine	-	-	-	-	-	-	
Albendazole	-	0.77	1.14	0.75	0.68	0.13	(Oh et al. 2006)
Flubendazole	-	0.852	0.41	2.31	1.28	0.64	(Oh et al. 2006)
Thiabendazole	-	0.029	2.52	4.55	4.41	5.03	(Oh et al. 2006)
Lévamisole	-	-	-	-	-	-	
Pyrantel pamoate	-	-	-	-	-	-	
Tebuconazole	-	-	-	-	-	-	
Sulfoxaflor	-	-	-	-	-	-	

a (Bengtsson-Palme and Larsson 2016)

Une analyse de partitionnement de la variation a été effectuée afin d'évaluer la contribution des composés mesurés de l'exposome (antibiotiques, AINS, biocides et métaux lourds) sur la variance du résistome, et de déterminer s'ils peuvent contribuer davantage à la variation lorsqu'ils sont combinés plutôt qu'individuellement. L'analyse a été réalisée en prenant en compte tous les échantillons dont l'exposome a été caractérisé. Sur ce diagramme (**Figure 50**), plus le chiffre est élevé plus la contribution du composé sur la variation du résistome est élevée, au contraire plus le chiffre est bas moins ce composé contribue à la variation du résistome. La contribution de la combinaison de deux ou de tous les composés est représentée dans le chevauchement des cercles. Lorsque la contribution est nulle les résultats ne sont pas montrés sur le diagramme.

Les métaux lourds sont davantage associés à la variance du résistome, tandis que les biocides et les composés pharmaceutiques seuls n'y sont pas associés. En revanche, en combinaison avec les métaux lourds, les produits pharmaceutiques et les biocides contribuent à la variabilité du résistome. Il en est de même à une moindre échelle pour l'association entre les composés pharmaceutiques et les biocides, entre les composés pharmaceutiques et les métaux lourds et entre les biocides et les métaux lourds.

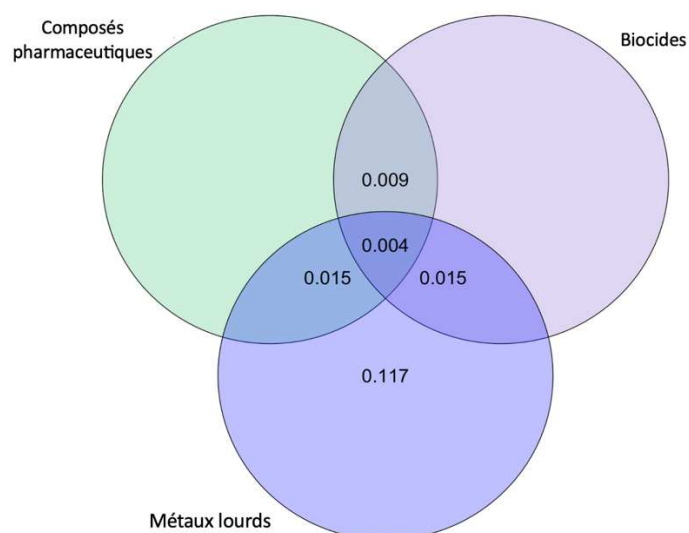


Figure 50 : Représentation des résultats de l'analyse de partitionnement de la variation sous la forme d'un diagramme de Venn montrant la contribution des composés de l'exposome (composés pharmaceutiques, biocides et métaux lourds) sur le résistome. Plus le chiffre à l'intérieur des cercles est élevé plus la contribution du composé sur la variance du résistome est élevée. L'absence de valeur indique une contribution nulle. Le chevauchement des cercles représente la contribution de la combinaison des composés.

### II.3.3. Relations entre la présence des antibiotiques et des gènes de résistance

Une analyse de corrélation entre les abondances relatives des gènes de résistance d'intérêt et les antibiotiques auxquels ils confèrent une résistance a été réalisée afin de déterminer les liens potentiels entre ces deux variables. Il s'agit des gènes *ermB*, *sull* et *qnrS* conférant des résistances à l'érythromycine et l'azithromycine, le sulfaméthoxazole, la ciprofloxacine et l'ofloxacine respectivement (**Figure 51**). Les résultats montrent des corrélations positives significatives entre le gène *ermB* et l'érythromycine ( $r = 0.28$ ,  $p = 0.0063$ ), entre le gène *ermB* et l'azithromycine ( $r = 0.49$ ,  $p = 7.2 \times 10^{-7}$ ), entre le gène *sull* et le sulfaméthoxazole ( $r = 0.44$ ,  $p = 8.8 \times 10^{-6}$ ), entre le gène *qnrS* et la ciprofloxacine ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.00023$ ) et le gène *qnrS* et l'ofloxacine ( $r = 0.7$ ,  $p = 3.2 \times 10^{-16}$ ). Ces résultats sont globalement en accord avec une autre étude à la différence que les auteurs n'avaient pas montré de corrélation positive entre le gène *ermB* et l'azithromycine (Rodriguez-Mozaz et al. 2015).

D'après ces corrélations, l'augmentation de la concentration de ces antibiotiques augmenterait l'abondance des gènes de résistance correspondant, montrant le risque que représente la présence de ces résidus dans l'environnement. Ces résultats sont en adéquation avec d'autres études suggérant que l'exposition aux antibiotiques pourrait entraîner une pression sélective pour les GRA (J. Li et al. 2012; Gao, Munir, and Xagorarakis 2012).

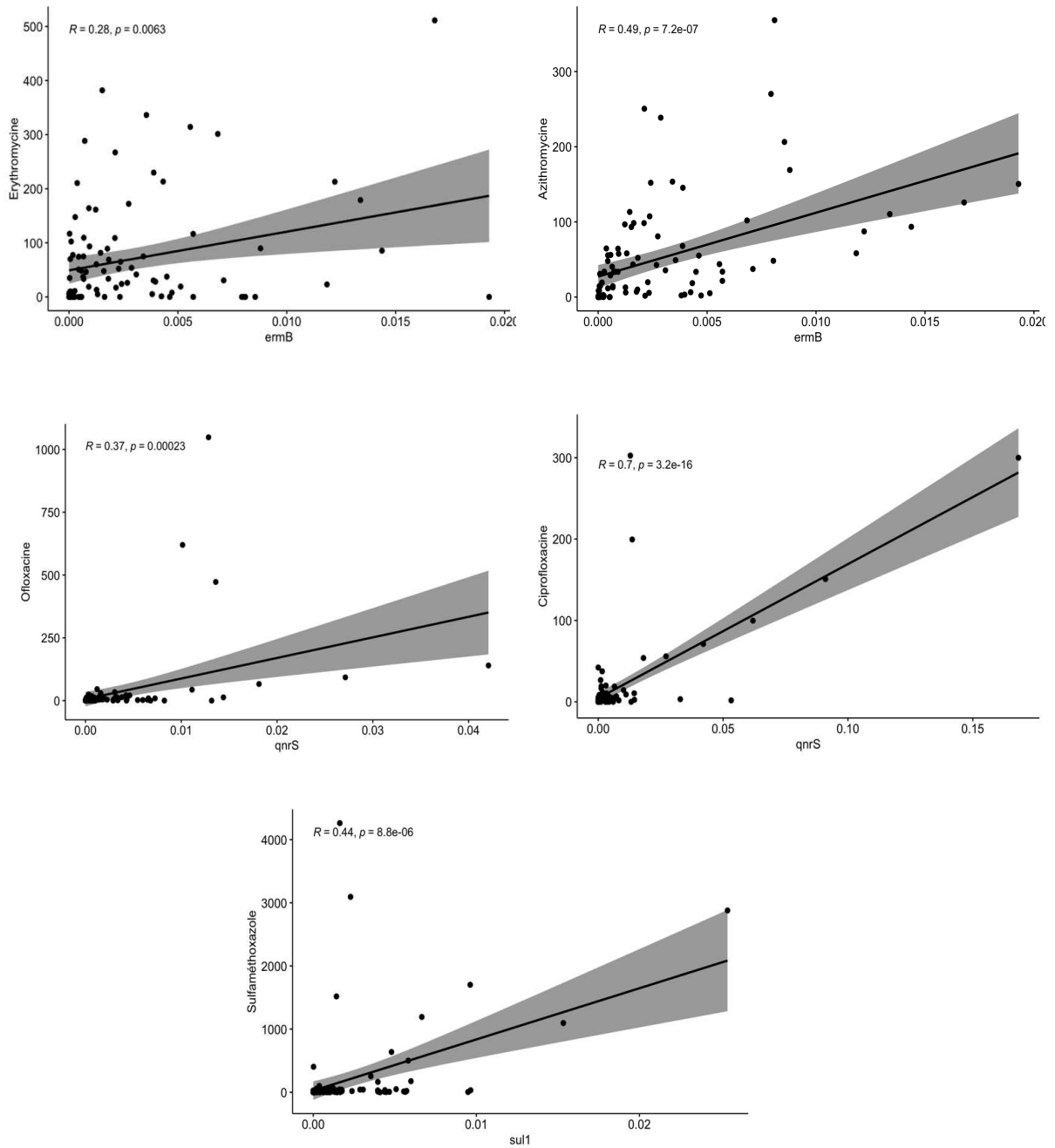


Figure 51 : Corrélations entre l'abondance relative des gènes de résistance et la concentration des antibiotiques (en ng/L) auxquels ils confèrent une résistance. R = Coefficient de corrélation, p = valeur de probabilité

## II.4. Impact du tourisme



# Wastewater-based AMR surveillance associated with tourism in a Caribbean Island (Guadeloupe)

Pimenta M.<sup>1</sup>, Alexa M.<sup>2</sup>, Batantou D.<sup>3</sup>, Dulaurent S.<sup>4</sup>, Huynh B.T.<sup>2,5</sup>, Gaschet M.<sup>1</sup>, Opatowski L.<sup>2,4</sup>, Breurec S.<sup>3,6,7</sup>, Ploy M.C.<sup>1</sup>, Dagot C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, 87000 Limoges, France

<sup>2</sup>Institut Pasteur, Université Paris-Cité, Epidemiology and Modelling of Antibiotic Evasion (EMAE), F-75015 Paris, France

<sup>3</sup>Transmission, Reservoir and Diversity of Pathogens Unit, Pasteur Institute of Guadeloupe, 97110 Pointe-à-Pitre, France

<sup>4</sup>Unit of biological and forensic toxicology, Limoges university hospital, Limoges, France

<sup>5</sup>Anti-infective Evasion and Pharmacoepidemiology Team, CESP, Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM U1018, Montigny-le-Bretonneux, France

<sup>6</sup>Faculty of Medicine Hyacinthe Bastaraud, University of Antilles, Pointe-à-Pitre, France.

<sup>7</sup>Centre for Clinical Investigation 1424, INSERM, Pointe-à-Pitre/Les Abymes, France.

## Abstract

### Background

Antimicrobial resistance (AMR) is a major public health concern worldwide. International travel has been identified as one of the drivers of AMR and is a risk factor for acquiring antibiotic-resistant bacteria (ARBs) and antibiotic-resistance genes (ARGs). Understanding the transmission of ARBs and ARGs is crucial to tackle AMR. The objective of this study was to assess the spread of AMR on a French Caribbean Island concerned by tourism.

### Methods

A wastewater-based epidemiology (WBE) study was conducted in Guadeloupe in 2022. We characterized the resistome, microbiome and exposome of water samples collected in wastewater treatment facilities (WWTFs) of two cities with different tourism activities, in the content of aircrafts toilets and in the pumping station receiving these excreta.

### Results

Aircrafts samples displayed different microbiome and resistome composition in comparison to the other sites. The microbiome of the aircraft was mainly composed of anaerobic bacteria belonging to the human intestinal microbiota, whereas at the other sampling points a mix of human and environmental bacteria was found, which are subject to a significant exposome. In terms of the resistome, the aircraft were characterised by a high abundance of tetracycline resistance genes, which were much less present in the pumping station and in the WWTPs. Moreover, aircrafts have not contributed to the introduction of relevant genes.

### Conclusion

Clear differences were seen between the aircraft and the other sampling sites, but our data suggest that tourism has no impact on the spread of resistance in Guadeloupe, indicating that monitoring the spread of ARGs is more complex and requires more extensive longitudinal studies.

## 1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a global issue, and the burden caused by antibiotic-resistant bacteria (ARBs) was estimated to be 1.27 million deaths worldwide in 2019. Resistant bacteria have been found on every continent, but the frequency of resistant strains varies according to

geographical location. In fact, low- and middle-income countries are more impacted and have higher AMR rates due to their overuse and misuse of antibiotics, but also the lack of hygiene, sanitation and regulation of access to antibiotics<sup>1</sup>. Besides antibiotic consumption and transmission of ARBs, different determinants, such as socio-economic factors and climate, have been described as AMR drivers<sup>2</sup>. To curb AMR, we need to determine the routes and factors driving the emergence and spread of ARB.

Travels play a role in AMR dissemination, particularly since the rise of globalisation. When travelling, tourists are exposed to resistant bacteria endemic to the country they travel to, or they can introduce ARBs and antibiotic-resistance genes (ARGs) to the destination country<sup>3-7</sup>. In that respect, it is well established that some resistance genes, such as ESBL CTX-M or carbapenemase encoding genes, have spread worldwide through travellers<sup>8-9</sup>. A study found that the proportion of carriage of ESBL-producing bacteria in stool samples differed depending on whether the tourists travelled within or outside Europe. Indeed, only 3% of travellers to Europe carried ESBL-producing bacteria, while 36% of tourists travelling outside Europe were carriers<sup>10</sup>. Other risk factors have also been identified, such as digestive disorders and the use of antibiotics during travel<sup>11</sup>. In addition, colonisation with resistant *E. coli* can be persistent; the duration of this persistence varies from study to study, with evidence that travellers were still colonised between one month and six months after their return<sup>12,13</sup>. Monitoring AMR among travellers could bolster global surveillance of AMR spread and identify geographical areas fostering AMR emergence and spread.

AMR surveillance of human waste presents a fast and economical way to monitor the global transmission of pathogens<sup>12</sup>. Urban wastewater partly reflects the characteristics of the human gut microbiota<sup>14</sup>. The resistome of these types of effluents is consequently influenced by the prevalence of resistance in the community<sup>14</sup>. In this context, wastewater-based epidemiology (WBE) analyses biomarkers of interest by collecting wastewater samples, especially influents arriving at wastewater treatment facilities (WWTF), to obtain information on community health. WBE was widely used during the COVID-19 pandemic to monitor the prevalence and circulation of the SARS-CoV-2 virus in communities and was demonstrated to be an effective surveillance approach<sup>15</sup>. As part of the ongoing monitoring of wastewaters, other viruses have been monitored but also bacteria and AMR<sup>16-18</sup>.

Interestingly, it has been suggested that the dynamic of AMR acquisition can be tracked through intercontinental flights<sup>12</sup>. In their study on airplane-borne sewage, Heß et al.<sup>13</sup> showed that the relative abundance of ARGs in the sewage coming from airplanes was higher than in typical municipal effluent. Nevertheless, most studies have only focused on clinically relevant resistance genes or *Enterobacteriaceae* species. However, studies should take into account the whole microbiome, bearing in mind that environmental bacteria are also a large reservoir of ARGs. Hence, to understand better the dynamic of resistance spread through tourism activities, it is essential to consider the whole microbiome and an extensive array of ARGs.

To address this knowledge gap, we studied a French Caribbean Island that receives approximately, each year, 500,000 tourists, joining the island essentially through international flights. To assess if tourism has an impact on the spread of AMR, we aimed to i) follow the dynamics of the spread of AMR in Guadeloupe, considering international flights as a source of AMR and ii) monitor the transmission of AMR through a continuum, including hotels of a touristic area, WWTF in the hotels' area compared to a plant in a less tourist-impacted area. We analysed the microbiome, resistome and exposome, representing here all the compounds present in the environment to which bacteria are exposed. We showed that the analysis of air

travellers' excreta may not be sufficient for the surveillance of AMR spread through travels but that gathering places, such as tourist hotels, can provide new relevant information.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sampling campaigns

Guadeloupe is a French overseas territory located in the Caribbean. It has an area of 1,628 km<sup>2</sup> and a population of 383,559 inhabitants. It has a tropical climate, with only two seasons: the dry season from January to June and the rainy season from July to December.

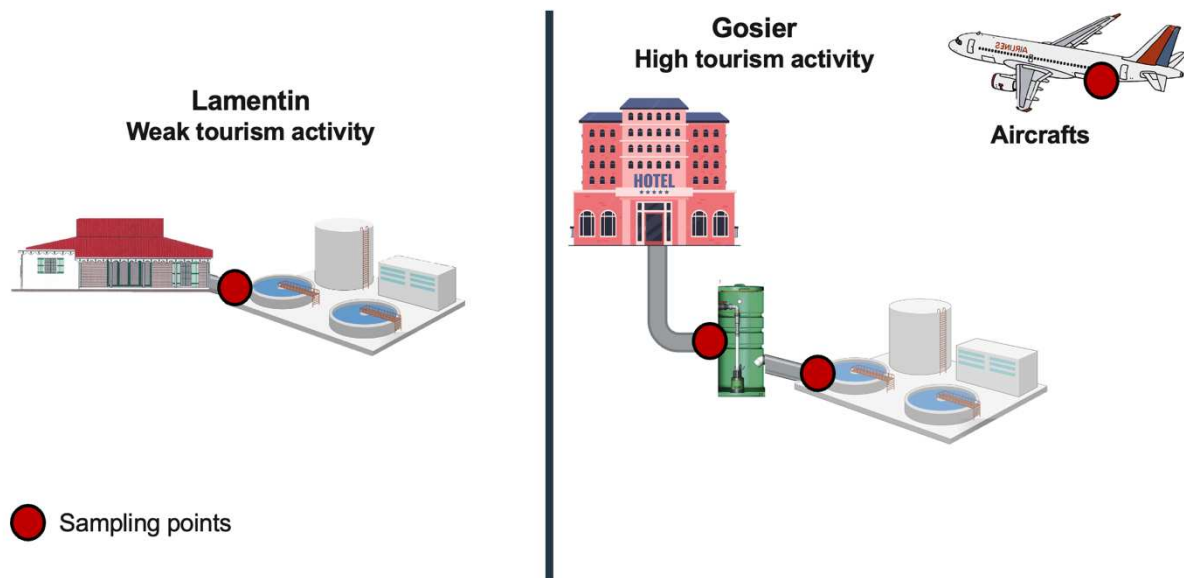


Figure 1: Sampling sites including samples collected in the influent of the WWTP of Lamentin, a city with weak tourism activity, in the pumping station of Gosier, city with high tourism activity, in the influent of the WWTP of Gosier and in the content of aircrafts toilets, mainly coming from mainland France. Samples were collected once a week for three weeks during two sampling campaigns.

Two sampling campaigns were performed in Guadeloupe in 2022, one during the dry season (campaign 1) and one during the rainy season (campaign 2), with three weeks of sampling per campaign. In total, 24 samples were collected per campaign. We sampled the content of aircrafts' toilets (AT), mainly coming from mainland France, Paris. Punctual samples were collected using a bottle when the effluent was discharged from the tanker truck. Five aircrafts per week were sampled for 3 consecutive weeks, representing a total of 15 aircrafts for each sampling campaign.

Toilets in the aircrafts use a vacuum system. Toilets are connected via a piping system to a wastewater tank that stores the faeces. A "blue" product, consisting of a quaternary ammonium germicide and ethylene glycol as an antifreeze, is added to the toilets to prevent the growth of microorganisms. The waste is stored for the duration of the flight, and, on arrival at the airport, the tanks are emptied, and the effluent is fed into the treatment system.

Punctual samples were then collected at a pumping station (PSH) located in a town with high tourist activity, Le Gosier, one of the main tourist destinations in Guadeloupe. This seaside resort has the highest number of accommodations in Guadeloupe. The hotel occupancy rate in Guadeloupe in 2022 was approximately 57 % in the dry season and 56 % in the wet season, providing a good representation of the tourist population, in addition to the aircrafts. The PSH, which receives wastewaters from the hotels uses a pump to lift the wastewater when gravity

flow is not possible. The influent of the WWTF to which this PSH is connected was also sampled in the high tourism city (HT) as a 24h composite sample. This plant also receives urban and clinical effluent from clinics treating patients with medical pathologies, particularly renal, cardiovascular and diabetic diseases.

We also sampled wastewaters in the city of Lamentin, which is a rural area with low tourism (LT) activity. Twenty-four hours composite samples were collected in the influent of the WWTF. This plant only receives urban wastewaters.

Characteristics of the WWTPs are listed in **Table S1**.

## **2.2.DNA extraction**

Water samples were stored a few hours before filtration. They were filtered in triplicate using a filtration ramp (Sartorius), on sterile filter with a diameter of 47 mm and a pore size of 0.45 µm (Sartorius). DNA was extracted from filters for each triplicate using the DNeasy PowerWater kit (Qiagen®) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was measured by Qubit™ dsDNA BR Assay Kits (Invitrogen™). For downstream analysis, the DNA was diluted or concentrated to a final concentration of 10 ng/µL. DNA was stored at -20°C until its use.

## **2.3.Exposome analysis**

Pharmaceuticals and biocides were measured by solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). In total, nineteen molecules were analysed, including eight antibiotics (ciprofloxacin, ofloxacin, azithromycin, erythromycin, sulfamethoxazole, sulfaguanidine, sulfathiazole, trimethoprim), eight biocides (pyrimethamine, albendazole, flubendazole, thiabendazole, levamisole, pyrantel, tebuconazole, sulfoxaflor) and three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (ibuprofen, ketoprofen, diclofenac).

Samples were loaded on Oasis HLB 3cc (60mg) cartridges from Waters for SPE and final dry residues were injected into the LC-MS system. A 5500 QTRAP (AB Sciex) triple quadrupole mass spectrometer was used, and a multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to perform the quantitative analysis of the target molecules.

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used to quantify heavy metals concentration (Zn, Cu, Ni, Pb, Cr, Gd, Hg, As and Cd) in the water samples using the ICP-MS NexIon 350D (Perkin Elmer – Sciex). Scandium (Sc), Yttrium (Y), Indium (In) and Rhenium (Re) were used as internal standards.

## **2.4.16S rRNA sequencing**

Variable regions of the 16S rRNA encoding gene (V2, V3, V4, V6, V7, V8, V9) were amplified using the Ion 16S™ Metagenomics Kit (ThermoFischer), following manufacturer's instructions. *E. coli* DNA and sterile water were used as positive and negative control respectively. Using Magnetic beads Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter™) amplicons were purified, and Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™) was used to measure their concentration. Libraries were built using the Ion Plus Fragment Library Kit for AB Library Builder™ System (Ion Torrent™) following manufacturer's instructions. In the case of aircraft toilets, the libraries of samples from the same week were pooled. Quality controls and quantifications were carried out using an Agilent Bioanalyzer 2100. Ion S5 technology was used for sequencing after libraries were loaded onto Ion 530™ chips (Ion Torrent™).

Sequencing data were analyzed using Curated MicroSEQ® 16S Reference Library v2013.1 on Ion Reporter Software. Results were then based on the V3 region with which we had the better results. Alpha and beta diversity were calculated on Shaman software<sup>19</sup>.

## 2.5. Fluidigm PCR

High-throughput qPCR was used to quantify the abundance of genes, including 80 genes conferring resistance to antibiotics, heavy metals and quaternary ammonium compounds (QACs), grouped into 16 classes. Additionally, 9 mobile genetic elements (MGEs) and integron integrase genes (*intI1*, *intI2*, and *intI3*) were also targeted as described previously by Buelow *et al.*<sup>20,21</sup>. Universal primers were used to target the bacterial 16S rRNA gene. The primers sequences are listed in **Table S2**. The 96.96 BioMark™ Dynamic Array for Real-Time PCR (Fluidigm Corporation) was used to perform real-time PCR as described previously<sup>20,21</sup>. The PCRs were done in triplicate. A sample of wastewater containing each of the targeted genes was used as a positive control and sterile water as a negative control.

Relative abundance of resistance genes was calculated relative to the abundance of the 16S rRNA gene with the formula ( $2^{-(Ct\ ARG - Ct\ 16S\ rRNA)}$ ) and cumulative abundance of antibiotic resistance classes was calculated by summing the relative abundance of each gene belonging to the same antibiotic class.

## 2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R studio v2023.06.0. The significance was tested by using the non-parametric Mann-Whitney test with a significance level of 95%. Principal Component Analysis (PCA) has been used for the search of linear combinations among the different variables (resistome and microbiome) using R studio v2023.06.0 and Shaman<sup>19</sup>. A variation partitioning analysis was conducted to determine which chemical group of the exposome accounts for the largest portion of the variation in the resistome data. This analysis was performed with R studio v2023.06.0 using vegan package. Network visualization was carried out using Gephi 0.10.1 software<sup>22</sup>.

## 3. Results

To better understand resistance spread, it is essential to characterise the studied systems in terms of the presence of agents likely to induce selection pressure (exposome) and the microorganisms present (microbiome).

### 3.1. Exposome analysis

To differentiate the different exposomes (defined here as the combination of different compounds that would promote the spread of resistance<sup>23</sup>) pharmaceuticals, biocides and heavy metals were quantified by LC-MS and ICP-MS in the PSH and the HT and LT WWTPs.

The dry season was characterized by a significantly higher exposition level than the rainy one, mainly consisting of NSAIDs with a mean concentration of 3.5, 4.2 and 5.2 µg/L in the PSH, HT and LT respectively in rainy season (**Fig. S1A**). These concentrations are in the range of values found in different countries<sup>24-26</sup>. Azithromycin and erythromycin were the most abundant antibiotics detected, with concentrations ranging from 1.8 ng/L to 368.4 ng/L and from not detected to 511.3 ng/L, respectively. Regarding biocides, the antiparasitic flubendazole had the highest concentration in all samples.

Heavy metals were also present at high concentrations. No significant differences were seen between dry and rainy season or between each sampling site ( $p > 0.05$ ) (**Fig. S1B**). Of the heavy metals selected, zinc is the most abundant and mercury the least.

The analysis of the different exposomes, whatever the season, does not show significant differences between the sites of the same campaign (dry or rainy season) in the conditions under which they were carried out.

### 3.2. Microbiome analysis

Despite the presence of a disinfectant in AT, we found enough bacteria in proportions similar to the other sites to carry out our analyses and comparisons. We estimated the diversity of the microbiomes using two diversity metrics, alpha and beta diversity. Alpha diversity represents the species richness of the sample, whereas beta diversity refers to species diversity between two samples. Both indexes were significantly lower than in the samples from the WWTFs and PSH influents, indicating a lower bacterial diversity in AT. In addition, there was a clear difference in the microbiome composition between AT and the other three sites (**Fig.S2**). Logically, the PSH microbiome composition was also different from that of AT and HT and LT WWTFs.

Overall, the three weeks of sampling during each campaign showed only minor differences in the proportion of bacteria, with the most abundant genera remaining similar (**Fig. S2**). Although there were some differences between the two campaigns, we did not see any seasonal effect that would affect the bacterial proportions in the different microbiomes.

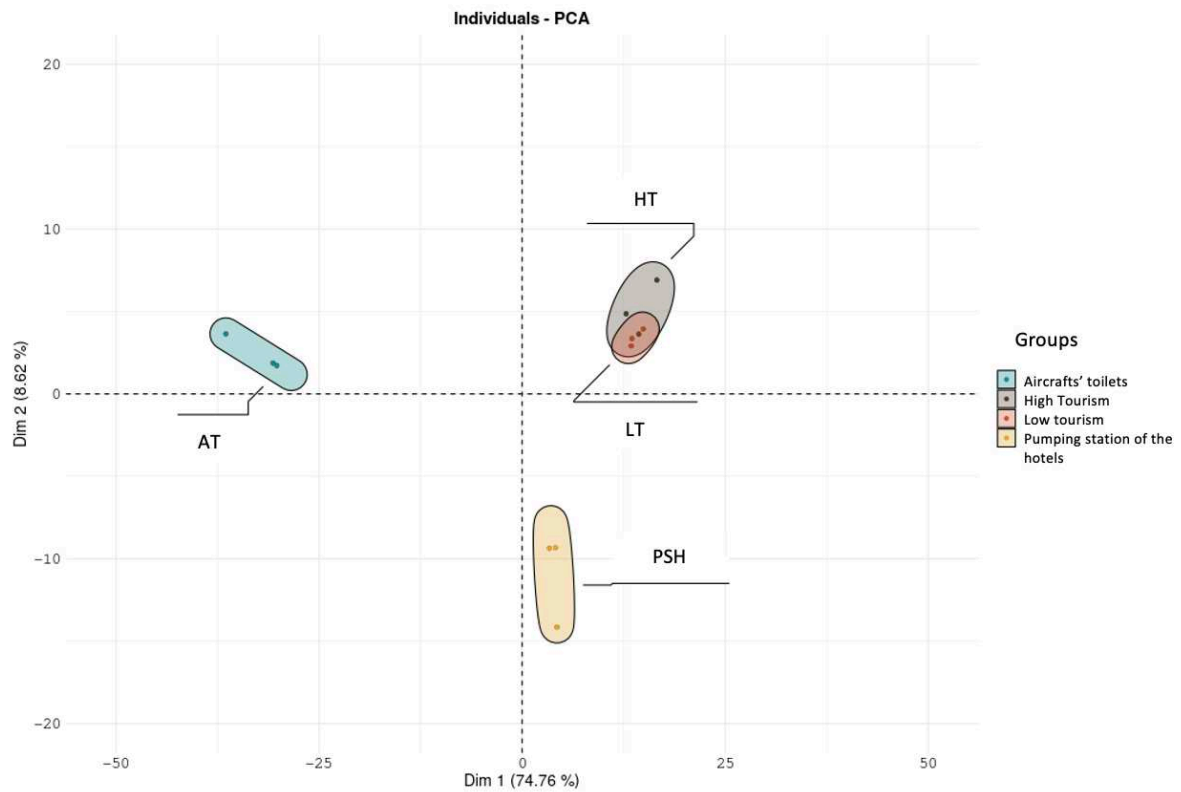
*Pseudomonadota*, *Bacillota* and *Bacteroidota* were the most abundant phyla and represented more than 90% of total phyla. At the genus level, the PSH and the influent of both WWTFs carried a mix of bacteria belonging to the human gut microbiota (*Bacteroides*, *Prevotella* and *Faecalibacterium*)<sup>27-28</sup> and environmental bacteria. A large proportion of the bacteria found in WWTF waters were anaerobic, thanks to the conditions created by sewers. as previously described<sup>29</sup>.

Considering the most abundant genera, the microbiome of the water samples was composed on average of 6%, 9% and 9% of *Acinetobacter*, 3%, 6% and 5% of *Aeromonas*, 10%, 10% and 8% of *Arcobacter*, 2%, 9% and 8% of *Cloacibacterium*, 13%, 16% and 16% of *Streptococcus* and 7%, 4% and 4% % of *Bacteroides* in the PSH, HT and LT respectively.

The most abundant genus in AT was *Atopostipes*, a Gram-positive bacterium, facultatively anaerobic, belonging to the *Bacillota* phylum (**Fig.S2**); it accounted for 21% of the genera found and was exclusively present in AT. The other most abundant genera were *Bacteroides*, *Prevotella*, *Tissierella* and *Faecalibacterium* they made up 13%, 6%, 7% and 10% of the AT microbiome respectively. These bacterial genera are part of the human gut microbiota showing that AT may be representative of human gut microbiota<sup>30</sup>.

The two principal components extracted from the PCA, Dim1 and Dim2, explained 74.76% and 8.62%, respectively, of the total differences between the microbiome of the sites studied. The PCA of the microbiome showed a clear distinction between the samples of AT and the other studied sites. The samples of LT and HT cluster together. However, the PSH cluster closer to both WWTFs but not with them, confirming the differences shown by the proportional abundance (**Fig. 2**).

**A**



**B**

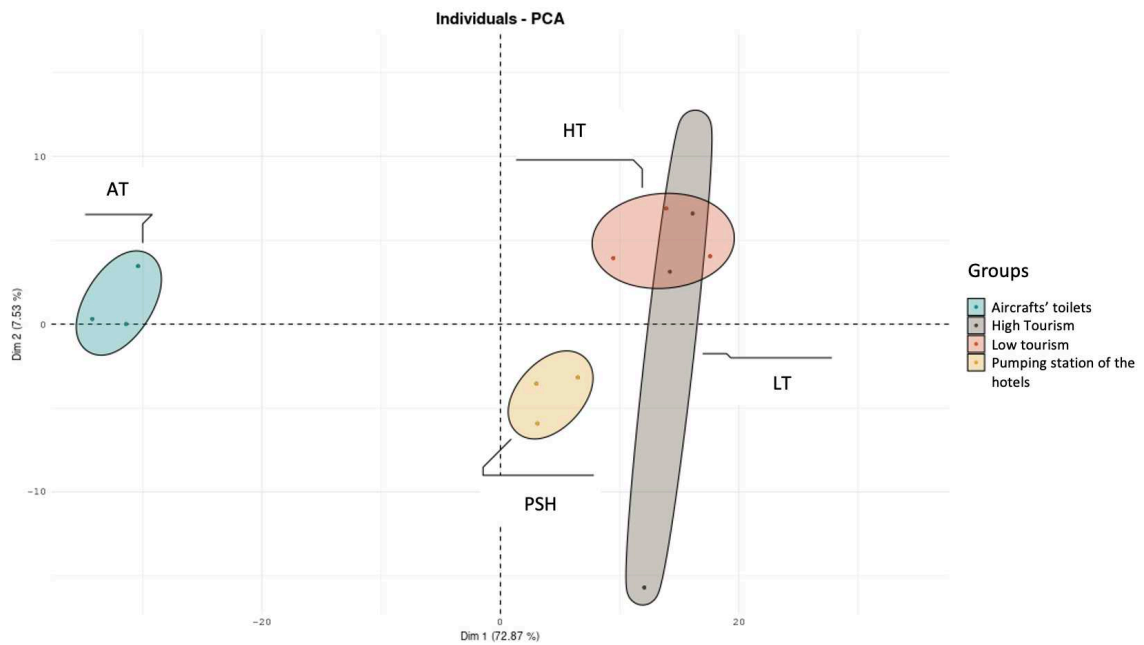


Figure 2: Principal component analysis of the microbiome. Dots represent in blue the aircrafts samples, in yellow the samples of the pumping station of Gosier, in grey the samples of the WWTP of Gosier and in red the samples from the WWTP of Lamentin for the dry season (A) and the rainy season (B).

### 3.3. Relative abundance of the resistome

The resistome of the samples was studied by the detection of selected ARGs and MGEs. To determine the level of ARGs in each sample, normalized abundance relative to the 16S rRNA gene was calculated.

A significantly higher total relative abundance was found in AT with a mean abundance of 0.14. However, no significant differences were seen between the PSH and LT whereas HT displayed the lowest relative abundance (**Fig. 3**).

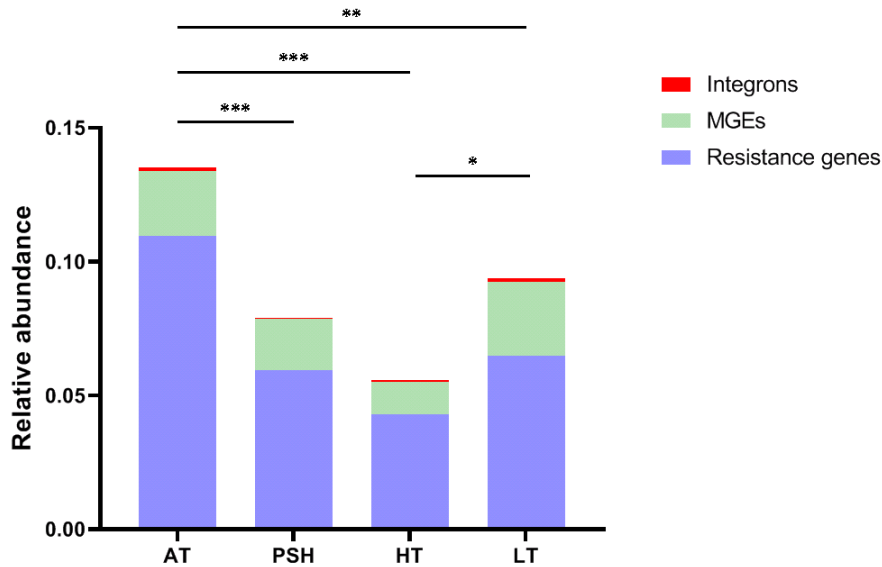


Figure 3: Total mean relative abundance of resistance genes, mobile genetic elements (MGEs) and integrons for the aircrafts' toilets (AT) (n=6), the pumping station of the hotels (PSH) (n=6), the high tourism (HT) (n=6) and the low tourism (LT) samples collected during dry and rainy season.

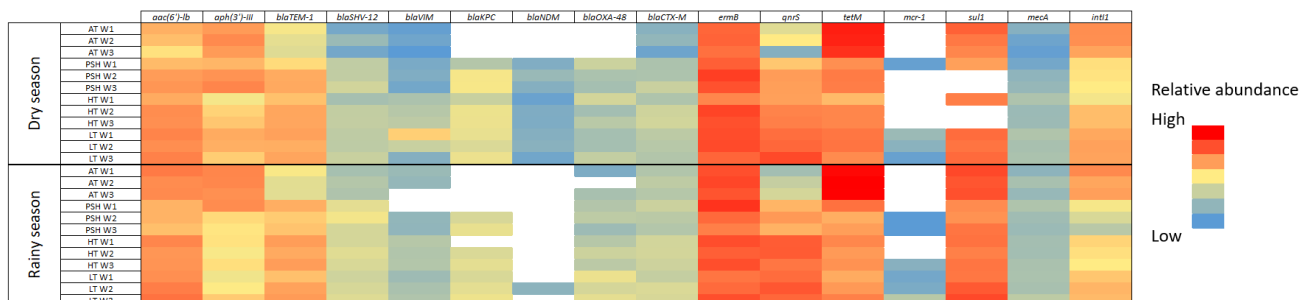
The analysis of proportional abundance of each targeted gene classes shows that wastewaters from the PSH of Gosier, HT and LT had a distinct resistome signature from that of AT (**Fig. S3**). A majority of tetracycline resistance genes was found in AT (around 35%). On the contrary, a very low relative abundance of genes encoding efflux pumps, or quinolone, heavy metal, vancomycin, polymyxin and methicillin resistance genes were detected, representing less than 1% of the resistome of AT and no streptogramin resistance genes were detected. The PSH contained fewer tetracycline resistance genes than AT (more than 20%), but they were present in greater proportions than in the two WWTFs (about 10% for each plant), suggesting an influence of the resistome of the tourists, especially in the dry season.

A list of genes of interest was selected, known to be regularly found in environments exposed to anthropogenic activities (**Fig. 4A**)<sup>31</sup>. The comparison of LT, HT and AT samples showed a significantly higher abundance of *qnrS*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, ESBL-encoding gene (*bla<sub>SHV-12</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*) and carbapenemase genes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*) in both tourist and non-tourist cities in contrast to AT. In the latter, however, the tetracycline resistance gene *tetM* was found in higher abundance (**Fig. 4A**). The analysis also showed that *bla<sub>NDM</sub>* genes were always absent from AT samples and at a low abundance in PSH, HT and LT effluents.



Network analysis provides a representation of the genes of interest that are shared between the various sites studied (Fig. 4B) The analysis showed that the genes with high clinical interest, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* and *mcr-1* were shared between the PSH and the two WWTF influents but were always absent from the AT. These genes, therefore, do not appear to be imported by aircraft passengers. However, the majority of resistance genes are shared between the four sampled sites.

A



B

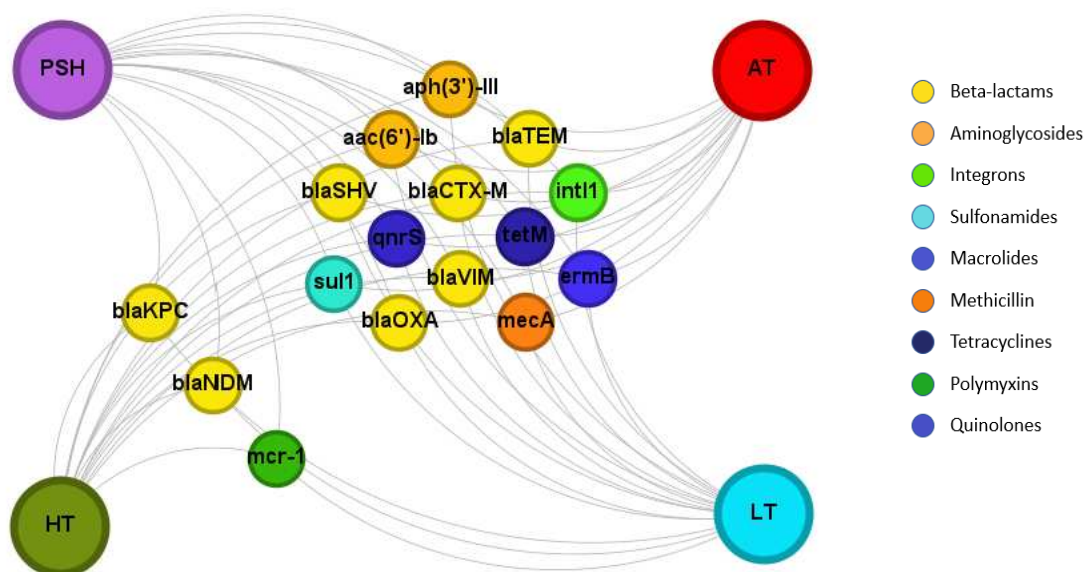


Figure 4: **A.** Heatmap representing the mean relative abundance of the genes of interest selected for the four studied sites in the samples collected for three weeks during dry and in rainy season. Red color represents the most abundant resistant genes and blue the least abundant, white color means that the gene is not detected.

**B.** Network representation of resistance genes shared by the sampled sites, with Aircrafts' toilets in red, the pumping station of the hotels in purple, the high tourism in green and the low tourism in blue, for both sampling campaigns. Genes are coloured according to the class they belong to. The genes shared by the 4 sites studied are grouped together in the middle.

AT = Aircrafts' toilets, PSH = pumping station of the hotels, HT = high tourism, LT = low tourism, W1 = week 1, W2 = week 2 and W3 = week 3.

From the PCA on all the resistance genes, two extracted principal components, Dim1 and Dim2, explained 44% and 23.6% respectively of the total differences between the resistomes of the sites studied. The PCA analysis showed that in both seasons the resistomes evaluated in the AT form a distinct cluster from the other resistomes; those of the tributary of HT and LT WWTFs and the PSH remained relatively close (Fig. 5). This could mean that travellers carry a different resistome from that of their destination and that it would not have a strong influence on the local resistome.

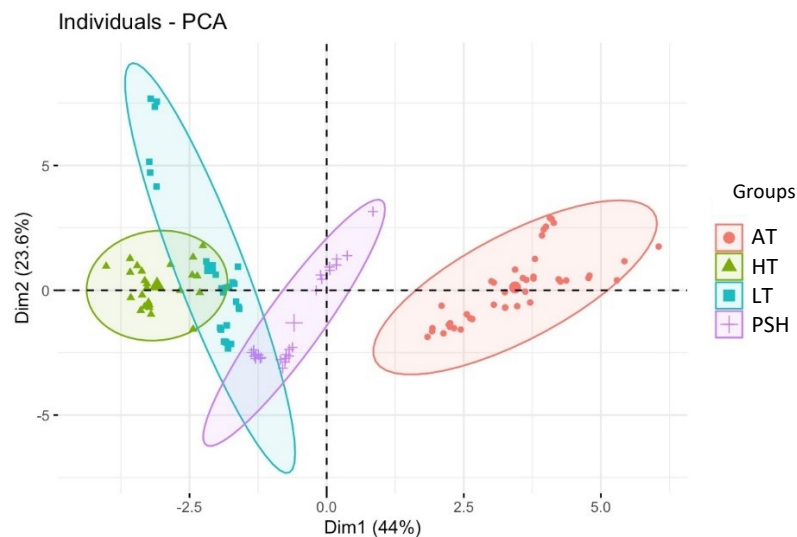


Figure 5: Principal component analysis of the resistome. Dots represent in red the aircrafts samples, in purple the samples of the pumping station of Gosier, in green the samples of the influent of the WWTP of Gosier and in blue the samples from the influent of Lamentin, for both campaigns.

#### 4. Discussion

Against a backdrop of globalization, international travel has been identified as a risk factor for the spread and acquisition of ARBs and ARGs.

To assess whether passengers on transatlantic flights (longer than 8 hours) favour a modification of the local resistome and thus a potential for the spread of AMR, we assessed the impact of tourism on AMR by monitoring the resistome, microbiome and exposome of wastewaters and content of aircraft's toilets in Guadeloupe, over one year including two different seasons. Tourism is higher during the dry season due to more favourable weather conditions. The flight time between Paris and Guadeloupe is over 8 hours, giving passengers opportunities to go to the toilets. On long-haul flights of more than 6 hours, about 36% of the passengers are likely to defecate, and this probability is higher in men and young people<sup>32</sup>. This represents a good proportion of passengers, but not the majority. Therefore, the study of aircraft waste alone might not be sufficient to assess the spread of AMR, highlighting the interest of adding the analysis of wastewater from hotels where tourists are likely to stay.

To establish the link of wastewater with human gut bacteria, 16S rRNA sequencing was performed to the microbiome of each of the sites studied. A distinct microbiome signature was observed between the samples of LT and HT and AT. As human gut bacteria are found in the WWTF, they are also sought in AT samples. Mainly anaerobic bacteria were found in aircrafts,

which may be due to the conditions present in the tanks, indeed, little oxygen is available in this container therefore only bacteria adapted to this lack of oxygen can survive. These bacteria include the same bacteria as in the WWTF (*Bacteroides*, *Prevotella* and *Faecalibacterium*) that are major constituents of the human gut microbiota<sup>30</sup>.

The data showed different resistome signatures, mostly between AT and the other sites. Tetracycline resistance genes contribute greatly to the resistome of the samples coming from AT. The study by Petersen *et al.* also showed that in all the aircraft from several regions of the world, tetracycline, macrolide and beta-lactam resistance genes were always the most abundant<sup>33</sup>. *Atopostipes*, the most abundant genus in AT, has been found in manure carrying *tetM* genes, maybe explaining *tetM* high relative abundance in AT samples<sup>34</sup>.

AT contain a lower proportion of MGEs, on average they account for 18% of the resistome whereas in hotel wastewater and then in the WWTF receiving this water their abundance is of 25% and 26%. This could be due to the lower diversity of bacteria present in the AT. The presence of these elements could lead to horizontal gene transfer. Already at local population level, there is a possibility of gene transfer, with an even higher proportional abundance of MGEs (32%).

The fact that certain genes are not found in AT may be due to a number of reasons, such as the small size of the population sampled, or the type of sample collected. Another hypothesis is the effective use of disinfectants in aircraft, eliminating certain bacteria and therefore certain ARGs. Tetracycline resistance genes are known to be persistent in the environment also under rough conditions, it may be another hypothesis explaining the high proportion of these resistance genes in AT samples in addition to the presence of the genus *Atopostipes*<sup>35</sup>. The disinfectant used in the aircrafts may act as a factor of co- or cross-selection increasing the phenomenon of AMR as it has been demonstrated with higher incidence of integrons carrying ARGs following exposure to QACs<sup>36</sup>.

The composition of the microbiome and resistome might be impacted by the exposome. Indeed, some compounds may have a deleterious effect on bacterial survival or may influence the spread of AMR by exerting selection pressure and favouring co- and cross-selection<sup>37,38</sup>. In this sense, a variation partitioning analysis was done to assess the contribution of the measured compounds (pharmaceuticals, biocides and heavy metals) on the variance of the resistome. Biocides were found to be more associated with the variance in the resistome followed by heavy metals and the least associated were pharmaceuticals. Exposure to biocides has been shown in other studies to increase the risk of resistance to wide range of antimicrobials<sup>39</sup>. Pharmaceuticals, biocides and heavy metals combined seem to have a higher contribution to the resistome's variability than pharmaceuticals alone (**Fig. S4**). We note that zinc is the element with the highest concentration in the effluents, it has been identified as being able to select strains of *P. aeruginosa* resistant to different metals, and to imipenem<sup>40</sup>. The spread of ARGs potentially brought by passengers may be then favoured by the exposome present in the wastewater.

## Conclusion

Overall, we do not see any change in island resistance, transatlantic supply of resistant genes or bacteria associated with passengers. This is related to the spatial limitations of the study and the low population diversity between mainland France and the island of Guadeloupe. A study

of the diversity of passengers during the periods studied showed that most passengers were either tourists, mainly French from mainland France, locals returning home, or doctors coming to practice on the island. We can be sure that this varies according to origin and destination, with different implications for hygiene and health services. However, focusing on the areas where tourists (or an "imported" population) are staying in a particular place is epidemiologically interesting, as the length of stay of residents increases from a few hours to a few days. The airplanes thus provide a snapshot of the resistance generated by the airplane passengers, while the pumping station that receives the wastewater from the hotels provides more permanent information on the level of resistance brought by travellers and released into the WWTP. In comparison, the WWTF in a town with low tourist activity provides information on the local resistance.

### **Fundings**

This work was supported by the French Funding Agency for Research and the German Federal Ministry of Education and Research (ANR-20-AMBR-0001-01).

### **Acknowledgments**

The authors thank Thibault Stalder for critical reading of the manuscript.

## References

1. Sulis, G., Sayood, S. & Gandra, S. Antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: current status and future directions. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **20**, 147–160 (2022).
2. Rahbe, E., Watier, L., Guillemot, D., Glaser, P. & Opatowski, L. Determinants of worldwide antibiotic resistance dynamics across drug-bacterium pairs: a multivariable spatial-temporal analysis using ATLAS. *Lancet Planet. Health* **7**, e547–e557 (2023).
3. Laupland, K. B., Church, D. L., Vidakovich, J., Mucenski, M. & Pitout, J. D. D. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *J. Infect.* **57**, 441–448 (2008).
4. Tängdén, T., Cars, O., Melhus, A. & Löwdin, E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3564–3568 (2010).
5. Ostholm-Balkhed, A. *et al.* Travel-associated faecal colonization with ESBL-producing Enterobacteriaceae: incidence and risk factors. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2144–2153 (2013).
6. Peirano, G., Laupland, K. B., Gregson, D. B. & Pitout, J. D. D. Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*. *J. Travel Med.* **18**, 299–303 (2011).
7. Kennedy, K. & Collignon, P. Colonisation with *Escherichia coli* resistant to ‘critically important’ antibiotics: a high risk for international travellers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **29**, 1501–1506 (2010).
8. Munoz-Price, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 785–796 (2013).
9. Frost, I., Van Boeckel, T. P., Pires, J., Craig, J. & Laxminarayan, R. Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *J. Travel Med.* **26**, taz036 (2019).
10. Tham, J. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers’ diarrhoea. *Scand. J. Infect. Dis.* **42**, 275–280 (2010).
11. Armand-Lefèvre, L., Andremont, A. & Ruppé, E. Travel and acquisition of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Médecine Mal. Infect.* **48**, 431–441 (2018).
12. Nordahl Petersen, T. *et al.* Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Sci. Rep.* **5**, 11444 (2015).
13. Heß, S. *et al.* Sewage from Airplanes Exhibits High Abundance and Diversity of Antibiotic Resistance Genes. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 13898–13905 (2019).
14. Pärnänen, K. M. M. *et al.* Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Adv.* **5**, eaau9124 (2019).
15. Ahmed, W. *et al.* First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci. Total Environ.* **728**, 138764 (2020).
16. Sims, N. *et al.* Antimicrobials and antimicrobial resistance genes in a one-year city metabolism longitudinal study using wastewater-based epidemiology. *Environ. Pollut.* **333**, 122020 (2023).
17. Johar, A. A. *et al.* Wastewater-based epidemiology for tracking bacterial diversity and

- antibiotic resistance in COVID-19 isolation hospitals in Qatar. *J. Hosp. Infect.* **141**, 209–220 (2023).
18. Chacón, L., Morales, E., Valiente, C., Reyes, L. & Barrantes, K. Wastewater-Based Epidemiology of Enteric Viruses and Surveillance of Acute Gastrointestinal Illness Outbreaks in a Resource-Limited Region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **105**, 1004–1012 (2021).
  19. Volant, S. *et al.* SHAMAN: a user-friendly website for metataxonomic analysis from raw reads to statistical analysis. *BMC Bioinformatics* **21**, 345 (2020).
  20. Buelow, E. *et al.* Comparative gut microbiota and resistome profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. *Microbiome* **5**, 88 (2017).
  21. Buelow, E. *et al.* Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94**, fiy087 (2018).
  22. Bastian, M., Heymann, S. & Jacomy, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proc. Int. AAAI Conf. Web Soc. Media* **3**, 361–362 (2009).
  23. Buelow, E. *et al.* Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res. X* **7**, 100045 (2020).
  24. Paíga, P. *et al.* Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Sci. Total Environ.* **573**, 164–177 (2016).
  25. Subedi, B., Balakrishna, K., Joshua, D. I. & Kannan, K. Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products including psychoactives, antihypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in southern India. *Chemosphere* **167**, 429–437 (2017).
  26. Hapeshi, E. *et al.* Licit and Illicit Drugs in Urban Wastewater in Cyprus. *CLEAN – Soil Air Water* **43**, 1272–1278 (2015).
  27. Costea, P. I. *et al.* Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **3**, 8–16 (2018).
  28. Miquel, S. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 255–261 (2013).
  29. Cyprowski, M. *et al.* Anaerobic bacteria in wastewater treatment plant. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **91**, 571–579 (2018).
  30. Piquer-Esteban, S., Ruiz-Ruiz, S., Arnau, V., Diaz, W. & Moya, A. Exploring the universal healthy human gut microbiota around the World. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **20**, 421–433 (2021).
  31. Berendonk, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 310–317 (2015).
  32. Jones, D. L. *et al.* Suitability of aircraft wastewater for pathogen detection and public health surveillance. *Sci. Total Environ.* **856**, 159162 (2023).
  33. Nordahl Petersen, T. *et al.* Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Sci. Rep.* **5**, 11444 (2015).
  34. Begmatov, S. *et al.* Distribution Patterns of Antibiotic Resistance Genes and Their Bacterial Hosts in a Manure Lagoon of a Large-Scale Swine Finishing Facility. *Microorganisms* **10**, 2301 (2022).
  35. Yoo, K. & Lee, G. Investigation of the Prevalence of Antibiotic Resistance Genes According to the Wastewater Treatment Scale Using Metagenomic Analysis. *Antibiotics* **10**,

188 (2021).

36. Gaze, W. H., Abdousslam, N., Hawkey, P. M. & Wellington, E. M. H. Incidence of Class 1 Integrons in a Quaternary Ammonium Compound-Polluted Environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1802–1807 (2005).

37. Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V. & Hart, A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).

38. Wang, Y. *et al.* Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. *ISME J.* **14**, 2179–2196 (2020).

39. Cheng, G. *et al.* Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **8**, 158 (2019).

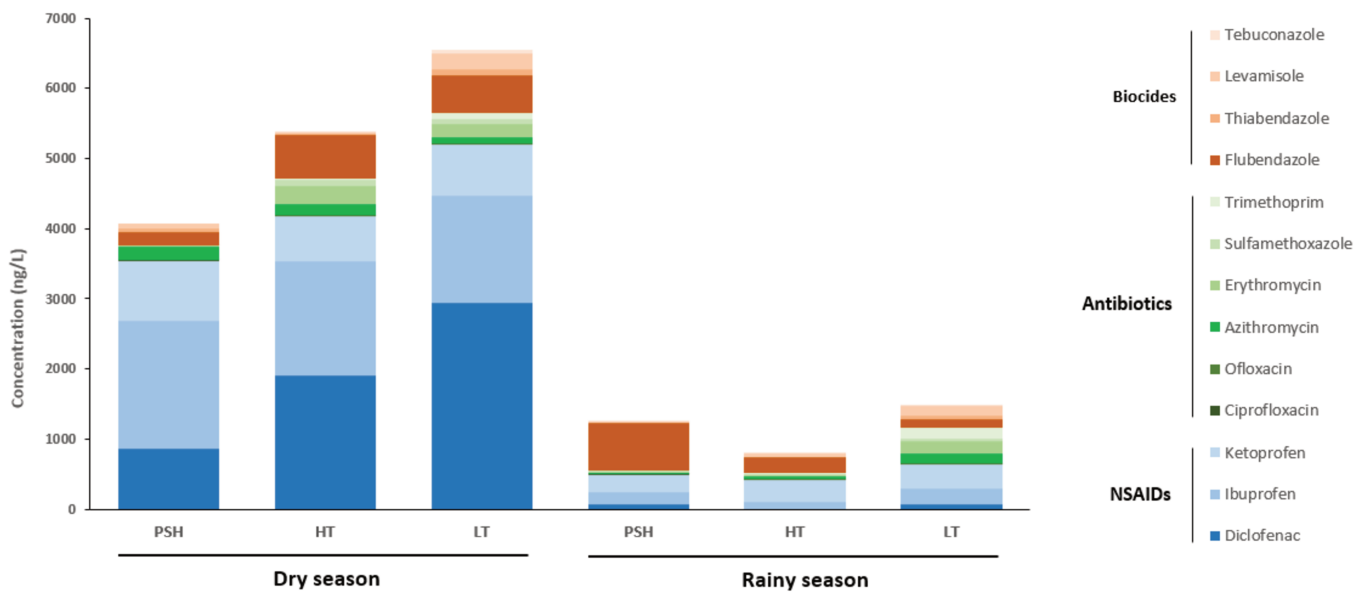
40. Perron, K. *et al.* CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **279**, 8761–8768 (2004).

## Supplementary data

Table S1: Characteristics of the WWTPs

	Compliance	Population equivalent	Wastewater treated	Treatment	Effluent flow rate (m <sup>3</sup> /d)
WWTP Gosier	Non-compliant	15 000	Clinical and urban	Primary and secondary treatment with conventional activated sludge	2 710
WWTP Lamentin	Compliant	4 000	Urban	Primary and secondary treatment with conventional activated sludge	1 404

A



B

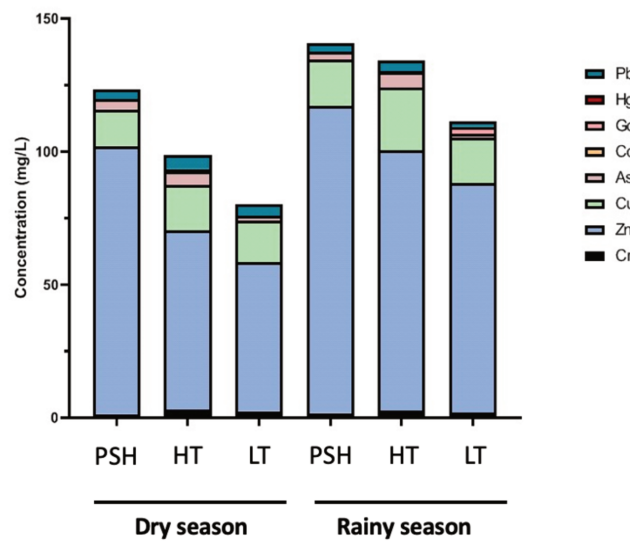


Figure S1: Concentrations of the molecules of the exposome, A: Biocides, NSAIDs and Antibiotics (in ng/L), B: Heavy metals (in mg/L), in the samples of the pumping station of the hotels (PSH), the high tourism (HT) and low tourism (LT) samples, for dry and rainy seasons.



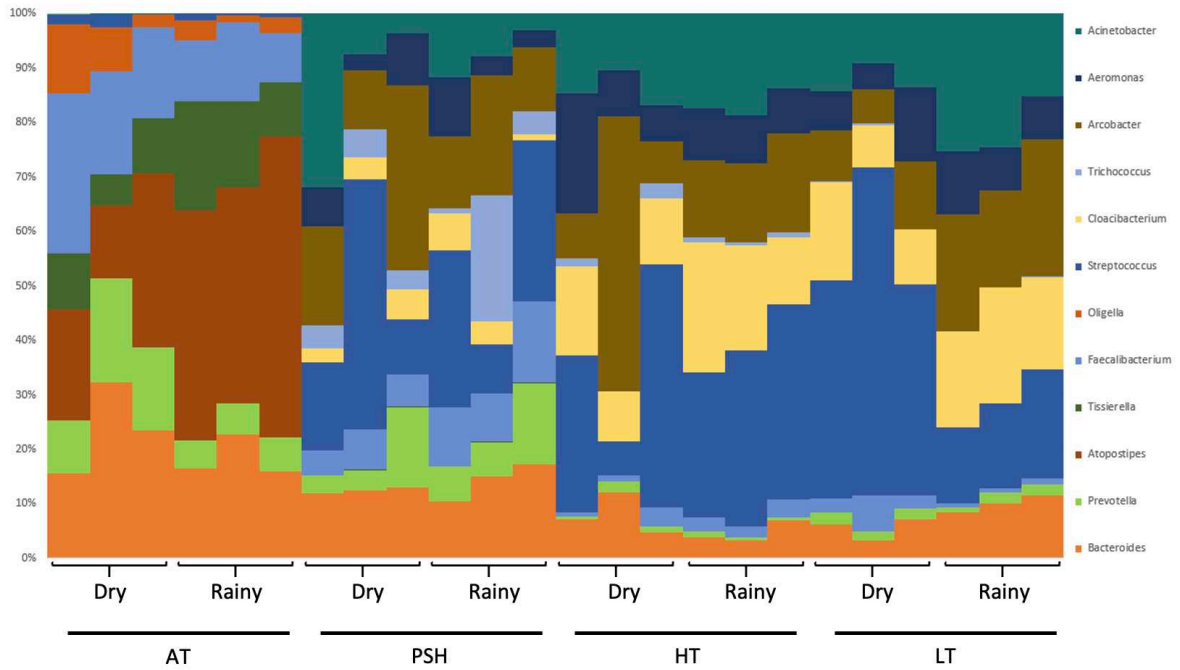


Figure S2: Proportional abundance of the microbiome with the most abundant genus in all the samples for both dry and rainy season in the samples collected in the aircrafts' toilets (AT), the pumping station of the hotels (PSH), the high tourism (HT) and low tourism (LT) samples. Each colour represents a bacterial genus.

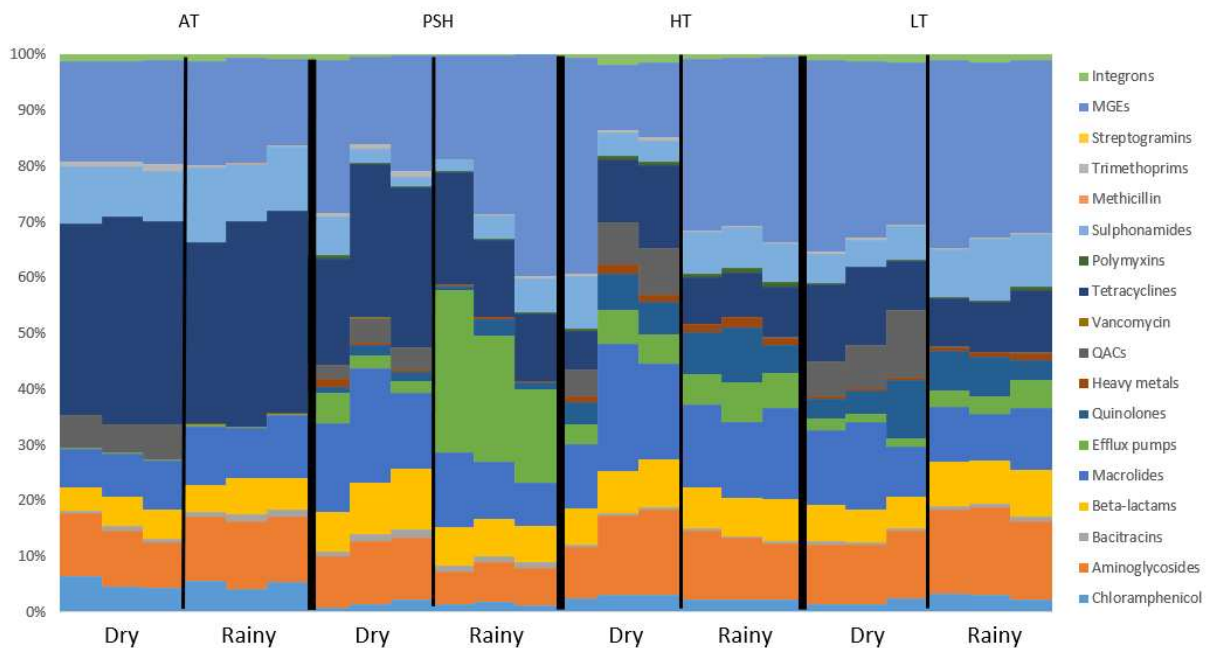


Figure S3: Proportional abundance of the résistome grouped in gene families (ARGs classes, heavy metals and QACs resistance genes, integron integrase genes and MGEs) in the content of aircrafts' toilets (AT), in the pumping station of the hotels (PSH) and in the high tourism (HT) and low tourism (LT) samples, during dry and rainy seasons.

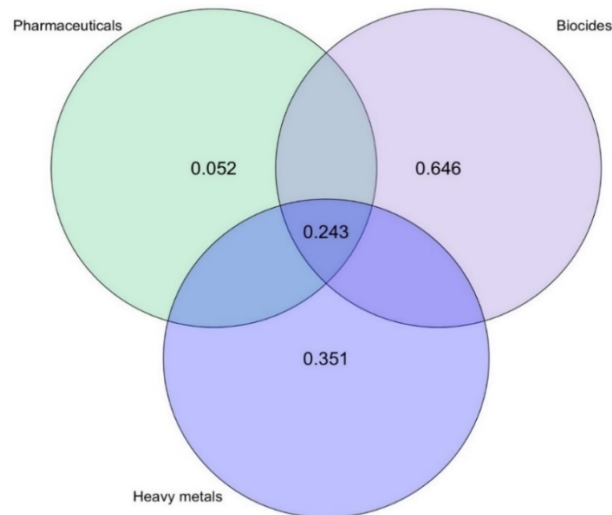


Figure S4: Representation of the variation partitioning analysis results in the form of a Venn diagram showing the contribution of the measured chemicals of the exposome on the resistome. In the diagram, the higher the number, the greater the compound's contribution to variation in the resistome, while the lower the number, the less the compound contributes to variation in the resistome. The contribution of the combination of two or all compounds is shown in the overlapping circles. When the compound or the combination of two or more compounds doesn't contribute to the variation of the result, no results are shown on the diagram.

### III. L'approche One-Health pour l'évaluation des voies de transmission

Les exploitations agricoles tout comme les stations d'épuration représentent des habitats importants pour un grand nombre d'animaux sauvages, notamment les oiseaux et les petits mammifères (Swift et al. 2019). Ces animaux vont pouvoir se nourrir directement dans ces sites. De plus, la résistance aux antimicrobiens chez les animaux sauvages vivant à proximité de l'Homme a été suggérée comme étant liée à l'impact anthropique, telles que les exploitations agricoles et les déchets humains, en raison de leur exposition aux antimicrobiens et aux BRA (Swift et al. 2019). Une étude montre que les rongeurs vivant à proximité d'une rivière recevant des effluents d'eaux usées sont plus porteurs de *E. coli* résistants que les rongeurs vivant à l'intérieur des terres (Furness et al. 2017). Mais peu de preuves permettent d'assurer le lien entre l'impact anthropique et la résistance chez les animaux sauvages.

Dans cette étude, pour avoir les 3 compartiments de l'approche One-Health, humain, animal et environnement, les échantillons d'eaux usées de l'hôpital, de l'entrée de la STEU de Jarry, de l'océan et les animaux collectés dans et en dehors de la station ont été choisis dans les analyses.

#### III.1. Comparaison de la composition taxonomique

La composition taxonomique du microbiome des échantillons a été analysée en parallèle de l'analyse du résistome. L'étude du microbiome de ces échantillons a montré dans les analyses précédentes que les mêmes genres bactériens étaient majoritaires dans les eaux de l'hôpital et les eaux de l'entrée de la STEU mais dans des proportions différentes indiquant l'influence du microbiome des eaux usées hospitalières sur le microbiome de la station. En revanche, leur microbiome était totalement différent de celui de l'océan, qui était donc peu impacté par les eaux de la station. De plus, les genres majoritairement abondants dans le microbiome des animaux étaient différents de ceux des effluents de l'hôpital, de l'entrée de la STEU et également de l'océan.

La visualisation des données du microbiome a été réalisée par le biais d'une ACP sur les échantillons étudiés. Les deux dimensions extraites, expliquent respectivement 21.3 % et 11.1 % des différences totales entre les microbiomes des échantillons.

L'ACP du microbiome montre que les animaux forment un cluster, qu'ils vivent dans la station d'épuration ou à l'extérieur. S'ajoutent également dans ce même cluster les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan. En revanche, le microbiome des eaux de l'hôpital et de l'entrée de la STEU sont séparés de ce cluster (**Figure 52**). Le microbiome des échantillons des eaux usées de l'hôpital et de la STEU sont donc plus différents du microbiome des animaux que le microbiome des eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan.

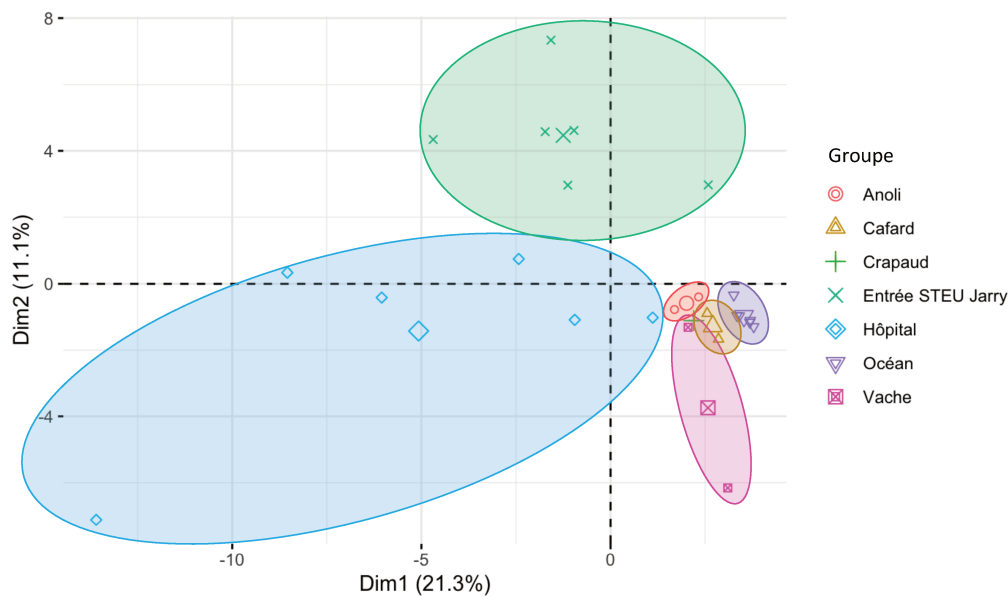


Figure 52 : Analyse en composantes principales du microbiome des échantillons collectés au CHUG, en entrée de la STEU de Jarry, dans l'océan et des échantillons animaux vivant dans (anolis, cafards, crapauds) et en dehors de la STEU (vaches), collectés pendant les campagnes 2 et 3, en 2022. Sont représentés en rouge les anolis, en brun les cafards, en vert clair les crapauds, en vert foncé les eaux de l'entrée de la STEU, en bleu les eaux usées de l'hôpital, en violet le rejet de l'émissaire dans l'océan et en rose les vaches.

### III.2. Comparaison du résistome dans les compartiments « One-Health »

Précédemment il a été montré que les eaux de l'hôpital et de l'entrée de la STEU de Jarry présentaient une signature du résistome similaire montrant encore une fois l'influence des eaux usées hospitalières sur le résistome de la STEU. Suivant les semaines et les campagnes de prélèvements, le résistome au niveau des eaux collectées en sortie de l'émissaire dans l'océan variait, avec pour certaines semaines une similarité aux deux autres échantillons tandis que d'autres sont très différentes. Parmi les gènes d'intérêt sélectionnés, les gènes présents dans les eaux usées hospitalières sont aussi retrouvés en entrée de la STEU, on détecte ensuite ces mêmes gènes à la sortie de l'émissaire dans l'océan, en faible abondance lors de la campagne 2 mais en abondance moyenne à élevée lors de la troisième campagne. C'est notamment le cas pour les gènes *aac(6')-lb* et *qnrS*. Concernant les animaux, les profils de résistance étaient différents les uns des autres mais également différents des eaux de l'hôpital, de la station d'épuration et de la sortie de l'émissaire dans l'océan. Le résistome des cafards et des crapauds qui sont au contact des eaux de la station ne ressemble pas à celui des eaux de la STEU. En revanche, les gènes d'intérêt *ermB* et *tetM* étaient abondants dans le résistome de ces animaux tout comme ils l'étaient dans les eaux de l'hôpital et de la STEU.

Une ACP a été réalisée sur les données de résistome des échantillons animaux et des échantillons d'eaux de l'hôpital, de l'entrée de la STEU de Jarry et de l'océan en prenant en compte les campagnes 2 et 3, campagnes pour lesquelles les échantillons de l'océan étaient disponibles. Les deux composantes principales extraites, Dim1 et Dim2, expliquent respectivement 43.2% et 12.2 % des différences totales entre les résistomes des échantillons.

Les résultats de l'ACP montrent, dans un premier temps, que les animaux, qu'ils vivent dans la station ou en dehors de la station d'épuration, forment un cluster. Le microbiome des eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan fait également partie de ce même cluster. A

contrario, les eaux de l'hôpital et de l'entrée de la station semblent également former un cluster différent de celui des animaux et de la sortie de l'émissaire dans l'océan (**Figure 53**). Ces deux sites ont donc un résistome similaire comme il a été montré précédemment, mais qui est différent des eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan mais aussi de celui des animaux. Le résistome des animaux et celui de l'émissaire dans l'océan semblent moins différents en comparaison avec le résistome des deux autres sites.

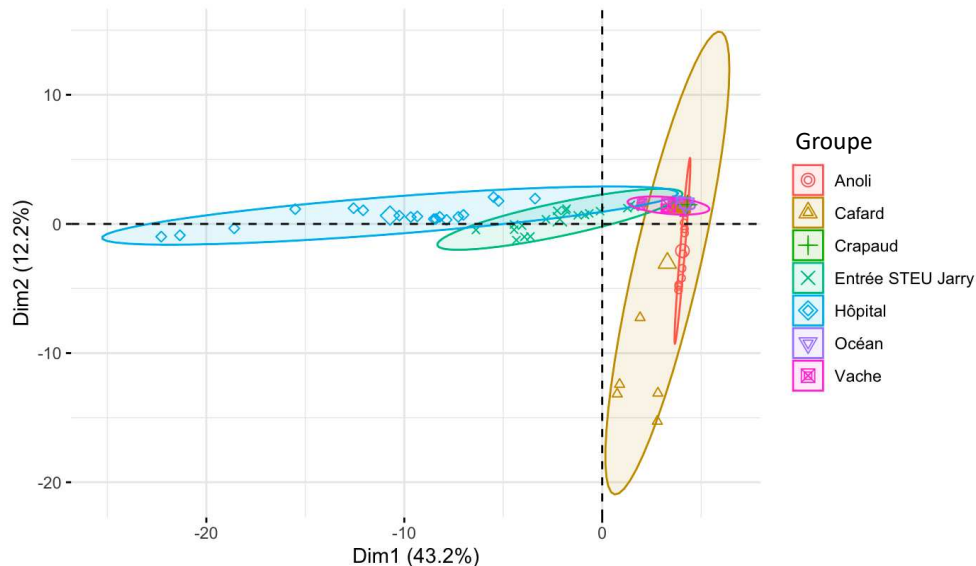


Figure 53 : Analyse en composantes principales du résistome des échantillons collectés au CHUG, en entrée de la STEU de Jarry, en sortie de l'émissaire dans l'océan et des échantillons animaux vivant dans (anolis, cafards, crapauds) et en dehors de la STEU (vaches), collectés pendant les campagnes 2 et 3, en 2022. Sont représentés en rouge les anolis, en brun les cafards, en vert clair les crapauds, en vert foncé les eaux de l'entrée de la STEU, en bleu les eaux usées de l'hôpital, en violet le rejet de l'émissaire dans l'océan et en rose les vaches.

Une analyse de réseau a été réalisée sur les gènes d'intérêt de ces échantillons afin de mettre en exergue les gènes qui sont partagés entre les différents échantillons étudiés.

Les résultats montrent (**Figure 54**) que la majorité des gènes d'intérêt est partagée entre tous les compartiments. En revanche, 4 gènes ne sont pas partagés entre tous. Le gène *mcr-1* n'est présent que dans les échantillons de l'entrée de la STEU et dans l'océan, le gène *mecA* est partagé entre les effluents de l'hôpital, l'entrée de la STEU et l'océan et le gène *bla<sub>NDM</sub>* n'est pas présent dans les échantillons des animaux vivant en dehors de la STEU. Enfin, le gène *aac(6')-lb* est présent dans les échantillons du CHUG, de l'entrée de la station et dans l'océan mais aussi dans les échantillons animaux vivant dans la station alors qu'il n'est pas présent chez les animaux extérieurs à la STEU. La présence de ce gène de résistance chez les animaux vivant dans la station pourrait donc indiquer une potentielle contamination par les eaux de la station.

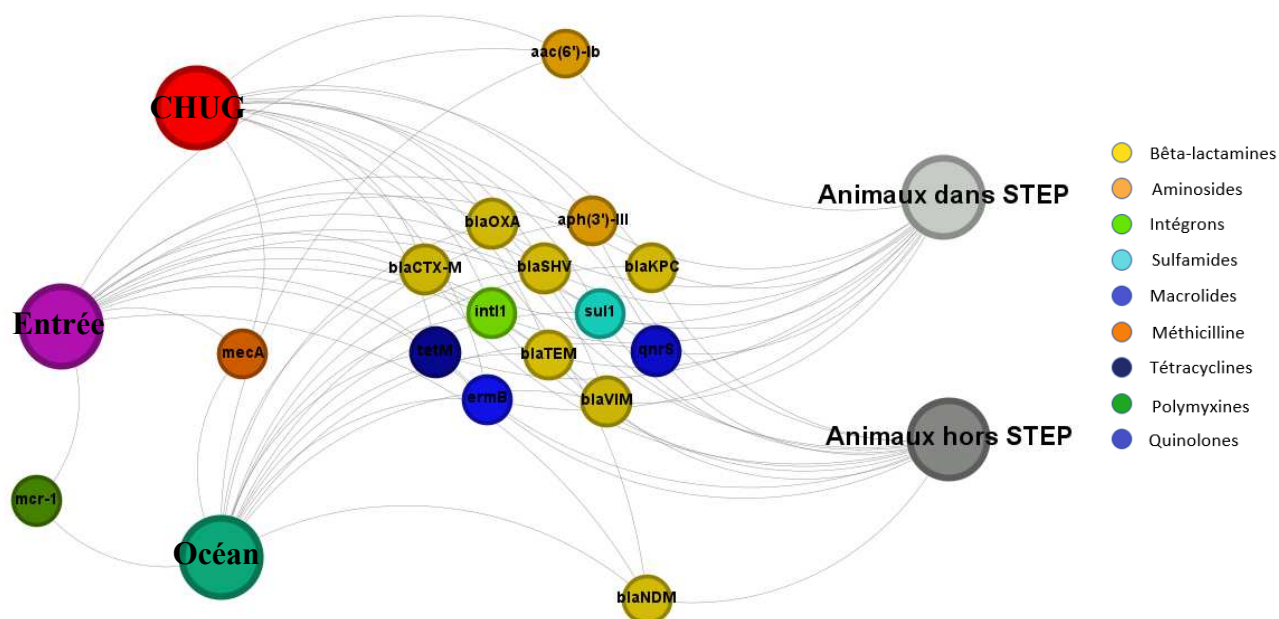


Figure 54 : Analyse du réseau des gènes d'intérêt partagés entre les sites étudiés : hôpital, entrée de la STEU de Jarry, océan, animaux vivant dans et en dehors de la STEU. Les liens indiquent un partage des gènes entre les différents points reliés et les couleurs correspondent aux classes auxquelles appartient ces gènes. Les gènes au centre de la figure sont partagés entre chacun des compartiments.

En conclusion, les résultats montrent une influence du résistome et du microbiome des eaux usées de l'hôpital sur les eaux de l'entrée de la STEU. Une transmission de bactéries du microbiote intestinal et de gènes de résistance d'intérêt clinique se fait donc entre l'Homme et l'environnement via les eaux usées. Les effluents de la STEU peuvent impacter l'environnement récepteur des eaux traitées mais seulement au niveau du résistome. Les bactéries du microbiote intestinal sont peu abondantes dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan. Cela peut être dû à l'abatement de la charge bactérienne par le traitement de la STEU ou les conditions particulières auxquelles sont confrontées les bactéries dans la STEU mais aussi une fois rejetées dans l'océan, où seules les bactéries les mieux adaptées survivent. Le résistome et le microbiome des animaux vivant à l'intérieur de la STEU est différent de celui des eaux de la STEU auxquels ces animaux sont probablement exposés. Mais une partie des gènes d'intérêt sélectionnés sont partagés entre les eaux usées de l'hôpital, les eaux de la STEU, les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan, les animaux vivant à l'intérieur de la STEU mais aussi les animaux vivant autour de cette STEU. Ceci ne suggère pas de transmission spécifique entre chacun de ces compartiments. À l'exception du gène *aac(6')-Ib* qui permet de faire la différence entre les animaux vivant dans la STEU et ceux échantillonnés en dehors de celle-ci.

Malgré ces conclusions, les résultats de l'approche One-Health reste complexe à évaluer. De plus, sur ces voies de transmission potentielles entre les trois compartiments viennent s'ajouter les facteurs environnementaux et sociaux pouvant influencer la résistance. Comme les résultats l'ont montré l'effet de ces facteurs se voit principalement au niveau du résistome, c'était le cas pour la pandémie de Covid-19 et la saisonnalité. L'exposome représentait également un facteur de risque dans certains cas pour la sélection de la résistance, il était impliqué dans la variation du résistome et était corrélé à la présence de certains GRA.

# D. Discussion

Peu d'informations sont disponibles sur l'état de la résistance aux antimicrobiens en Guadeloupe et les données actuellement disponibles sont plutôt récentes. Ainsi un grand nombre d'infections associées à des entérobactérales productrices de BLSE ont été rapportées et on constate que les niveaux de résistance des souches de *E. coli* responsables d'infections urinaires sont similaires à ceux observés en Métropole (Sadikalay 2018). Les travaux de Stéphanie Guyomard-Rabenirina et al. (2017) ont montré que la dissémination dans l'environnement des souches d'entérobactérales résistantes se fait majoritairement via les eaux usées impactant la qualité des eaux de baignade et, de ce fait, potentiellement l'activité touristique, et donc économique de l'île.

En s'appuyant sur le développement de la surveillance des eaux usées pour détecter des phénomènes sanitaires, largement développé pendant la pandémie au Sars-CoV-2, et appelé « wastewater-based epidemiology » (WBE), il est possible d'évaluer la présence globale de gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) dans un environnement donné, quantifier les GRA d'intérêt clinique ou identifier des gènes émergents et ainsi utiliser ces conclusions comme outil de prédiction au niveau communautaire (Voir les travaux de Pärnänen et al. 2019, Tiwari, Kurittu, et al. 2022; Larsson, Flach, and Laxminarayan 2023). C'est sur cette approche que s'appuie ce travail de thèse, basé sur la surveillance des eaux usées, pour caractériser les résistomes dans différentes matrices et observer ses variations climatiques ou anthropiques.

Dans ce travail, l'approche WBE a été élargie à une approche One-Health (activités humaines, environnement, animaux) couplant à la surveillance des effluents urbains et sanitaires, des prélèvements de fèces de différentes espèces animales, associés à l'évaluation de facteurs environnementaux ou de comportement social, afin d'évaluer les voies de transmission de la RAM.

## I. Caractérisation du microbiome et du résistome en Guadeloupe

La présence de certaines espèces a été considérée comme indicateur pour évaluer le niveau global de résistance aux antibiotiques dans l'environnement (Berendonk et al., 2015). Le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S dans les échantillons a montré sur la durée de l'étude que la communauté microbienne d'un même site était stable. Les phyla majoritairement retrouvés dans les échantillons d'effluents correspondaient aux phyla majoritaires du microbiote intestinal humain, c'est-à-dire *Pseudomonadota*, *Bacillota* et *Bacteroidota* (Landman and Quévrain 2016). Dans la littérature les *Pseudomonadota* sont décrites comme étant le phylum abritant le plus grand nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, suivi du phylum des *Bacillota* et des *Bacteroidota* (Nguyen et al. 2021).

Dans les effluents hospitaliers, un mélange de bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatives correspondant principalement au microbiote intestinal humain a été retrouvé, indiquant l'impact de l'homme sur la constitution de ces effluents. En effet, le microbiote intestinal humain est majoritairement composé de bactérie anaérobies obligatoires et une minorité de bactéries anaérobies facultatives. Une fois excrétée dans l'environnement, les bactéries sont soumises à de fortes pressions écologiques telles que la diminution de la température, une baisse de la pression osmotique, des concentrations en oxygène plus élevées, des interactions avec d'autres organismes ou encore une exposition à des composés chimiques. En plus des bactéries intestinales, d'autres bactéries peuvent rejoindre les eaux usées, c'est notamment le cas des bactéries environnementales provenant des réseaux d'assainissement et des eaux de ruissellement (Tiwari, Kurittu, et al. 2022). C'est pourquoi les communautés microbiennes ont ensuite évolué au cours du parcours des eaux usées dans le réseau, passant dans les eaux de l'entrée des STEU, d'une grande proportion de bactéries anaérobies strictes à



une majorité de bactéries anaérobies facultatives, probablement en lien avec le passage à des conditions aérobies dans les eaux usées (Quintela-Baluja et al. 2019; Bengtsson-Palme et al. 2016). La survie des bactéries diffère donc suivant les phyla ; la possibilité de les retrouver dans les eaux usées varie également. En effet, les *Bacteroidota*, anaérobies stricts, survivent moins longtemps que les *Pseudomonadota* et les *Bacillota* germes anaérobies facultatifs (Tiwari, Kurittu, et al. 2022). Parmi toutes ces bactéries présentes dans les eaux usées, une partie peut être porteuses de GRA. On retrouve notamment *Aeromonas*, plus particulièrement dans les eaux de l'hôpital, qui a été décrit comme hébergeant une diversité de GRA et a également été suggérée comme un indicateur de la dissémination de la résistance au niveau des eaux usées (Hassoun-Kheir et al. 2020).

Dans la suite du continuum, les résultats ont montré la présence de bactéries majoritairement anaérobies facultatives et aérobies dans les eaux de l'entrée et de la sortie de chacune des STEU, indiquant que bien les bactéries capables de survivre en présence d'oxygène sont les plus aptes à proliférer dans les STEU. Le traitement aérobie mis en place dans le procédé des STEU, associé aux conditions de fonctionnement des ouvrages, permet donc une réduction considérable de l'abondance des bactéries d'origine fécale. Cependant, de nombreux pathogènes sont anaérobies facultatifs, et peuvent survivre dans les eaux usées et dans leur passage dans les différentes opérations unitaires de dépollution des STEU (Bengtsson-Palme et al. 2016).

Dans les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan et dans les eaux de la mangrove, on retrouve majoritairement des bactéries adaptées aux conditions particulières et extrêmes retrouvées dans ces écosystèmes notamment leur forte salinité. Les bactéries du genre *Prochlorococcus* composent en majorité leur microbiome, il s'agit d'une cyanobactérie, organisme adapté à des écosystèmes pauvres en nutriments, tel que l'océan (Vincent 2009). Il a été suggéré que les cyanobactéries seraient un réservoir de GRA et joueraient un rôle dans la dissémination de la RAM dans les milieux aquatiques (Zhiyuan Wang et al. 2020). Le microbiome de la sortie de l'émissaire dans l'océan et de la mangrove du Gosier est donc peu impacté par les eaux des STEU, celles-ci étant diluées et dispersées à leur arrivée dans ces étendues d'eau. De plus, certaines bactéries présentes dans les eaux de la STEU ne sont pas adaptées aux conditions salines qui sélectionnent les germes à tendance halophile. Il n'a pas été détecté de *Prochlorococcus* au sein du microbiome de la mangrove située au Lamentin mais, un mélange de bactéries comparables à celles retrouvées en entrée et en sortie de la STEU et d'autres bactéries environnementales. Il s'avère que le point de prélèvement au niveau de cette mangrove était relativement proche de la STEU (400m), distance qui semble insuffisante pour une dilution des rejets de la station d'épuration.

Parmi les bactéries détectées dans les différents échantillons certaines sont porteuses de GRA. Comme les eaux usées ont été décrites comme reflétant partiellement les caractéristiques du microbiome humain, le résistome de ces eaux est donc influencé par la prévalence de la résistance dans la communauté (Pärnänen et al. 2019), constatation autorisant théoriquement le suivi des GRA à travers l'analyse des eaux usées.

Les eaux usées de l'hôpital sont caractérisées par une abondance relative élevée des GRA constituant le résistome, confirmant d'autres études menées sur la caractérisation des effluents hospitaliers, et leur spécificité (signature) (Czekalski et al. 2012; Buelow et al. 2018; Hassoun-Kheir et al. 2020; Lepper et al. 2023). Les gènes de résistance aux aminosides ainsi que les gènes de résistance aux bêta-lactamines y ont été retrouvés majoritairement. À ces gènes s'ajoutent les gènes de résistance aux macrolides, principalement retrouvés en entrée des différentes STEU et dans le poste de refoulement, et les gènes de résistance aux sulfamides et aux QAC retrouvés en sortie des trois STEU. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Buelow et al. (2020) qui dans sa comparaison entre les effluents hospitaliers et urbains, avait

montré une plus forte abondance des gènes de résistance aux bêta-lactamines dans les eaux usées de l'hôpital et une majorité de gènes de résistance aux macrolides dans les effluents urbains. Ces résultats correspondent également à l'utilisation actuelle des antibiotiques à l'hôpital et en médecine de ville en France où les bêta-lactamines sont les plus consommés (ANSM 2023).

Une diminution de l'abondance relative totale a été observée le long des différents continuums. Pour le continuum CHUG – STEU de Jarry, la diminution entre l'hôpital et l'entrée de la STEU est notamment due au fait que les eaux usées des hôpitaux, bien qu'elles soient riches en GRA, représentent en moyenne seulement 1% des eaux arrivant à la station et sont donc fortement diluées avec les eaux urbaines (Karkman et al. 2018). Suite au traitement des eaux par chacune des STEU, les résultats ont montré une diminution de l'abondance relative totale du résistome entre l'entrée et la sortie. Les STEU permettent de réduire l'abondance des GRA, certainement par la diminution de la biomasse bactérienne plutôt qu'en éliminant spécifiquement les GRA (Ying Wang et al. 2022). En effet, les STEU éliminent en moyenne 1 à 2 logs de la charge bactérienne éliminant avec elles une partie des GRA (Manaia et al. 2018). Or, dans notre étude, deux des trois stations d'épuration choisies sont considérées comme étant non conformes, une non-conformité qui peut provenir d'équipements vétustes ou encore de mauvaises performances épuratoires. Plus globalement, en Guadeloupe en 2020, 72% des STEU de plus de 2 000 EH étaient déclarées non conformes (DEAL 2020). Malgré les fonctionnements parfois défectueux des installations, nos résultats montrent que les stations d'épuration jouent un rôle dans la réduction de la contamination bactérienne et permettent de réduire la dissémination de pathogènes et de GRA dans l'environnement. À contrario, du fait que les réseaux transportent les effluents urbains et hospitaliers, et donc tous les germes autochtones, les STEU demeurent quantitativement et qualitativement des hot spots pour la dissémination des GRA et des BRA.

Ainsi, si l'abondance relative des gènes constituant le résistome est finalement plus faible une fois les eaux traitées arrivées dans l'environnement récepteur, tel que, de manière assez spécifique en Guadeloupe, l'océan ou la mangrove, il persiste au sein de l'effluent rejeté, des GRA susceptibles d'être transférés à des bactéries environnementales. Ces environnements, plus particulièrement les mangroves, ont été décrits comme filtrantes et seraient capables de compléter le traitement par filtration, d'éliminer des nutriments par l'action de la végétation et de réduire la présence de gènes de résistance (Palacios et al. 2021). Il a été suggéré que les mangroves pourraient donc être intégrées dans le bilan global du processus de traitement des eaux (au même titre que les solutions fondées sur la nature (SFN)) (Wu et al. 2008), pour autant qu'elles soient dimensionnées pour cela. Dans notre étude, des gènes de résistance aux sulfamides et aux QAC ont été retrouvés majoritairement dans les deux mangroves. Ce qui est cohérent avec ce qui a été trouvé dans la littérature (Nielsen, Wang, and Jiang 2021; Ullah et al. 2019).

L'océan est considéré comme une vaste étendue d'eau dans laquelle la dilution et la dispersion des gènes peut avoir lieu (Hatosy and Martiny 2015), mais a été peu analysé. Des gènes de résistance aux aminosides et aux bêta-lactamines ont majoritairement été détectés dans les eaux à la sortie de l'émissaire dans l'océan en cohérence avec la littérature (Nielsen, Wang, and Jiang 2021; Ullah et al. 2019). Au vu de la présence de ces gènes, il est nécessaire que les études de courantologie soient menées de manière effective afin d'éviter un retour de ces polluants sur les plages.

Les océans couvrent environ 70% de la surface de la Terre et hébergent  $10^{29}$  bactéries entre lesquelles des transferts horizontaux de ces gènes de résistance peuvent avoir lieu (Hatosy and Martiny 2015). Une étude a notamment montré que les transferts horizontaux de gènes étaient particulièrement plus élevés dans les environnements marins (McDaniel et al. 2010). Cet

écosystème pourrait, par conséquent, être un réservoir important de GRA. De plus, il a été montré que la présence de GRA était augmentée au niveau des eaux côtières impactées par l'Homme, dont les eaux de STEU, les déchets hospitaliers ou encore les déchets de l'agriculture (Port et al. 2012).

Globalement, dans les eaux étudiées une grande proportion d'EGM a été retrouvée, également représentant jusqu'à 30 % du résistome. Ces éléments sont susceptibles d'être associés à des GRA favorisant leur transfert horizontal (Partridge et al. 2018). Dans les sites étudiés, les IS de la famille IS6 sont trouvés en forte abondance. Ces IS sont impliquées dans le transfert de GRA entre les plasmides conjugatifs et le chromosome bactérien. Les IS appartenant à la famille IS6, telles que IS26 et IS6100, sont considérées comme les plus efficaces pour le transfert de GRA. Elles ont également été décrites comme génératrices de clusters de GRA (Che et al. 2021; Varani et al. 2021).

Des gènes d'intérêt ont été sélectionnés car considérés comme de bons indicateurs. Gènes d'intérêt clinique avec une prévalence importante dans l'environnement, ils sont souvent associés à des EGM indiquant une potentielle dissémination par transfert horizontal. Dans le résistome des échantillons, les gènes d'intérêt les plus abondamment retrouvés comprennent les gènes de résistance aux aminosides *aac(6')-Ib* et *aph(3')-III*, de résistance aux bêta-lactamines *blaTEM*, *blaSHV*, *blaVIM* et *blaKPC*, de résistance aux macrolides *ermB*, de résistance aux quinolones *qnrS* et de résistance aux sulfamides *sulI*. Tous ces gènes présents en forte abondance font partie des gènes souvent retrouvés dans les eaux des stations d'épuration dans diverses études (Nguyen et al. 2021). Dans les études, le gène *sulI* est généralement le gène détecté le plus abondamment dans les eaux usées et traitées, peut-être en raison de l'utilisation depuis très longtemps des sulfamides (Caucci et al. 2016).

En revanche, la prévalence de bactéries productrices de la carbapénémase KPC en Guadeloupe est très faible à l'hôpital, ce qui pourrait indiquer que ce gène ne serait pas d'origine humaine dans nos échantillons mais pourrait provenir plutôt d'un progéniteur environnemental. D'autres études ont également suspecté l'origine environnementale des gènes de carbapénémase dans l'environnement du fait de la présence d'*Enterobacteriaceae* productrices de GES et de NDM dans les eaux usées ne correspondant pas aux cas cliniques (White et al. 2016; Tiwari, Paakkanen, et al. 2022). Pour KPC, le genre *Chromobacterium* a notamment été décrit comme un des progéniteurs potentiels de KPC il pourrait donc être la raison de la présence de ce gène dans nos échantillons (Gudeta et al. 2016). Ce genre a été retrouvé dans les échantillons où KPC est présent, ce qui appuie cette hypothèse.

Parmi les gènes d'intérêt sélectionnés, les gènes *aac(6')-Ib*, *qnrS* et *sulI* sembleraient être les plus persistants. On les retrouve dans tous les effluents : eaux usées de l'hôpital, entrée et sortie des STEU, ainsi que dans l'océan et la mangrove. Lors de baignade, la population pourrait donc être au contact de ces gènes. Il a déjà été montré qu'après baignade, des GRA peuvent être retrouvés sur la peau et persister jusqu'à 6h après la baignade (Nielsen, Wang, and Jiang 2021). Les normes actuelles de qualité des eaux récréatives ne protègent pas la population contre l'exposition aux GRA pendant les activités récréatives aquatiques.

De plus, la Guadeloupe est une île dont l'économie dépend fortement du tourisme. En effet, en 2019 le tourisme contribuait à hauteur de 5.2 % au PIB de la Guadeloupe (IDEOM 2023). Pour les touristes, le principal attrait de cette île reste les plages, 31 % des touristes viendraient en Guadeloupe pour celles-ci. La contamination de ces zones touristiques pourrait donc être également néfaste pour la Guadeloupe d'un point de vue économique.

Sur la base des méthodes actuelles, la non-détection de certaines BRA et de certains GRA ne peut pas être considérée comme une absence de risque. En effet, les BRA et les GRA qui sont à des concentrations inférieures aux limites de détection et de quantification des méthodes

utilisées peuvent quand même représenter un risque significatif pour la santé humaine (Manaia 2017). De plus, la détection des GRA n'indique pas que la résistance est exprimée, conférant une résistance efficace, ou que le GRA est sous une forme biologiquement active, ce qui rend cette analyse plus complexe. L'analyse de l'ARNm des principaux GRA ou MGE, ou de l'ensemble de la communauté (métatranscriptomique) pourraient compléter ces approches globales et affiner les analyses de risque (Miłobedzka et al. 2022; Buelow et al. 2023).

Outre les limites de détection des méthodes utilisées, une des limites de cette étude se trouve dans le fait que les prélèvements de tous les points d'un même continuum ont été réalisés le même jour, ne laissant pas le temps à l'eau usée d'aller du début du continuum à la fin du continuum, ce qui nous aurait permis de mieux suivre la dissémination. Il aurait fallu faire les prélèvements séquentiellement, en prenant en compte le temps moyen de transit de l'eau à travers les réseaux d'assainissement et dans la STEU.

## **II. Le rôle des conditions environnementales et sociales sur la résistance**

Les eaux usées ont des avantages en tant que matrice de surveillance, mais il faut tenir compte de leurs caractéristiques spécifiques. Les microbiomes et les résistomes finaux seront influencés par les changements dans les environnements naturels ou construits que traversent les eaux usées. En effet, divers facteurs comme le climat local, les conditions environnementales, en plus de la géographie, sont cruciaux pour la caractérisation de ces données de microbiome et résistome (Munk et al. 2022).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à certains facteurs spécifiques, à la fois environnementaux et sociaux, qui auraient pu jouer un rôle dans la RAM en Guadeloupe.

### **II.1. Impact de la pandémie de Covid-19 sur la résistance aux antimicrobiens**

La pandémie de Covid-19 sévissait encore au début de ce projet, notamment sur la première campagne de prélèvement qui a eu lieu en 2021 durant laquelle le nombre de cas de Covid était encore élevé (taux d'incidence entre 721 et 1 056/100 000 habitants sur la période des prélèvements en Guadeloupe). La littérature avait notamment fait état, pendant cette période, d'un taux plus élevé de la résistance, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (Langford et al. 2023). Cette augmentation était notamment liée à la surconsommation d'antibiotiques pour éviter les surinfections (Lansbury et al. 2020; Sulayyim et al. 2022).

Les résultats ont montré un impact de la pandémie de Covid-19 principalement sur le résistome, et de manière moins marquée, sur le microbiome et l'exposome. Le dosage des molécules de l'exposome n'a pas montré d'augmentation de la concentration en antibiotiques et biocides dans les différentes matrices pendant la période de Covid-19. Pourtant l'utilisation des antibiotiques a été plus importante pendant la période en raison d'un traitement probabiliste de potentielles co-infections bactériennes. De même, le nettoyage des surfaces a été plus important (Sulayyim et al. 2022; Langford et al. 2023; ANSM 2020). Nous avons retrouvé des résidus d'AINS plus abondamment dans les échantillons de la première campagne, mais cela n'a pas été confirmé dans les trois autres. Ces molécules pharmaceutiques ont été décrites dans la littérature comme étant capables d'augmenter le transfert horizontal des GRA, notamment par transformation (Yue Wang et al. 2020).

Les ACP présentées dans la partie résultats de ce travail ont permis de montrer, dans chacun des sites étudiés, qu'aucune des campagnes n'était incluse dans le même cluster, suggérant un exposome qui varie au cours du temps suivant l'utilisation de ces composés mais n'indiquant pas si les variations en campagne 1 sont dues à la pandémie.

Les bactéries étaient donc exposées à un exposome différent lors de cette première campagne mais la composition du microbiome ne semble pas avoir été modifiée en entrée de la STEU pendant la pandémie. Des différences dans les proportions des genres les plus abondants du microbiome sont observées entre chacune des campagnes dans les eaux du CHUG et de la sortie de la STEU, indiquant que ces modifications ne sont pas liées à la pandémie. Les ACP ont confirmé ces observations, montrant généralement un regroupement des 4 campagnes, les microbiomes semblant être similaires entre chacune des saisons.

Globalement, l'abondance relative des gènes du résistome est plus élevée lors de la première campagne, particulièrement au niveau de l'hôpital, qu'elles que soient les familles de GRA, notamment des gènes de résistance de familles d'antibiotiques très consommés pendant cette période, tels que les bêta-lactamines et les macrolides (Junot et al. 2020). D'autres études ont noté également une plus forte abondance des gènes de résistance aux sulfamides et aux aminosides lors de cette pandémie de Covid-19 (Liang Zhao et al. 2023). Nous avons aussi montré une abondance relative plus élevée pour les gènes *ermB* et *sull*, codant respectivement pour la résistance aux macrolides et sulfamides. De même nous avons observé une augmentation pour les gènes *aac(6')-Ib*, *blaTEM*, *blaVIM*, *blaKPC* et *qnrS*. De plus grandes abondances en EGM ont également été mesurées lors de cette campagne indiquant une possibilité de transfert horizontal des gènes accrue à cette période augmentant ce phénomène de résistance.

Les ACP du résistome montrent une dissociation entre la première campagne et les autres campagnes confirmant un impact de cette période, suggérant que la pandémie a pu avoir une influence sur le résistome.

Cette pandémie reste, souhaitons-le, un événement exceptionnel qui s'est produit pendant une période donnée et ayant entraîné des conditions sanitaires et sociales exceptionnelles (confinement, vaccination, détection...). On peut s'interroger si les conséquences de cette pandémie ont entraîné une empreinte définitive dans les résistomes des différents organismes de chacune des matrices et si la résilience des systèmes va permettre un retour à l'état initial d'avant la pandémie. Au vu des résultats, l'effet semble s'atténuer au fil des campagnes mais il aurait fallu avoir ces mêmes données de résistance avant la pandémie afin de voir s'il s'agit bien d'un retour à la normale.

## **II.2. Des variations de la résistance sous l'effet de la saisonnalité**

La Guadeloupe est soumise à un climat tropical, chaud et humide favorisant le développement de bactéries mésophiles avec seulement deux saisons dont l'une est caractérisée par un climat humide et l'autre par un climat plus sec.

Les conclusions sur les effets de la saisonnalité sur la résistance sont contrastées dans la littérature. Certaines études ont montré des différences en termes d'abondance des GRA entre les saisons avec notamment une plus forte abondance en saison hivernale qui serait liée à une plus forte consommation d'antibiotiques à cette saison (Wang et al. 2021; Caucci et al. 2016). D'autres études n'ont, au contraire, pas vu d'effet saisonnier (Buelow et al. 2020).

Dans notre étude, les concentrations des molécules de l'exposome auxquelles étaient soumises les bactéries sont globalement plus élevées dans les échantillons de la saison humide et les ACP montraient des divergences entre les deux saisons pour les sites qui étaient les plus en amont des continuums indiquant un effet de la saison sur l'exposome qui s'atténue à la fin du continuum. Le traitement de la STEU permettrait donc de diminuer les effets de la saison en rétablissant un équilibre.

Même si elles sont soumises à un exposome différent, les abondances des genres bactériens étaient peu divergentes entre les deux saisons. Les ACP n'ont également pas montré de distinction, confirmant la présence d'un microbiome similaire entre la saison sèche et la saison humide. Une autre étude a montré que la saisonnalité n'expliquait pas significativement la diversité bêta, seulement 0.2% (Munk et al. 2022).

Dans ce travail, une nette distinction a été mise en évidence par les ACP sur les résistomes entre les échantillons de la saison sèche et ceux de la saison humide, différences déjà visibles au niveau de l'abondance relative totale mais seulement dans le continuum CHUG – STEU de Jarry. L'augmentation de l'abondance relative pourrait être liée à la présence d'un exposome plus important stimulant la sélection des GRA, la co- et la cross-sélection ou encore le transfert horizontal de gènes. En revanche, dans chacun des continuums, la signature du résistome était similaire.

Des différences entre les deux saisons étaient donc visibles en Guadeloupe durant la période de l'étude malgré le fait que les deux saisons n'étaient pas radicalement différentes en termes de températures mais également de précipitations. Des différences plus marquées entre les deux saisons aurait pu nous donner une vision plus claire de l'effet de la saisonnalité. C'est notamment le cas lors d'évènements extrêmes tels que des inondations ou des tempêtes (Burnham 2021). Mais en Guadeloupe, pendant la saison humide, de juin à novembre, s'étend une période où les risques d'ouragans et de cyclones sont particulièrement élevés. Ceux-ci sont généralement accompagnés de fortes pluies et des inondations qui ont été associées à la propagation de la RAM par la dissémination des eaux usées (Burnham 2021). En effet, ces grands volumes d'eau peuvent créer des phénomènes de dilution important des eaux usées, le débordement des bassins d'orage et des postes de relèvement, décrocher une partie du biofilm dans les réseaux d'eaux (Cauci et al. 2016). Si l'impact de fortes pluies sur la contamination de zones de baignade ont été mesurés en métropole lors d'évènements pluvieux importants par le suivi d'indicateurs comme *E. coli*, peu de connaissances ont été acquises sur les conséquences en matière de résistance des phénomènes climatiques extrêmes qui sont sources de dissémination de maladies hydriques.

Le changement climatique, en plus d'avoir des effets négatifs sur la santé humaine, comme la mortalité liée à la chaleur, les cancers liés à l'exposition aux UV, la prolifération de pollens et globalement la modification de l'environnement épidémiologique, pourrait également jouer un rôle sur la RAM. En effet, l'augmentation des températures en conséquence du changement climatique a été associée à une augmentation de la croissance bactérienne entraînant une augmentation du taux d'infections et une augmentation de la RAM mais également un phénomène de transfert horizontal de gènes plus important (Burnham 2021; Magnano San Lio et al. 2023). Cela a notamment été montré pour *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes dont la prévalence était augmentée lors des saisons chaudes (Kaba, Kuhlmann, and Scheithauer 2020). Il a aussi été montré que les concentrations en métaux lourds et en biocides ainsi que leur absorption par les bactéries dans l'eau et dans le sol étaient affectées par des climats plus chauds. Cette plus forte présence pourrait augmenter les phénomènes de co-résistance et donc impacter la RAM (Marques et al. 2010).

Il est donc important de prendre en compte ces métadonnées dans les études de la dynamique de la RAM puisqu'ils pourraient jouer un grand rôle dans la variation du résistome.

### **II.3. L'exposome et son risque pour l'environnement**

La Guadeloupe est une île déjà marquée par la pollution de ses eaux et de ses sols par des pesticides, plus particulièrement par le chlordécone utilisé en masse dans les bananeraies pendant plus de 20 ans et dont la présence a été largement étudiée (Ferdinand 2015; Comte et al. 2022; Dromard et al. 2022; Procaccia C. Rapport au sénat n°360, 2023). Mais d'autres composés tels que les métaux lourds et les composés pharmaceutiques sont aussi à l'origine de la contamination de l'environnement. C'est pourquoi dans cette étude divers composés ont été mesurés afin de caractériser l'exposome, défini ici comme l'ensemble de composés présents dans l'environnement auxquels sont exposées les bactéries et susceptibles de promouvoir la sélection des GRA (Singer et al. 2016). Plus particulièrement nous nous sommes intéressés aux résidus d'antibiotiques, d'AINS, de biocides et aux métaux lourds.

Les résultats ont montré qu'un grand nombre de molécules était détecté dans les effluents de l'hôpital, dans les STEU ainsi que dans les eaux de surface recevant les effluents des stations. Les molécules antibiotiques, d'AINS et de biocides ont été détectées dans les échantillons à des concentrations allant du ng/L au µg/L, concentrations globalement dans les mêmes ordres de grandeur que celles trouvées partout dans le monde, sauf exception (Patel et al. 2019; Santos et al. 2013; Li Zhao et al. 2024). Les métaux lourds ont été retrouvés à de plus fortes concentrations, de l'ordre du mg/L, également du même ordre de grandeur que celles retrouvées sur chacun des continents (Varela et al. 2014; Gao et al. 2015).

Mais les composés étaient présents à des concentrations variables selon les sites échantillonnés. Les effluents de l'hôpital contenaient les plus fortes concentrations d'antibiotiques, en raison de leur grande utilisation à l'hôpital. Dans ces effluents les concentrations de sulfaméthoxazole étaient les plus abondantes suivies des concentrations des résidus d'ofloxacin et de ciprofloxacine. Leur présence serait liée à leur consommation sur l'île qui était de 15,3 DDJ / 1 000 JH (Géodes 2022), et du fait de leur lente dégradation dans l'environnement (Liang Zhao et al. 2023). Ces deux fluoroquinolones font partie des molécules retrouvées avec les plus fortes concentrations, en particulier dans les eaux de sortie de STEU en France métropolitaine ([www.ecologie.gouv.fr](http://www.ecologie.gouv.fr)).

L'azithromycine est la molécule antibiotique la plus détectée dans les eaux de la STEU du Lamentin et du Gosier. Pendant la période de Covid-19, cet antibiotique a souvent été utilisé en association de l'hydroxychloroquine chez les patients, pouvant expliquer sa présence plus importante. L'érythromycine est également présente abondamment dans toutes les eaux de STEU. Ces antibiotiques de la famille des macrolides sont aussi beaucoup utilisés en médecine humaine en général (ANSES 2020). Ces deux antibiotiques, azithromycine et érythromycine, font partie des antibiotiques les plus persistants tout comme le sulfaméthoxazole, la ciprofloxacine et l'ofloxacin. Les résidus de bêta-lactamines, bien que très utilisés, ne sont pas retrouvés, du fait de leur forte dégradabilité ([www.ecologie.gouv.fr](http://www.ecologie.gouv.fr)). Toutes ces molécules retrouvées abondamment font partie des indicateurs de contamination de l'environnement qui ont été proposés par l'ANSES (ANSES 2020).

Les biocides étaient plus abondamment détectés dans les échantillons de l'entrée des STEU étudiées. Le flubendazole était le biocide le plus abondant dans la grande majorité des échantillons, y compris dans les eaux usées de l'hôpital. C'est un antiparasitaire utilisé dans les cas d'infections par des vers parasites du tube digestif et beaucoup donné dans le service de

gastro-entérologie du CHUG en association avec l'albendazole et l'ivermectine (Vilain 2015). Il est également utilisé en médecine vétérinaire et en aquaculture d'où sa détection dans les eaux (Puckowski et al. 2017).

Si l'on considère une forme de signature des effluents (Buelow et al. 2020), les métaux lourds sont plus particulièrement présents dans les échantillons de l'entrée des STEU du Gosier et du Lamentin, avec particulièrement le Zn et Cu dont les concentrations sont les plus élevées. Ces métaux sont reconnus comme étant des agents de co-sélection associés à la résistance aux antibiotiques (Seiler et Berendonk 2012). Il a souvent été montré que la concentration de Zn était positivement corrélée avec la présence du gène *sull* (Chen et al. 2019; Hubeny et al. 2021). De plus, l'élément Zn est un facteur de la sélection de gènes de résistance à la tétracycline, notamment le gène *tetA* (Palm et al. 2008).

Tous ces composés en fonction de leur concentration pourraient avoir un effet délétère sur la survie des bactéries ou exercer une pression de sélection sur les GRA (Singer et al. 2016).

La surveillance de ces composés dans l'environnement permet d'avoir une idée de sa contamination et de discriminer des zones de fortes contaminations, révélatrices d'une anthropisation importante au sein desquelles des mécanismes de transferts horizontaux de gènes pourraient se dérouler. Les travaux de modélisation de l'exposome sur la dynamique de résistance ont montré des liens entre mercure et vancomycine (Henriot P. en cours de publication). Il est donc important d'évaluer la qualité de l'environnement au travers de la mesure de certains composés pour anticiper la dynamique de la contamination et de la dissémination.

Globalement les concentrations des composés de l'exposome mesurés étaient plus élevées dans la partie amont des différents continuums que dans la partie aval, avec des concentrations plus faibles en sortie de la STEU et encore plus faibles dans les environnement récepteurs (océan/mangrove), à l'exception de certaines campagnes de prélèvements notamment pour les métaux lourds. L'exposome dans l'environnement dépend donc notamment de la capacité des STEU à éliminer ces résidus. Les stations jouent donc un rôle crucial dans la prévention de la contamination de l'environnement. Mais comme dit précédemment, deux des trois stations sélectionnées pour cette étude étaient considérées comme non-conformes. Ce dysfonctionnement des stations peut conduire à l'introduction de contaminants dans les eaux réceptrices, comme il l'a été montré dans cette étude, où les composés de l'exposome étaient encore détectés dans les eaux à la sortie de l'émissaire dans l'océan à des concentrations pouvant affecter les communautés microbiennes. Plus globalement, les STEU actuelles ne semblent pas être efficaces pour éliminer différents composés qui se trouvent dans l'eau, montrant la nécessité de développer de nouvelles méthodes afin d'améliorer les traitements actuels (Omufere, Maseko, and Olowoyo 2022). Des traitements de type ozonation et charbon actif pourraient notamment être ajoutés au procédé actuel (Lecomte et al. 2023).

Actuellement, les STEU conventionnelles éliminent entre 10 et 60 % des résidus pharmaceutiques (Husain Khan et al. 2023). En outre, les molécules ne sont pas toutes éliminées avec la même efficacité. Les résultats de cette étude ont montré que seule la pyriméthamine et le sulfoxaflor étaient éliminés à 100% tandis que les métaux lourds étaient les composés les moins bien éliminés avec une efficacité ne dépassant pas les 50%. Ce sont notamment les éléments As, Pb et Cr qui sont les moins bien éliminés. Le Pb et le Cr sont souvent décrits comme étant les plus persistants et capables de s'accumuler dans l'environnement (Biswas et al. 2021). L'élimination des autres composés était variable. Tous ces résidus non éliminés par la STEU vont donc ensuite se retrouver dans les environnements récepteurs. Les principales sources d'antibiotiques dans les eaux de surface sont généralement les rejets d'effluents des stations d'épuration. La détection d'antibiotiques dans les eaux de surface peut également être



facilitée par le ruissellement agricole, le lisier et les boues utilisés comme engrais et fertilisants (Omufere, Maseko, and Olowoyo 2022).

La présence des résidus antibiotiques, à des concentrations sub-inhibitrices pourrait entraîner la sélection de résistance aux antibiotiques. De plus, la présence des résidus non-antibiotiques, biocides et métaux lourds pourraient permettre la mise en place de phénomène de co- ou cross-sélection ou encore le transfert de gènes par transfert horizontal (Singer et al. 2016). Ces résidus pourraient également se sorber aux boues et se retrouver dans le sol suite à l'épandage de ces boues, bien que ce phénomène ne semble pas prépondérant (Dagot 2018).

Afin de connaître le potentiel de sélection de la résistance des composés pharmaceutiques et biocides étudiés ici, leur concentration a été comparée aux concentrations prédites sans effet (PNEC) déjà déterminées dans la littérature (Bengtsson-Palme et al. 2016). Certaines des molécules antibiotiques avaient des concentrations supérieures aux PNEC de sélection de la résistance mais cela n'était vrai que dans les eaux usées de l'hôpital. C'était le cas de la ciprofloxacine et du triméthoprime, les concentrations d'ofloxacine étaient à la limite de sa PNEC correspondante. Ces molécules, aux concentrations auxquelles elles sont détectées, pourraient donc entraîner un risque de sélection de la résistance dans les eaux.

Les concentrations des métaux lourds ont été comparées aux concentrations co-sélectives minimales (CCM) qui ont été définies dans la littérature (Seiler and Berendonk 2012). Seule la CCM a été décrite pour la concentration totale du Cd et aucune des concentrations mesurées dans cette étude n'était supérieure à cette CCM. Le Cd à ces concentrations ne semblait donc pas sélectionner la résistance.

Cependant les PNEC et les CCM n'ont pas été déterminées pour un grand nombre de molécules pharmaceutiques, biocides et métaux lourds. Ces mesures permettraient d'apporter des informations supplémentaires concernant l'effet de ces composés sur la résistance.

En plus de représenter un risque pour la sélection de la résistance, l'ofloxacine faisait partie également des molécules qui représentent un risque pour l'environnement, mais cette fois-ci pas uniquement au niveau des eaux usées de l'hôpital. En effet, le quotient de risque (RQ) calculé montrait un risque élevé également en entrée et en sortie de la STEU. Outre cet antibiotique, certains biocides représenteraient aussi un risque élevé pour l'environnement, c'est le cas de l'albendazole, du flubendazole et du thiabendazole.

Outre les bactéries, les animaux vivant au contact de ces eaux pourraient également être impactés par la présence de cet exposome. Certaines études montrent notamment des effets sur les amphibiens, avec une baisse de leur survie et de leur masse ainsi qu'une augmentation des anomalies telles que la malformation des membres, une immunosuppression ou encore une sensibilité augmentée aux infections (Egea-Serrano et al. 2012; Linzey et al. 2003). Dans notre étude, les crapauds vivent en dessous du dégrilleur de la STEU, ils étaient donc au contact direct des eaux de la station où un exposome important a été retrouvé. Par conséquent, ils représentent une population à risque suite à leur exposition aux composés de l'exposome.

Mais les résidus détectés contribuent différemment à la variance du résistome. En effet, l'analyse de partitionnement de la variation sur la globalité des échantillons (à l'exception des avions et des animaux pour lesquels nous n'avons pas de données d'exposome) a montré que les métaux lourds étaient les plus grands contributeurs à la variance du résistome, tandis que la contribution des antibiotiques et des biocides était nulle. Mais le fait de combiner les composés pharmaceutiques, biocides et les métaux lourds aurait un plus grand impact sur le résistome que les résidus pharmaceutiques et biocides seuls. C'est souvent le cas dans l'environnement où plusieurs composés se retrouvent ensemble dans une même matrice.

Des corrélations positives ont également été trouvées entre une sélection de gènes d'intérêt et les antibiotiques auxquels ils confèrent des résistances. Il s'agissait des corrélations entre le gène *ermB* et l'érythromycine et l'azithromycine, entre le gène *sulI* et le sulfaméthoxazole et entre le gène *qnrS* et la ciprofloxacine et l'ofloxacine. De telles corrélations ont également été retrouvées dans la littérature (Rodriguez-Mozaz et al. 2015). L'augmentation de la concentration des antibiotiques pour lesquelles des corrélations positives sont mises en évidence, suggère une augmentation de l'abondance des gènes de résistance correspondant, indiquant le risque de la présence de ces résidus dans l'environnement. Mais d'autres études sont nécessaires concernant la pression de sélection induite par la présence des antibiotiques dans l'environnement pour mieux comprendre la relation entre la présence de ces résidus et la présence des GRA.

De plus, beaucoup d'autres molécules peuvent également jouer un rôle sur la résistance, il faudrait donc pouvoir en cibler d'autres. Par exemple, un des composés auquel s'intéresser pourrait être le chlordécone du fait de sa forte présence en Guadeloupe notamment dans les eaux et dans les sols.

#### **II.4. Le tourisme comme facteur de dissémination de la RAM**

Le tourisme a été identifié comme l'un des facteurs de la dissémination de la RAM. La Guadeloupe étant une île, les seuls moyens d'y accéder sont donc par les voies maritimes et majoritairement par les voies aériennes. C'est pourquoi dans cette étude nous nous sommes intéressés aux avions et notamment au contenu de leurs toilettes.

La durée du vol entre Paris et la Guadeloupe est de plus de 8h, ce qui laisse aux passagers plusieurs opportunités d'aller aux toilettes. Il a été estimé que sur des vols long-courriers, d'une durée de plus de 6h, la probabilité pour les passagers d'aller aux toilettes était de 36% représentant donc une partie seulement des voyageurs. Étudier les toilettes d'avions seuls ne permet donc pas d'avoir une vision complète de ce qui était apporté par le tourisme, c'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à leurs points d'arrivée en Guadeloupe. Les passagers, pour une majorité, vont séjourner dans des hôtels de la région. En effet, un récent sondage avait montré que 24% des touristes séjourneraient dans des locations de particuliers tandis que les autres seraient principalement localisés dans les hôtels. La grande majorité de l'offre hôtelière en Guadeloupe est localisée dans la ville du Gosier qui est considéré comme la première ville hôtelière et l'une des stations balnéaires la plus importante en Guadeloupe. Le taux d'occupation de ces hôtels sur la période de l'étude était aux environs de 57% ([www.guadeloupe.fr](http://www.guadeloupe.fr)).

Afin de déterminer le rôle du tourisme une comparaison a été établie avec la ville du Lamentin, beaucoup moins touristique, étant une terre plutôt agricole.

Les échantillons de la STEU du Lamentin et du Gosier présentaient une signature du microbiome différente de celle des avions. Le microbiome des avions était lui principalement composé de bactéries anaérobies correspondant majoritairement aux bactéries du microbiote intestinal humain. La majorité de bactéries anaérobies peut également s'expliquer par le peu d'oxygène présent dans les réservoirs collectant le contenu des toilettes des avions. Des bactéries intestinales humaines étaient également retrouvées dans les eaux de la STEU recueillant les eaux usées des hôtels. Ce sont les mêmes que celles détectées dans les avions, comprenant les genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Faecalibacterium*. Les eaux de la STEU du Gosier représentent donc un mélange de bactéries ayant pour origine la population locale mais aussi la population de touristes.

Les données de résistome ont montré des signatures différentes entre les matrices « avions » et les autres sites. Une forte prévalence de gènes de résistance aux tétracyclines constituait le résistome mesuré dans les échantillons du contenu des toilettes d'avions. La forte prévalence de ces gènes de résistance peut être due à la capacité de transfert de ces gènes (Shin et al. 2015). Une étude de Petersen et al. avait également montré que dans tous les avions, de plusieurs régions du monde, les gènes de résistance aux tétracyclines, macrolides et bêta-lactamines étaient toujours les plus abondants, ce qui est en accord avec les résultats de notre étude (Petersen et al. 2015). Une des sources de ces gènes de résistance à la tétracycline pourrait être *Atopostipes*, le genre le plus abondant dans les effluents des toilettes des avions. En effet, il a été retrouvé dans du fumier portant des gènes de résistance aux tétracyclines et notamment le gène *tetM* qui était dans cette étude le plus abondant (Begmatov et al. 2022).

Le contenu des toilettes d'avions contenait aussi une plus faible proportion d'EGM que les autres sites, représentant en moyenne 18% du résistome. C'est au niveau du poste de refoulement recevant les eaux usées des hôtels et également dans les deux STEU que les proportions d'EGM étaient plus élevées (25%, 26% et 32% respectivement) et donc où les transferts de gènes sont plus susceptibles de se faire.

L'analyse de réseau de gènes a montré que la plupart des gènes d'intérêt étaient partagés entre chacun des compartiments sélectionnés à l'exception des gènes d'intérêt clinique de résistance aux bêta-lactamines *blaKPC*, *blaNDM* et du gène de résistance à la colistine *mcr-1*, ces gènes sont absents des échantillons des toilettes d'avions indiquant qu'ils ne seraient pas apportés par les passagers des avions. Les avions venaient de France Métropolitaine et parmi les touristes arrivant en Guadeloupe, en moyenne, plus de 63% des passagers des avions sont originaires de France métropolitaine (IDEOM 2023). Ces gènes sont peu prévalents en France métropolitaine. Pour signifier l'impact du transport aérien dans l'apport de GRA, il serait intéressant d'analyser des avions provenant de pays avec de fortes prévalence de GRA d'intérêt cliniques et peu prévalents en Guadeloupe.

De plus, certains gènes ont pu être éliminés par l'efficacité des désinfectants utilisés dans les avions. Cependant, les gènes de résistance aux tétracyclines semblent être particulièrement résistants dans des environnements, même dans des conditions difficiles, ce qui peut expliquer la forte proportion de ces gènes dans les échantillons prélevés dans les toilettes d'avions (Yoo and Lee 2021). Le désinfectant utilisé dans les avions peut également agir comme un facteur de co-sélection ou de sélection croisée augmentant le phénomène de RAM, comme cela a été démontré avec une incidence plus élevée d'intégrons porteurs de GRA à la suite d'une exposition à des QAC (Gaze et al. 2005).

Le tourisme ne semble donc pas apporter de grands changements en Guadeloupe en termes de GRA et de BRA. Les avions représentent ici une vision instantanée de la résistance apportée par les passagers tandis que le poste de refoulement, recevant les eaux usées des hôtels, fournit une information plus permanente sur la résistance apportée par les passagers des avions – notamment les touristes séjournant dans les hôtels- et rejeté dans la STEU. La STEU du Lamentin, ville faiblement touristique, est une représentation du résistome de la population locale.

### **III. La complexité de l'approche One-Health dans l'étude de la RAM**

La majorité des études axées sur de multiples réservoirs microbiens ciblent généralement qu'un seul aspect du concept One-Health, en ciblant par exemple l'interaction Homme-animal (Duarte et al. 2021), Homme-environnement (Bai et al. 2019) ou encore animal-environnement (Qian

et al. 2021). Au contraire, dans cette étude, nous avons pris chacun des compartiments afin de tenter de comprendre la diffusion de la résistance entre ceux-ci. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux échantillons d'eaux usées de l'hôpital, les échantillons d'eau de l'entrée de la STEU de Jarry, les rejets à la sortie de l'émissaire dans l'océan récepteur des eaux de la station et les animaux dans ou au voisinage des stations de traitement.

L'hypothèse selon laquelle la faune sauvage pourrait jouer un rôle important dans la dissémination de la RAM est de plus en plus répandue, mais les données restent rares (Vittecoq et al. 2016). En effet, des résistances ont été détectées chez les mammifères, les reptiles, les oiseaux ou encore les poissons présents à l'état sauvage, avec des variations selon l'espèce et selon l'habitat (Arnold, Williams, and Bennett 2016). Les petits mammifères interagissent souvent avec des sources de déchets humains et agricoles et sont donc potentiellement exposés à des sources anthropiques de RAM dans l'environnement. La proximité de l'environnement aquatique a été montrée comme associée à de plus hauts taux de résistance dans la flore intestinale des petits mammifères mais d'autres facteurs que les effets des effluents peuvent potentiellement contribuer à cette résistance (Vittecoq et al. 2016). Mais les études montrent seulement la présence d'un résistome chez ces animaux mais peu d'informations supplémentaires sont disponibles.

Dans cette étude, les animaux ont été prélevés dans un premier temps à l'intérieur de la STEU, dont certains de ces animaux vont pouvoir être au contact des eaux usées de la station. Les autres animaux ont été prélevés à l'extérieur et ne sont donc pas au contact des eaux usées, et sont utilisés comme témoins.

L'ACP des microbiomes a permis de montrer une séparation du microbiome des animaux, quel que soit leur habitat, des rejets de l'émissaire dans l'océan de celui de l'hôpital et de l'entrée de la STEU, suggérant bien qu'il n'y a pas de partage du microbiome entre ces échantillons.

Le résistome des échantillons animaux est différent de celui des échantillons d'eau étudiés mais il est également différent entre chaque animal. Le résistome des cafards est composé en majorité de gènes de résistance aux macrolides, chez les anolis ce sont les pompes à efflux qui sont majoritaires, chez les crapauds les gènes de résistance aux quinolones et enfin chez les vaches les gènes de résistance aux tétracyclines. Ces gènes de résistance aux tétracyclines ont déjà été montré comme abondant chez les bovins en raison de leur forte utilisation (Doster et al. 2022; Pinnell et al. 2023; Vikram et al. 2017). Des variations entre individus d'une même espèce animale étaient aussi observées. Cette variabilité avait déjà été observée dans une précédente étude portant sur des raton-laveurs vivants dans des zones avec un fort impact anthropique (Worsley-Tonks et al. 2021).

Chacun présente donc un résistome spécifique. Les différences de résistome observées entre les animaux sont probablement dues aux différentes écologies des espèces. En effet, la composition du résistome d'une espèce animale peut être influencée par son habitat. Les animaux sauvages vivant à proximité de zones impactées par l'Homme sont plus susceptibles d'être porteurs de BRA d'origine humaine que les animaux sauvages prélevés à des distances plus éloignées (Worsley-Tonks et al. 2021). Les animaux sauvages vivant proche des STEU encourraient donc un risque plus important de contamination par les BRA et les GRA. Certains animaux sauvages pourraient donc être utilisés comme sentinelles pour évaluer la dissémination de la RAM dans l'environnement (Worsley-Tonks et al. 2021). Mais au-delà de l'habitat de ces animaux, la façon dont ils utilisent les ressources présentes, en particulier leurs sources de nourriture et ce qu'ils boivent ainsi que leur façon d'occuper et de se déplacer à l'intérieur et à l'extérieur de leur habitat influencent le risque de contamination. La littérature semble montrer que les espèces animales ayant un régime alimentaire carnivore et omnivore seraient plus exposés au risque de contamination par les BRA et les GRA (Vittecoq et al. 2016). Dans notre cas, les

crapauds sont insectivores tout comme les anolis tandis que les cafards sont omnivores et les vaches herbivores, ces différences pourraient donc jouer sur leur résistome.

Les résultats des analyses par ACP sur le résistome ne montrent pas de distinction entre les animaux, qu'ils vivent dans ou en dehors de la STEU, mais également entre ces deux types d'animaux et les eaux collectées au niveau de l'émissaire dans l'océan. Au contraire, les échantillons d'eaux de l'hôpital et de la STEU ne se regroupent pas avec les animaux dans l'ACP. Malgré une différence dans la composition de leur résistome, les animaux sont plus proches entre eux qu'ils ne le sont des eaux de l'hôpital et de la station, n'indiquant pas une forte influence du résistome de ces eaux sur le résistome des animaux.

La majorité des gènes considérés comme d'intérêt sont partagés entre les sites et les animaux étudiés. Le gène de résistance aux aminosides *aac(6')-Ib* est particulièrement intéressant. Il n'était pas présent chez les animaux prélevés en dehors de la station mais il l'était chez les animaux vivant dans la station et également dans les échantillons d'eaux de l'hôpital, de l'entrée de la STEU et de la sortie de l'émissaire dans l'océan. Il confère la résistance à la tobramycine, la kanamycine et l'amikacine (Kim et al. 2011). Ce gène est considéré d'importance clinique et est présent chez une grande diversité de pathogènes à Gram négatif. Il est souvent retrouvé dans des intégrons, transposons, plasmides ou encore des îlots génomiques ce qui contribue à sa dissémination. C'est également l'un des gènes de résistance aux aminosides les plus commun chez les pathogènes à Gram négatif (Ramirez, Nikolaidis, and Tolmasky 2013). Étant donné son origine majoritairement clinique, la présence de ce gène chez les animaux pourraient provenir d'une contamination par les eaux de la station puisqu'une partie provient de l'hôpital.

Une transmission pourrait donc avoir lieu entre les trois compartiments. Mais, le fait de retrouver des pathogènes ou des GRA communs entre deux compartiments ne permet pas de dire comment et dans quelle direction les échanges se sont faits. Il est donc complexe de déterminer les voies de transmission. Il est également difficile de déterminer si ce portage est durable, en particulier en l'absence de pression de sélection. Il serait intéressant de déterminer la durée de ce type de portage au sein des animaux s'ils ne sont plus au contact des sources de pollution, car il est possible qu'une résilience de leur microbiote se produise. Ceci montre la complexité d'utiliser l'approche One-Health dans l'étude de la RAM.

L'identification d'espèces animales sentinelles et de gènes indicateurs pourraient être intéressant pour la surveillance de la contamination des écosystèmes. De plus, l'eau jouant un rôle majeur dans les échanges de BRA et de GRA, un moyen de contrôler la dissémination de la RAM serait donc de limiter la contamination de l'environnement aquatique. Il faudrait également pouvoir prendre en compte toutes les sources anthropiques pouvant avoir une influence sur le profil de résistance de ces animaux.

Plus globalement, la Guadeloupe est un modèle d'étude idéale grâce auquel nous avons accès à des informations qu'il n'aurait pas été possible d'avoir dans un pays non insulaire comme la France métropolitaine. En effet, elle nous permet notamment, grâce au fait que le moyen majoritaire d'entrer sur cette île est par les transports aériens, de savoir quels sont les apports en termes de bactéries résistantes et de gènes de résistance. Mais c'est également un lieu atypique, soumis à des conditions particulières, notamment avec un climat comportant seulement deux saisons contrairement à la France métropolitaine qui en compte quatre. C'est également un lieu où des phénomènes climatiques extrêmes se produisent plus fréquemment que dans certains pays pouvant influencer plus fortement la résistance.

## Conclusion

---

La lutte contre la résistance aux antimicrobiens représente un des plus grands enjeux de santé publique au niveau mondial. Les bactéries résistantes, accompagnées de leurs gènes de résistance, peuvent se transmettre à travers divers compartiments, qu'ils soient humains, animaux ou environnementaux. Cette constatation montre la nécessité de mettre en place des études One-Health permettant d'appréhender la résistance en prenant en compte ces trois écosystèmes qui sont interdépendants. Mais, en général, la recherche est motivée par des préoccupations de santé humaine associées aux bactéries ou aux mécanismes de résistance ciblés omettant de s'intéresser aux bactéries environnementales qui sont un large réservoir de gènes de résistance.

Les résultats de ce travail de thèse ont permis par une approche One-Health, dans un premier temps, face au manque de connaissance de la résistance en Guadeloupe, de caractériser cette île des Caraïbes en termes d'exposome, de microbiome et de résistome. L'analyse de ces caractéristiques a aussi permis, dans un second temps, de renforcer la relation étroite entre la résistance aux antibiotiques clinique, environnementale et animale et enfin de montrer l'importance de prendre en compte les facteurs environnementaux et sociaux (par exemple l'exposome, la saisonnalité ou le tourisme) dans l'élaboration de stratégies pour contrôler la RAM.

À travers la surveillance des eaux usées nous avons montré l'impact de l'Homme sur la composition du microbiome et du résistome des effluents urbains et hospitaliers et la potentielle contamination des animaux par les eaux des stations de traitement des eaux usées. Les différents réservoirs de la RAM s'influencent donc mutuellement, le résistome et le microbiome des Hommes et des animaux ont notamment un rôle potentiel dans la RAM. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre les interactions et le rôle de chacun des compartiments contribuant à la dissémination de la RAM.

Mais la majorité des études One-Health sont encore confrontées à un problème important : attribuer la direction de la transmission des GRA entre les différents compartiments. Des approches combinant l'analyse des données génomiques/métagénomiques, y compris l'analyse phylogénétique, avec notamment des approches épidémiologiques sont nécessaires pour reconstituer avec précision les schémas de transmission, en particulier la direction de la transmission de la résistance. C'est pourquoi une partie de ce projet, menée par nos collaborateurs de Guadeloupe et d'Allemagne, est aussi consacré à l'analyse des *E. coli* producteurs de BLSE afin d'obtenir des informations sur la diversité des plasmides présents chez ces bactéries. Ces plasmides nous permettent de retracer leur dissémination ainsi que la dissémination des gènes de BLSE portés par ces plasmides à travers les différents compartiments One-Health.

Cette étude a également montré l'importance des stations de traitement des eaux usées dans la réduction de la contamination environnementale et donc de les maintenir en état de conformité. Il est également important d'avoir de bons indicateurs pour permettre le suivi de la résistance, parmi tous les indicateurs déjà existant, le gène *aac(6')-Ib* serait le plus discriminant nous ayant permis de montrer une potentielle transmission de la résistance entre les compartiments humains, animaux et environnementaux.

Il faudrait aussi pouvoir relier les gènes de résistance aux bactéries qui les portent, pour cela la méthode de Epic-PCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR) pourrait être

adaptée. Le principe de cette méthode est de fusionner une séquence d'intérêt avec un fragment du gène de l'ARNr 16S, d'amplifier puis de séquencer les amplicons qui en résultent afin d'assigner des bactéries porteuses de la séquence d'intérêt (Roman et al. 2021).

La dissémination de la RAM est un processus complexe, résultant de l'interaction de nombreuses variables. En effet, divers facteurs impactant la résistance aux antibiotiques ont été identifiés au fil des années. Parmi ces facteurs nous avons montré, au niveau social, que le tourisme n'apportait pas de changements majeurs dans la résistance sur l'île de la Guadeloupe mais c'est à nuancer avec le fait que les passagers proviennent principalement de France métropolitaine où les niveaux de résistance sont similaires avec l'île de la Guadeloupe. De plus, ce travail a aussi montré l'importance de la prise en compte des facteurs environnementaux dans l'interprétation des données de la RAM. Parmi eux, la pandémie de Covid-19 et la saisonnalité semblaient avoir un impact particulièrement sur le résistome et sur l'exposome tandis que le microbiome était peu perturbé.

Autre facteur environnemental, l'exposome, à travers sa grande diversité et ses concentrations représente un risque pour la sélection de la résistance mais aussi pour l'environnement lorsque les composés sont rejetés dans l'environnement, surtout s'ils sont mal éliminés par les stations de traitement des eaux usées. Ceci montre encore une fois le rôle des stations dans la limitation de la résistance et de l'importance de leur conformité.

Beaucoup de facteurs entrent donc en jeu dans la dynamique de la résistance aux antibiotiques rendant complexe mais motivante l'interprétation des données. L'utilisation des traitements avancés des données et la modélisation devraient être des outils permettant d'avoir une approche systémique de la dissémination tout en évaluant les variables d'importance pour prédire la dynamique de cette résistance.

Dans cette étude les données seront utilisées par nos collaborateurs de l'Institut Pasteur pour développer un modèle mathématique afin de représenter les moyens de sélection de la résistance et les voies de transmission entre différents compartiments. L'ambition est qu'il permette de mettre en place des protocoles de surveillance et de contrôle de la dissémination de la RAM en explorant dans quelles conditions la sélection des BRA et des GRA est minimisée dans les réservoirs et dans quels cas la diffusion entre les réservoirs est elle aussi diminuée.

La résistance aux antibiotiques étant un enjeu mondial il est nécessaire de réaliser des études similaires dans d'autres régions du monde possédant notamment des caractéristiques climatiques différentes de celles de la Guadeloupe mais aussi des prévalences de GRA différentes. Cela permettrait une meilleure vision de la dynamique de la RAM à l'échelle mondiale.

## Références bibliographiques

---

Achermann, R., K. Suter, A. Kronenberg, P. Gyger, K. Mühlemann, W. Zimmerli, and H. C. Bucher. 2011. 'Antibiotic Use in Adult Outpatients in Switzerland in Relation to Regions, Seasonality and Point of Care Tests'. *Clinical Microbiology and Infection* 17 (6): 855–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03348.x>.

Adkin, Pat, Andrew Hitchcock, Laura J. Smith, and Susannah E. Walsh. 2022. 'Priming with Biocides: A Pathway to Antibiotic Resistance?' *Journal of Applied Microbiology* 133 (2): 830–41. <https://doi.org/10.1111/jam.15564>.

Agence de développement territorial du cœur du Hainaut. Available from: <https://www.idea.be/fr/cycle-eau/assainissement-des-eaux-usees/comment-fonctionne-une-station-d-e-puration.html>. [Accessed Oct 22, 2023]

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. 2023. La consommation des antibiotiques en France de 2000 à 2020. Available from: <https://ansm.sante.fr/actualites/lansm-publie-un-rapport-sur-la-consommation-des-antibiotiques-entre-2000-et-2020>. [Accessed Dec 12, 2023]

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. 2020. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens et COVID-19. <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/02/16/20200710-covid-ains-expertise-pharmacovigilance.pdf>. [Accessed Feb 15, 2024]

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2020. Antibiorésistance et environnement. État et causes possibles de la contamination des milieux en France. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf>. [Accessed Feb 15, 2024]

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2022. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2021. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2021.pdf>. [Accessed Feb 15, 2024]

Ahmed, Warish, Nicola Angel, Janette Edson, Kyle Bibby, Aaron Bivins, Jake W. O'Brien, Phil M. Choi, et al. 2020. 'First Confirmed Detection of SARS-CoV-2 in Untreated Wastewater in Australia: A Proof of Concept for the Wastewater Surveillance of COVID-19 in the Community'. *The Science of the Total Environment* 728 (August): 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.

Alauzet, Corentine, Hélène Marchandin, Pascal Courtin, Francine Mory, Ludovic Lemée, Jean-Louis Pons, Marie-Pierre Chapot-Chartier, Alain Lozniewski, and Estelle Jumas-Bilak. 2014. 'Multilocus Analysis Reveals Diversity in the Genus *Tissierella*: Description of *Tissierella Carlieri* Sp. Nov. in the New Class *Tissierellia* Classis Nov.' *Systematic and Applied Microbiology* 37 (1): 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.09.007>.

Al-Tarawneh, Ibrahim, Mohammed El-Dosoky, Mahmoud Alawi, Mufeed Batarseh, Arum Widyasari, Robert Kreuzig, and Müfit Bahadır. 2015. 'Studies on Human Pharmaceuticals in Jordanian Wastewater Samples'. *CLEAN – Soil, Air, Water* 43 (4): 504–11. <https://doi.org/10.1002/clen.201300920>.



- Amador, Paula P., Ruben M. Fernandes, Maria C. Prudêncio, Mário P. Barreto, and Isabel M. Duarte. 2015. 'Antibiotic Resistance in Wastewater: Occurrence and Fate of Enterobacteriaceae Producers of Class A and Class C  $\beta$ -Lactamases'. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 50 (1): 26–39. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.964602>.
- Ambler, R. P. 1980. 'The Structure of Beta-Lactamases'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 289 (1036): 321–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>.
- Antunes, Patrícia, Carla Novais, and Luísa Peixe. 2020. 'Food-to-Humans Bacterial Transmission'. *Microbiology Spectrum* 8 (1): 10.1128/microbiolspec.mtbp-0019–2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0019-2016>.
- Apreja, Mansi, Aarjoo Sharma, Sanjeev Balda, Kirti Kataria, Neena Capalash, and Prince Sharma. 2022. 'Antibiotic Residues in Environment: Antimicrobial Resistance Development, Ecological Risks, and Bioremediation'. *Environmental Science and Pollution Research* 29 (3): 3355–71. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17374-w>.
- Aristizabal-Ciro, Carolina, Ana María Botero-Coy, Francisco J. López, and Gustavo A. Peñuela. 2017. 'Monitoring Pharmaceuticals and Personal Care Products in Reservoir Water Used for Drinking Water Supply'. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (8): 7335–47. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8253-1>.
- Armand-Lefèvre, L., A. Andremont, and E. Ruppé. 2018. 'Travel and Acquisition of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae'. *Médecine et Maladies Infectieuses* 48 (7): 431–41. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.02.005>.
- Arnold, Kathryn E., Nicola J. Williams, and Malcolm Bennett. 2016. "Disperse Abroad in the Land": The Role of Wildlife in the Dissemination of Antimicrobial Resistance'. *Biology Letters* 12 (8): 20160137. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0137>.
- Aslam, Bilal, Mohsin Khurshid, Muhammad Imran Arshad, Saima Muzammil, Maria Rasool, Nafeesa Yasmeen, Taif Shah, et al. 2021. 'Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (November): 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>.
- Authority, European Food Safety and European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. 'The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2014'. *EFSA Journal* 14 (2): 4380. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4380>.
- Azuma, Takashi, Hirotaka Ishiuchi, Tomomi Inoyama, Yusuke Teranishi, Misato Yamaoka, Takaji Sato, and Yoshiki Mino. 2015. 'Occurrence and Fate of Selected Anticancer, Antimicrobial, and Psychotropic Pharmaceuticals in an Urban River in a Subcatchment of the Yodo River Basin, Japan'. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (23): 18676–86. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5013-6>.
- Bai, Ying, Xiaohong Ruan, Xianchuan Xie, and Zhongyue Yan. 2019. 'Antibiotic Résistome Profile Based on Metagenomics in Raw Surface Drinking Water Source and the Influence of Environmental Factor: A Case Study in Huaihe River Basin, China'. *Environmental Pollution* 248 (May): 438–47. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.057>.

Baker-Austin, Craig, Meredith S. Wright, Ramunas Stepanauskas, and J. V. McArthur. 2006. 'Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance'. *Trends in Microbiology* 14 (4): 176–82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>.

Ball, P. R., S. W. Shales, and I. Chopra. 1980. 'Plasmid-Mediated Tetracycline Resistance in Escherichia Coli Involves Increased Efflux of the Antibiotic'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93 (1): 74–81. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(80\)80247-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(80)80247-6).

Barraud, Olivier, and Marie-Cécile Ploy. 2015. 'Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure'. *Journal of Bacteriology* 197 (13): 2171–78. <https://doi.org/10.1128/jb.02455-14>.

Bastian, Mathieu, Sebastien Heymann, and Mathieu Jacomy. 2009. 'Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks'. *Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media* 3 (1): 361–62. <https://doi.org/10.1609/icwsm.v3i1.13937>.

Bayen, Stéphane, Elvagrís Segovia Estrada, Guillaume Juhel, Lee Wei Kit, and Barry C. Kelly. 2016. 'Pharmaceutically Active Compounds and Endocrine Disrupting Chemicals in Water, Sediments and Mollusks in Mangrove Ecosystems from Singapore'. *Marine Pollution Bulletin*, Turning the tide on mangrove loss, 109 (2): 716–22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.105>.

Beceiro, Alejandro, María Tomás, and Germán Bou. 2013. 'Antimicrobial Resistance and Virulence: A Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?' *Clinical Microbiology Reviews* 26 (2): 185–230. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>.

Begmatov, Shahjahan, Alexey V. Beletsky, Eugeny V. Gruzdev, Andrey V. Mardanov, Lubov B. Glukhova, Olga V. Karnachuk, and Nikolai V. Ravin. 2022. 'Distribution Patterns of Antibiotic Resistance Genes and Their Bacterial Hosts in a Manure Lagoon of a Large-Scale Swine Finishing Facility'. *Microorganisms* 10 (11): 2301. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112301>.

Bellanger, Xavier, Sophie Payot, Nathalie Leblond-Bourget, and Gérard Guédon. 2014. 'Conjugative and Mobilizable Genomic Islands in Bacteria: Evolution and Diversity'. *FEMS Microbiology Reviews* 38 (4): 720–60. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>.

Bengtsson-Palme, Johan, Martin Angelin, Mikael Huss, Sanela Kjellqvist, Erik Kristiansson, Helena Palmgren, D. G. Joakim Larsson, and Anders Johansson. 2015. 'The Human Gut Microbiome as a Transporter of Antibiotic Resistance Genes between Continents'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (10): 6551–60. <https://doi.org/10.1128/AAC.00933-15>.

Bengtsson-Palme, Johan, Rickard Hammarén, Chandan Pal, Marcus Östman, Berndt Björleinius, Carl-Fredrik Flach, Jerker Fick, Erik Kristiansson, Mats Tysklind, and D. G. Joakim Larsson. 2016. 'Elucidating Selection Processes for Antibiotic Resistance in Sewage Treatment Plants Using Metagenomics'. *Science of The Total Environment* 572 (December): 697–712. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.228>.

Bengtsson-Palme, Johan, and D. G. Joakim Larsson. 2016. 'Concentrations of Antibiotics Predicted to Select for Resistant Bacteria: Proposed Limits for Environmental Regulation'. *Environment International* 86 (January): 140–49. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>.

Bénie Bi Vroh, Joseph, and Ibrahima Seck. 2016. 'La mise en œuvre du concept One Health est-elle une réalité en Afrique ?' *Santé Publique* 28 (3): 283–85. <https://doi.org/10.3917/spub.163.0283>.

Bennani, Houda, Ana Mateus, Nicholas Mays, Elizabeth Eastmure, Katharina D. C. Stärk, and Barbara Häslér. 2020. 'Overview of Evidence of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in the Food Chain'. *Antibiotics* 9 (2): 49. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020049>.

Berendonk, Thomas U., Célia M. Manaia, Christophe Merlin, Despo Fatta-Kassinos, Eddie Cytryn, Fiona Walsh, Helmut Bürgmann, et al. 2015. 'Tackling Antibiotic Resistance: The Environmental Framework'. *Nature Reviews Microbiology* 13 (5): 310–17. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>.

Bhat, Basharat Ahmad, Rakeeb Ahmad Mir, Hafsa Qadri, Rohan Dhiman, Abdullah Almilaibary, Mustfa Alkhanani, and Manzoor Ahmad Mir. 2023. 'Integrations in the Development of Antimicrobial Resistance: Critical Review and Perspectives'. *Frontiers in Microbiology* 14 (August): 1231938. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1231938>.

Bijlsma, Lubertus, Elena Pitarch, Eddie Fonseca, María Ibáñez, Ana María Botero, Javier Claros, Laura Pastor, and Félix Hernández. 2021. 'Investigation of Pharmaceuticals in a Conventional Wastewater Treatment Plant: Removal Efficiency, Seasonal Variation and Impact of a Nearby Hospital'. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9 (4): 105548. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105548>.

Biswas, Raju, Urmi Halder, Ashutosh Kabiraj, Amit Mondal, and Rajib Bandopadhyay. 2021. 'Overview on the Role of Heavy Metals Tolerance on Developing Antibiotic Resistance in Both Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria'. *Archives of Microbiology* 203 (6): 2761–70. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02275-w>.

Blair, Jessica M. A., Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu, and Laura J. V. Piddock. 2015. 'Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance'. *Nature Reviews Microbiology* 13 (1): 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.

Blair, Jessica MA, Grace E Richmond, and Laura JV Piddock. 2014. 'Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria and Their Role in Antibiotic Resistance'. *Future Microbiology* 9 (10): 1165–77. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>.

Blokesch, Melanie. 2016. 'Natural Competence for Transformation'. *Current Biology* 26 (21): R1126–30. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.058>.

Botelho, João, and Hinrich Schulenburg. 2021. 'The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution'. *Trends in Microbiology*, Special Issue: Microbial Genetics: Stress Management, 29 (1): 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.011>.

Bouki, Chryssa, Danae Venieri, and Evan Diamadopoulos. 2013. 'Detection and Fate of Antibiotic Resistant Bacteria in Wastewater Treatment Plants: A Review'. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91 (May): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>.

Bourque, Guillaume, Kathleen H. Burns, Mary Gehring, Vera Gorbunova, Andrei Seluanov, Molly Hammell, Michaël Imbeault, et al. 2018. 'Ten Things You Should Know about

Transposable Elements'. *Genome Biology* 19 (1): 199. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>.

Buelow, Elena, Jumamurat R Bayjanov, Eline Majoor, Rob JL Willems, Marc JM Bonten, Heike Schmitt, and Willem van Schaik. 2018a. 'Limited Influence of Hospital Wastewater on the Microbiome and Resistome of Wastewater in a Community Sewerage System'. *FEMS Microbiology Ecology* 94 (7): fiy087. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy087>.

Buelow, Elena, Teresita d. j. Bello González, Susana Fuentes, Wouter A. A. de Steenhuijsen Pijters, Leo Lahti, Jumamurat R. Bayjanov, Eline A. M. Majoor, et al. 2017. 'Comparative Gut Microbiota and Resistome Profiling of Intensive Care Patients Receiving Selective Digestive Tract Decontamination and Healthy Subjects'. *Microbiome* 5 (1): 88. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0309-z>.

Buelow, Elena, Catherine Dauga, Claire Carrion, Hugo Mathé-Hubert, Sophia Achaibou, Margaux Gaschet, Thomas Jové, et al. 2023. 'Hospital and Urban Wastewaters Shape the Matrix and Active Resistome of Environmental Biofilms'. *Water Research* 244 (October): 120408. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120408>.

Buelow, Elena, Andreu Rico, Margaux Gaschet, José Lourenço, Sean P. Kennedy, Laure Wiest, Marie-Cecile Ploy, and Christophe Dagot. 2020. 'Hospital Discharges in Urban Sanitation Systems: Long-Term Monitoring of Wastewater Resistome and Microbiota in Relationship to Their Eco-Exposome'. *Water Research X* 7 (February): 100045. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100045>.

Buffet-Bataillon, Sylvie, Pierre Tattevin, Martine Bonnaure-Mallet, and Anne Jolivet-Gougeon. 2012. 'Emergence of Resistance to Antibacterial Agents: The Role of Quaternary Ammonium Compounds—a Critical Review'. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39 (5): 381–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011>.

Burnham, Jason P. 2021. 'Climate Change and Antibiotic Resistance: A Deadly Combination'. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 8 (January): 2049936121991374. <https://doi.org/10.1177/2049936121991374>.

Bush, Karen. 2018. 'Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (10): e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.

Bush, Karen, and Patricia A. Bradford. 2016. ' $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (8): a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>.

Bush, Karen, and George A. Jacoby. 2010. 'Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 969–76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.

Buta, Martyna, Jakub Hubeny, Wiktor Zieliński, Monika Harnisz, and Ewa Korzeniewska. 2021. 'Sewage Sludge in Agriculture – the Effects of Selected Chemical Pollutants and Emerging Genetic Resistance Determinants on the Quality of Soil and Crops – a Review'. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 214 (May): 112070. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112070>.

- Buta-Hubeny, Martyna, Ewa Korzeniewska, Jakub Hubeny, Wiktor Zieliński, Damian Rolbiecki, Monika Harnisz, and Łukasz Paukszto. 2022. 'Structure of the Manure Resistome and the Associated Mobilome for Assessing the Risk of Antimicrobial Resistance Transmission to Crops'. *Science of The Total Environment* 808 (February): 152144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152144>.
- Butaye, Patrick, Axel Cloeckaert, and Stefan Schwarz. 2003. 'Mobile Genes Coding for Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria'. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Efflux pumps and antibiotic resistance of microorganisms, 22 (3): 205–10. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00202-4).
- Byrne-Bailey, K. G., W. H. Gaze, L. Zhang, P. Kay, A. Boxall, P. M. Hawkey, and E. M. H. Wellington. 2011. 'Integron Prevalence and Diversity in Manured Soil'. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2): 684–87. <https://doi.org/10.1128/AEM.01425-10>.
- Cambray, Guillaume, Anne-Marie Guerout, and Didier Mazel. 2010. 'Integrans'. *Annual Review of Genetics* 44 (1): 141–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>.
- Cauci, Serena, Antti Karkman, Damiano Cacace, Marcus Rybicki, Patrick Timpel, Veiko Voolaid, Robert Gurke, Marko Virta, and Thomas U. Berendonk. 2016. 'Seasonality of Antibiotic Prescriptions for Outpatients and Resistance Genes in Sewers and Wastewater Treatment Plant Outflow'. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (5): fiw060. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw060>.
- Chacón, Luz, Eric Morales, Carmen Valiente, Liliana Reyes, and Kenia Barrantes. 2021. 'Wastewater-Based Epidemiology of Enteric Viruses and Surveillance of Acute Gastrointestinal Illness Outbreaks in a Resource-Limited Region'. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 105 (4): 1004–12. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0050>.
- Chagas, T.P.G., L.M. Seki, J.C. Cury, J.A.L. Oliveira, A.M.R. Dávila, D.M. Silva, and M.D. Asensi. 2011. 'Multiresistance, Beta-lactamase-encoding Genes and Bacterial Diversity in Hospital Wastewater in Rio de Janeiro, Brazil'. *Journal of Applied Microbiology* 111 (3): 572–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x>.
- Chardon, H., & Brugère, H. (2014). Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes. Cahiers Sécurité Sanitaire Santé Animale du Centre d'Information des Viandes.
- Charpentier, Xavier, Patrice Polard, and Jean-Pierre Claverys. 2012. 'Induction of Competence for Genetic Transformation by Antibiotics: Convergent Evolution of Stress Responses in Distant Bacterial Species Lacking SOS?' *Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials • Genomics*, 15 (5): 570–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.001>.
- Che, You, Yu Yang, Xiaoqing Xu, Karel Břinda, Martin F. Polz, William P. Hanage, and Tong Zhang. 2021. 'Conjugative Plasmids Interact with Insertion Sequences to Shape the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (6): e2008731118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008731118>.
- Chen, Jianwen, Junjian Li, Hong Zhang, Wei Shi, and Yong Liu. 2019. 'Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China'. *Frontiers in Microbiology* 10. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01916>.

Chen, Qinglin, Xinli An, Hu Li, Jianqiang Su, Yibing Ma, and Yong-Guan Zhu. 2016. 'Long-Term Field Application of Sewage Sludge Increases the Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Soil'. *Environment International* 92–93 (July): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>.

Chen, Sibe, Zhiwei Gan, Zhi Li, Yiwen Li, Xuan Ma, Mengqin Chen, Bing Qu, Sanglan Ding, and Shijun Su. 2021. 'Occurrence and Risk Assessment of Anthelmintics in Tuojiang River in Sichuan, China'. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 220 (September): 112360. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112360>.

Cheng, Guyue, Jianan Ning, Saeed Ahmed, Junhong Huang, Rizwan Ullah, Boyu An, Haihong Hao, et al. 2019. 'Selection and Dissemination of Antimicrobial Resistance in Agri-Food Production'. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 8 (1): 158. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0623-2>.

Chiang, Yin Ning, José R. Penadés, and John Chen. 2019. 'Genetic Transduction by Phages and Chromosomal Islands: The New and Noncanonical'. *PLoS Pathogens* 15 (8): e1007878. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>.

Chiffre, Axelle, François Degiorgi, Audrey Buleté, Loïc Spinner, and Pierre-Marie Badot. 2016. 'Occurrence of Pharmaceuticals in WWTP Effluents and Their Impact in a Karstic Rural Catchment of Eastern France'. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (24): 25427–41. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7751-5>.

Cho, Sun-Mi, Seong Geun Hong, Yangsoon Lee, Wonkeun Song, Dongeun Yong, Seok Hoon Jeong, Kyungwon Lee, and Yunsop Chong. 2021. 'First Identification of IMP-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase in *Delftia tsuruhatensis* Strain CRS1243 Isolated From a Clinical Specimen'. *Annals of Laboratory Medicine* 41 (4): 436–38. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.4.436>.

Chow, Louise K. M., Timothy M. Ghaly, and Michael R. Gillings. 2021. 'A Survey of Sub-Inhibitory Concentrations of Antibiotics in the Environment'. *Journal of Environmental Sciences* 99 (January): 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.05.030>.

Christaki, Eirini, Markella Marcou, and Andreas Tofarides. 2020. 'Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence'. *Journal of Molecular Evolution* 88 (1): 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>.

Chukwu, Kelechi B., Ovokeroye A. Abafe, Daniel G. Amoako, Sabiha Y. Essack, and Akebe L. K. Abia. 2023. 'Antibiotic, Heavy Metal, and Biocide Concentrations in a Wastewater Treatment Plant and Its Receiving Water Body Exceed PNEC Limits: Potential for Antimicrobial Resistance Selective Pressure'. *Antibiotics* 12 (7): 1166. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071166>.

Čižman, Milan. 2003. 'The Use and Resistance to Antibiotics in the Community'. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21 (4): 297–307. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00394-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00394-1).

Čizmić, Mirta, Sandra Babić, and Marija Kaštelan-Macan. 2017. 'Multi-Class Determination of Pharmaceuticals in Wastewaters by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Matrix Effect Study'. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (25): 20521–39. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9660-7>.

Cole, E. C., R. M. Addison, J. R. Rubino, K. E. Leese, P. D. Dulaney, M. S. Newell, J. Wilkins, D. J. Gaber, T. Wineinger, and D. A. Criger. 2003. 'Investigation of Antibiotic and Antibacterial Agent Cross-Resistance in Target Bacteria from Homes of Antibacterial Product Users and Nonusers'. *Journal of Applied Microbiology* 95 (4): 664–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02022.x>.

Collineau, Lucie, Clémence Bourély, Léo Rousset, Anne Berger-Carbonne, Marie-Cécile Ploy, Céline Pulcini, and Mélanie Colomb-Cotinat. 2023. 'Towards One Health Surveillance of Antibiotic Resistance: Characterisation and Mapping of Existing Programmes in Humans, Animals, Food and the Environment in France, 2021'. *Eurosurveillance* 28 (22): 2200804. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.22.2200804>.

Collis, C M, and R M Hall. 1995. 'Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons.' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (1): 155–62.

Coluzzi, Charles, Gérard Guédon, Marie-Dominique Devignes, Chloé Ambroset, Valentin Loux, Thomas Lacroix, Sophie Payot, and Nathalie Leblond-Bourget. 2017. 'A Glimpse into the World of Integrative and Mobilizable Elements in Streptococci Reveals an Unexpected Diversity and Novel Families of Mobilization Proteins'. *Frontiers in Microbiology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00443>.

Comte, Irina, Alice Pradel, Armand Crabit, Charles Mottes, Lai Ting Pak, and Philippe Cattan. 2022. 'Long-Term Pollution by Chlordecone of Tropical Volcanic Soils in the French West Indies: New Insights and Improvement of Previous Predictions'. *Environmental Pollution* 303 (June): 119091. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119091>.

Costea, Paul I., Falk Hildebrand, Manimozhiyan Arumugam, Fredrik Bäckhed, Martin J. Blaser, Frederic D. Bushman, Willem M. de Vos, et al. 2018. 'Enterotypes in the Landscape of Gut Microbial Community Composition'. *Nature Microbiology* 3 (1): 8–16. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>.

Cyprowski, Marcin, Agata Stobnicka-Kupiec, Anna Ławniczek-Wałczyk, Aleksandra Bakal-Kijek, Małgorzata Gołofit-Szymczak, and Rafał L. Górny. 2018. 'Anaerobic Bacteria in Wastewater Treatment Plant'. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 91 (5): 571–79. <https://doi.org/10.1007/s00420-018-1307-6>.

Czatzkowska, Małgorzata, Izabela Wolak, Monika Harnisz, and Ewa Korzeniewska. 2022. 'Impact of Anthropogenic Activities on the Dissemination of ARGs in the Environment—A Review'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (19): 12853. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912853>.

Czekalski, Nadine, Tom Berthold, Serena Caucci, Andrea Egli, and Helmut Buergermann. 2012. 'Increased Levels of Multiresistant Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and Their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland'. *Frontiers in Microbiology* 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00106>.

Dagot, Christophe. 2018. 'Traitement des résidus de médicaments dans les ouvrages d'épuration des eaux'. *Environnement, Risques & Santé* 17 (Hors-serie): 47–58.

Darby, Elizabeth M., Eleftheria Trampari, Pauline Siasat, Maria Solsona Gaya, Ilyas Alav, Mark A. Webber, and Jessica M. A. Blair. 2023. 'Molecular Mechanisms of Antibiotic

Resistance Revisited'. *Nature Reviews Microbiology* 21 (5): 280–95. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>.

Daubin, Vincent, and Gergely J. Szöllösi. 2016. 'Horizontal Gene Transfer and the History of Life'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (4): a018036. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018036>.

Davies, Julian, and Dorothy Davies. 2010. 'Origins and Evolution of Antibiotic Resistance'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 74 (3): 417–33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.

D'Costa, Vanessa M., Christine E. King, Lindsay Kalan, Mariya Morar, Wilson W. L. Sung, Carsten Schwarz, Duane Froese, et al. 2011. 'Antibiotic Resistance Is Ancient'. *Nature* 477 (7365): 457–61. <https://doi.org/10.1038/nature10388>.

Denissen, Julia, Brandon Reyneke, Monique Waso-Reyneke, Benjamin Havenga, Tobias Barnard, Sehaam Khan, and Wesaal Khan. 2022. 'Prevalence of ESKAPE Pathogens in the Environment: Antibiotic Resistance Status, Community-Acquired Infection and Risk to Human Health'. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 244 (July): 114006. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>.

Di Cesare, Andrea, Ester M. Eckert, Silvia D'Urso, Roberto Bertoni, David C. Gillan, Ruddy Wattiez, and Gianluca Corno. 2016. 'Co-Occurrence of Integrase 1, Antibiotic and Heavy Metal Resistance Genes in Municipal Wastewater Treatment Plants'. *Water Research* 94 (May): 208–14. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.049>.

A. Dickson, M. Smith, F. Smith, J. Park, C. King, K. Currie, D. Langdridge, M. Davis & P. Flowers (2019) Understanding the relationship between pet owners and their companion animals as a key context for antimicrobial resistance-related behaviours: an interpretative phenomenological analysis, *Health Psychology and Behavioral Medicine*, 7:1, 45-61, DOI: 10.1080/21642850.2019.1577738

Dillard, Brian A, Albert K Chung, Alex R Gunderson, Shane C Campbell-Staton, and Andrew H Moeller. n.d. 'Humanization of Wildlife Gut Microbiota in Urban Environments'. *eLife* 11: e76381. <https://doi.org/10.7554/eLife.76381>.

Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Guadeloupe (DEAL). 2020. Assainissement des eaux usées. Available from: <https://www.guadeloupe.developpement-durable.gouv.fr/assainissement-des-eaux-usees-r938.html>. [Accessed Nov 23, 2023]

Directive 86/278/CEE du Conseil du 12 juin 1986 relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture. 1986. OJ L. Vol. 181. <http://data.europa.eu/eli/dir/1986/278/oj/fra>

Dolejska, Monika, and Ivan Literak. 2019. 'Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (8): e01167-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01167-19>.

Domínguez-Santos, Rebeca, Ana Elena Pérez-Cobas, Paolo Cuti, Vicente Pérez-Brocal, Carlos García-Ferris, Andrés Moya, Amparo Latorre, and Rosario Gil. 2021. 'Interkingdom Gut



Microbiome and Resistome of the Cockroach *Blattella Germanica*'. *mSystems* 6 (3): e01213-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01213-20>.

Doster, Enrique, Lee J. Pinnell, Noelle R. Noyes, Jennifer K. Parker, Cameron A. Anderson, Calvin W. Booker, Sherry J. Hannon, et al. 2022. 'Evaluating the Effects of Antimicrobial Drug Use on the Ecology of Antimicrobial Resistance and Microbial Community Structure in Beef Feedlot Cattle'. *Frontiers in Microbiology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.970358>.

Dromard, Charlotte R., Damien A. Devault, Yolande Bouchon-Navaro, Jean-Pierre Allénu, Hélène Budzinski, Sébastien Cordonnier, Nathalie Tapie, et al. 2022. 'Environmental Fate of Chlordecone in Coastal Habitats: Recent Studies Conducted in Guadeloupe and Martinique (Lesser Antilles)'. *Environmental Science and Pollution Research* 29 (1): 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04661-w>.

Duarte, Ana Sofia Ribeiro, Timo Röder, Liese Van Gompel, Thomas Nordahl Petersen, Rasmus Borup Hansen, Inge Marianne Hansen, Alex Bossers, Frank M. Aarestrup, Jaap A. Wagenaar, and Tine Hald. 2021. 'Metagenomics-Based Approach to Source-Attribution of Antimicrobial Resistance Determinants – Identification of Reservoir Resistome Signatures'. *Frontiers in Microbiology* 11 (January): 601407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601407>.

Durand, Guillaume André, Didier Raoult, and Grégory Dubourg. 2019. 'Antibiotic Discovery: History, Methods and Perspectives'. *International Journal of Antimicrobial Agents* 53 (4): 371–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.

Egea-Serrano, Andrés, Rick A Relyea, Miguel Tejedo, and Mar Torralva. 2012. 'Understanding of the Impact of Chemicals on Amphibians: A Meta-Analytic Review'. *Ecology and Evolution* 2 (7): 1382–97. <https://doi.org/10.1002/ece3.249>.

Elseviers, Monique M., Matus Ferech, Robert H. Vander Stichele, Herman Goossens, and the ESAC project Group. 2007. 'Antibiotic Use in Ambulatory Care in Europe (ESAC Data 1997–2002): Trends, Regional Differences and Seasonal Fluctuations'. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 16 (1): 115–23. <https://doi.org/10.1002/pds.1244>.

Escudero, José Antonio, Céline Loot, Aleksandra Nivina, and Didier Mazel. 2015. 'The Integron: Adaptation On Demand'. *Microbiology Spectrum* 3 (2): 10.1128/microbiolspec.mdna3-0019–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0019-2014>.

European Medicines Agency. 2020. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf). [Accessed Feb 15, 2024]

Faleye, A. C., A. A. Adegoke, K. Ramluckan, Jerker Fick, F. Bux, and T. A. Stenström. 2019. 'Concentration and Reduction of Antibiotic Residues in Selected Wastewater Treatment Plants and Receiving Waterbodies in Durban, South Africa'. *Science of The Total Environment* 678 (August): 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.410>.

Ferdinand, Malcom. 2015. 'De l'usage du chlordécone en Martinique et en Guadeloupe : l'égalité en question'. *Revue française des affaires sociales*, no. 1–2: 163–83. <https://doi.org/10.3917/rfas.151.0163>.

Ferech, Matus, Samuel Coenen, Surbhi Malhotra-Kumar, Katerina Dvorakova, Erik Hendrickx, Carl Suetens, Herman Goossens, and on behalf of the ESAC Project Group. 2006. 'European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): Outpatient Antibiotic Use in Europe'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (2): 401–7. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1188>.

Fernandes, Miriam R., Quezia Moura, Luciana Sartori, Ketrin C. Silva, Marcos PV Cunha, Fernanda Esposito, Ralf Lopes, et al. 2016. 'Silent Dissemination of Colistin-Resistant Escherichia Coli in South America Could Contribute to the Global Spread of the Mcr-1 Gene'. *Eurosurveillance* 21 (17): 30214. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214>.

Ferrari, Benoît, Raphael Mons, Bernard Vollat, Benoît Fraysse, Nicklas Paxéus, Roberto Lo Giudice, Antonino Pollio, and Jeanne Garric. 2004. 'Environmental Risk Assessment of Six Human Pharmaceuticals: Are the Current Environmental Risk Assessment Procedures Sufficient for the Protection of the Aquatic Environment?' *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (5): 1344–54. <https://doi.org/10.1897/03-246>.

FH. 2022. 'Mécanismes de résistance aux agents anti-infectieux antibiotiques'. 29 September 2022. [http://aemip.fr/?page\\_id=3765](http://aemip.fr/?page_id=3765).

Figueira, Vânia, Ivone Vaz-Moreira, Márcia Silva, and Célia M. Manaia. 2011. 'Diversity and Antibiotic Resistance of Aeromonas Spp. in Drinking and Waste Water Treatment Plants'. *Water Research* 45 (17): 5599–5611. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.021>.

Fleming, Alexander. 1929. 'On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzæ'. *British Journal of Experimental Pathology* 10 (3): 226–36.

Fluit, A. C., and F.-J. Schmitz. 2004. 'Resistance Integrons and Super-Integrons'. *Clinical Microbiology and Infection* 10 (4): 272–88. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x>.

Franklin, A.M., N.E. Brinkman, M.A. Jahne, and S.P. Keely. 2021. 'Twenty-First Century Molecular Methods for Analyzing Antimicrobial Resistance in Surface Waters to Support One Health Assessments'. *Journal of Microbiological Methods* 184 (May): 106174. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106174>.

Frost, Isabel, Thomas P. Van Boeckel, João Pires, Jessica Craig, and Ramanan Laxminarayan. 2019. 'Global Geographic Trends in Antimicrobial Resistance: The Role of International Travel'. *Journal of Travel Medicine* 26 (8): taz036. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz036>.

Furness, Lauren E., Amy Campbell, Lihong Zhang, William H. Gaze, and Robbie A. McDonald. 2017. 'Wild Small Mammals as Sentinels for the Environmental Transmission of Antimicrobial Resistance'. *Environmental Research* 154 (April): 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014>.

Gaillardet, J., J. Viers, and B. Dupré. 2003. 'Trace Elements in River Waters'. *Treatise on Geochemistry* 5 (December): 605. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/05165-3>.

- Gao, Pin, Shi He, Shenglin Huang, Kanzhu Li, Zhenhong Liu, Gang Xue, and Weimin Sun. 2015. 'Impacts of Coexisting Antibiotics, Antibacterial Residues, and Heavy Metals on the Occurrence of Erythromycin Resistance Genes in Urban Wastewater'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (9): 3971–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6404-9>.
- Gao, Pin, Mariya Munir, and Irene Xagorarakis. 2012. 'Correlation of Tetracycline and Sulfonamide Antibiotics with Corresponding Resistance Genes and Resistant Bacteria in a Conventional Municipal Wastewater Treatment Plant'. *Science of The Total Environment*, Special Section: Reviews of Trace Metal Pollution in China, 421–422 (April): 173–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.061>.
- Gaurav, Amit, Perwez Bakht, Mahak Saini, Shivam Pandey, and Ranjana Pathania. 2023. 'Role of Bacterial Efflux Pumps in Antibiotic Resistance, Virulence, and Strategies to Discover Novel Efflux Pump Inhibitors'. *Microbiology* 169 (5): 001333. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001333>.
- Gaze, W. H., N. Abdousslam, P. M. Hawkey, and E. M. H. Wellington. 2005. 'Incidence of Class 1 Integrons in a Quaternary Ammonium Compound-Polluted Environment'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (5): 1802–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005>.
- Gerba, Charles P. 2015. 'Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application'. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (2): 464–69. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-14>.
- Gheorghe, Stefania, Jana Petre, Irina Lucaciu, Catalina Stoica, and Mihai Nita-Lazar. 2016. 'Risk Screening of Pharmaceutical Compounds in Romanian Aquatic Environment'. *Environmental Monitoring and Assessment* 188 (6): 379. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5375-3>.
- Giebułtowicz, Joanna, Grzegorz Nałęcz-Jawecki, Monika Harnisz, Dawid Kucharski, Ewa Korzeniewska, and Grażyna Płaza. 2020. 'Environmental Risk and Risk of Resistance Selection Due to Antimicrobials' Occurrence in Two Polish Wastewater Treatment Plants and Receiving Surface Water'. *Molecules* 25 (6): 1470. <https://doi.org/10.3390/molecules25061470>.
- Gillings, Michael R. 2014. 'Integrons: Past, Present, and Future'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 78 (2): 257–77. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.
- Gillings, Michael R, William H Gaze, Amy Pruden, Kornelia Smalla, James M Tiedje, and Yong-Guan Zhu. 2015. 'Using the Class 1 Integron-Integrase Gene as a Proxy for Anthropogenic Pollution'. *The ISME Journal* 9 (6): 1269–79. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>.
- Giraudoux, Patrick. 2022. 'La santé des écosystèmes : quelle définition ? / Version en anglais: Ecosystem health : what is the definition ?' *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 175 (1): 120–39. <https://doi.org/10.3406/bavf.2022.70980>.
- Gomaa, Eman Zakaria. 2020. 'Human Gut Microbiota/Microbiome in Health and Diseases: A Review'. *Antonie van Leeuwenhoek* 113 (12): 2019–40. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>.
- Grehs, Bárbara W. N., Maria A. O. Linton, Barbara Clasen, Andressa de Oliveira Silveira, and Elvis Carissimi. 2021. 'Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants: Understanding

the Problem and Future Perspectives'. *Archives of Microbiology* 203 (3): 1009–20. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02093-6>.

Gudeta, Dereje Dadi, Valeria Bortolaia, Aurélie Jayol, Laurent Poirel, Patrice Nordmann, and Luca Guardabassi. 2016. 'Chromobacterium Spp. Harbour Ambler Class A  $\beta$ -Lactamases Showing High Identity with KPC'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (6): 1493–96. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw020>.

Guedes-Alonso, R., S. Montesdeoca-Esponda, J. Pacheco-Juárez, Z. Sosa-Ferrera, and J. J. Santana-Rodríguez. 2020. 'A Survey of the Presence of Pharmaceutical Residues in Wastewaters. Evaluation of Their Removal Using Conventional and Natural Treatment Procedures'. *Molecules* 25 (7): 1639. <https://doi.org/10.3390/molecules25071639>.

Guédon, Gérard, Virginie Libante, Charles Coluzzi, Sophie Payot, and Nathalie Leblond-Bourget. 2017. 'The Obscure World of Integrative and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements That Pirate Bacterial Conjugative Systems'. *Genes* 8 (11): 337. <https://doi.org/10.3390/genes8110337>.

Gullberg, Erik, Lisa M. Albrecht, Christoffer Karlsson, Linus Sandegren, and Dan I. Andersson. 2014. 'Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals'. *mBio* 5 (5): 10.1128/mbio.01918-14. <https://doi.org/10.1128/mbio.01918-14>.

Gumbi, Bhekumuzi P., Brenda Moodley, Grace Birungi, and Patrick G. Ndungu. 2017. 'Detection and Quantification of Acidic Drug Residues in South African Surface Water Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry'. *Chemosphere* 168 (February): 1042–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.105>.

Gupta, Sonia, T. R. Sreekrishnan, and Shaikh Ziauddin Ahammad. 2022. 'Effects of Heavy Metals on the Development and Proliferation of Antibiotic Resistance in Urban Sewage Treatment Plants'. *Environmental Pollution* 308 (September): 119649. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119649>.

Gurke, Robert, Julia Rossmann, Sara Schubert, Tobias Sandmann, Martin Rößler, Reinhard Oertel, and Joachim Fauler. 2015. 'Development of a SPE-HPLC–MS/MS Method for the Determination of Most Prescribed Pharmaceuticals and Related Metabolites in Urban Sewage Samples'. *Journal of Chromatography B* 990 (May): 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.008>.

Guyomard-Rabenirina, Stéphanie, Celia Dartron, Mélanie Falord, Syndia Sadikalay, Célia Ducat, Vincent Richard, Sébastien Breurec, Olivier Gros, and Antoine Talarmin. 2017. 'Resistance to Antimicrobial Drugs in Different Surface Waters and Wastewaters of Guadeloupe'. *PloS One* 12 (3): e0173155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173155>.

Guyomard-Rabenirina, Stephanie, Yann Reynaud, Matthieu Pot, Emmanuel Albina, David Couvin, Celia Ducat, Gaëlle Gruel, et al. 2020. 'Antimicrobial Resistance in Wildlife in Guadeloupe (French West Indies): Distribution of a Single blaCTX–M–1/IncI1/ST3 Plasmid Among Humans and Wild Animals'. *Frontiers in Microbiology* 11 (July): 1524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01524>.

Haenni, Marisa, Estelle Saras, Pierre Châtre, Christine Médaille, Michèle Bes, Jean-Yves Madec, and Frédéric Laurent. 2012. 'A USA300 Variant and Other Human-Related

Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains Infecting Cats and Dogs in France'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (2): 326–29. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr499>.

Hall, Barry G, and Miriam Barlow. 2004. 'Evolution of the Serine  $\beta$ -Lactamases: Past, Present and Future'. *Drug Resistance Updates* 7 (2): 111–23. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2004.02.003>.

Halling-Sørensen, B., H. C. Lützhøft, H. R. Andersen, and F. Ingerslev. 2000. 'Environmental Risk Assessment of Antibiotics: Comparison of Mecillinam, Trimethoprim and Ciprofloxacin'. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 Suppl 1 (September): 53–58; discussion 63–65.

Han, Xue-Mei, Hang-Wei Hu, Qing-Lin Chen, Li-Yuan Yang, He-Lian Li, Yong-Guan Zhu, Xiang-Zhen Li, and Yi-Bing Ma. 2018. 'Antibiotic Resistance Genes and Associated Bacterial Communities in Agricultural Soils Amended with Different Sources of Animal Manures'. *Soil Biology and Biochemistry* 126 (November): 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.018>.

Hansen, Thomas Arn, Tejal Joshi, Anders Rhod Larsen, Paal Skytt Andersen, Klaus Harms, Sarah Mollerup, Eske Willerslev, Kurt Fursted, Lars Peter Nielsen, and Anders Johannes Hansen. 2016. 'Vancomycin Gene Selection in the Microbiome of Urban *Rattus Norvegicus* from Hospital Environment'. *Evolution, Medicine, and Public Health* 2016 (1): 219–26. <https://doi.org/10.1093/emph/eow021>.

Hapeshi, Evroula, Merixtell Gros, Rebeca Lopez-Serna, Maria-Rosa Boleda, Fransesc Ventura, Mira Petrovic, Damià Barceló, and Despo Fatta-Kassinou. 2015a. 'Licit and Illicit Drugs in Urban Wastewater in Cyprus'. *CLEAN – Soil, Air, Water* 43 (9): 1272–78. <https://doi.org/10.1002/clen.201400483>.

Harada, Arata, Koya Komori, Norihide Nakada, Kiyooki Kitamura, and Yutaka Suzuki. 2008. 'Biological Effects of PPCPs on Aquatic Lives and Evaluation of River Waters Affected by Different Wastewater Treatment Levels'. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 58 (8): 1541–46. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.742>.

Hargreaves, Andrew J., Peter Vale, Jonathan Whelan, Carlos Constantino, Gabriela Dotro, and Elise Cartmell. 2016. 'Mercury and Antimony in Wastewater: Fate and Treatment'. *Water, Air, and Soil Pollution* 227: 89. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2756-8>.

Hassoun-Kheir, Nasreen, Yoav Stabholz, Jan-Ulrich Kreft, Roberto de la Cruz, Jesús L. Romalde, Joseph Nesme, Søren J. Sørensen, Barth F. Smets, David Graham, and Mical Paul. 2020. 'Comparison of Antibiotic-Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes Abundance in Hospital and Community Wastewater: A Systematic Review'. *Science of The Total Environment* 743 (November): 140804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140804>.

Hatosy, Stephen M., and Adam C. Martiny. 2015. 'The Ocean as a Global Reservoir of Antibiotic Resistance Genes'. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (21): 7593–99. <https://doi.org/10.1128/AEM.00736-15>.

Haute autorité de santé. 2021. Antibiorésistance. De la recherche à l'action, tous mobilisés pour lutter contre l'antibiorésistance. Available from: <https://www.has->

sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-11/dossier\_de\_presse\_antibioresistance.pdf.  
[Accessed Feb 15, 2024]

He, Ya, Qingbin Yuan, Jacques Mathieu, Lauren Stadler, Naomi Senehi, Ruonan Sun, and Pedro J. J. Alvarez. 2020. 'Antibiotic Resistance Genes from Livestock Waste: Occurrence, Dissemination, and Treatment'. *Npj Clean Water* 3 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>.

Hendriksen, Rene S., Patrick Munk, Patrick Njage, Bram van Bunnik, Luke McNally, Oksana Lukjancenko, Timo Röder, et al. 2019. 'Global Monitoring of Antimicrobial Resistance Based on Metagenomics Analyses of Urban Sewage'. *Nature Communications* 10 (1): 1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>.

Henriques, Isabel, Marta Tacão, Laura Leite, Cátia Fidalgo, Susana Araújo, Cláudia Oliveira, and Artur Alves. 2016. 'Co-Selection of Antibiotic and Metal(Loid) Resistance in Gram-Negative Epiphytic Bacteria from Contaminated Salt Marshes'. *Marine Pollution Bulletin* 109 (1): 427–34. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.031>.

Heß, Stefanie, David Kneis, Tobias Österlund, Bing Li, Erik Kristiansson, and Thomas U. Berendonk. 2019. 'Sewage from Airplanes Exhibits High Abundance and Diversity of Antibiotic Resistance Genes'. *Environmental Science & Technology* 53 (23): 13898–905. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03236>.

Holmes, Alison H., Luke S. P. Moore, Arnfinn Sundsfjord, Martin Steinbakk, Sadie Regmi, Abhilasha Karkey, Philippe J. Guerin, and Laura J. V. Piddock. 2016. 'Understanding the Mechanisms and Drivers of Antimicrobial Resistance'. *The Lancet* 387 (10014): 176–87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0).

Honda, Ryo, Norihisa Matsuura, Sovannlaksmy Sorn, Sawako Asakura, Yuta Morinaga, Than Van Huy, Muhammad Adnan Sabar, Yalkhin Masakke, Hiroe Hara-Yamamura, and Toru Watanabe. 2023. 'Transition of Antimicrobial Resistome in Wastewater Treatment Plants: Impact of Process Configuration, Geographical Location and Season'. *Npj Clean Water* 6 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41545-023-00261-x>.

Hossain, Anwar, Shihori Nakamichi, Md. Habibullah-Al-Mamun, Keiichiro Tani, Shigeki Masunaga, and Hiroyuki Matsuda. 2018. 'Occurrence and Ecological Risk of Pharmaceuticals in River Surface Water of Bangladesh'. *Environmental Research* 165 (August): 258–66. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.04.030>.

Hu, Hang-Wei, Xue-Mei Han, Xiu-Zhen Shi, Jun-Tao Wang, Li-Li Han, Deli Chen, and Ji-Zheng He. 2016. 'Temporal Changes of Antibiotic-Resistance Genes and Bacterial Communities in Two Contrasting Soils Treated with Cattle Manure'. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (2): fiv169. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv169>.

Huang, Qiuxin, Yiyi Yu, Caiming Tang, and Xianzhi Peng. 2010. 'Determination of Commonly Used Azole Antifungals in Various Waters and Sewage Sludge Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry'. *Journal of Chromatography A* 1217 (21): 3481–88. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.022>.

Hubeny, Jakub, Monika Harnisz, Ewa Korzeniewska, Martyna Buta, Wiktor Zieliński, Damian Rolbiecki, Joanna Giebułtowiec, Grzegorz Naęcz-Jawecki, and Grażyna Płaza. 2021.

'Industrialization as a Source of Heavy Metals and Antibiotics Which Can Enhance the Antibiotic Resistance in Wastewater, Sewage Sludge and River Water'. *PLOS ONE* 16 (6): e0252691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252691>.

Huijbers, Patricia M. C., D. G. Joakim Larsson, and Carl-Fredrik Flach. 2020. 'Surveillance of Antibiotic Resistant Escherichia Coli in Human Populations through Urban Wastewater in Ten European Countries'. *Environmental Pollution* 261 (June): 114200. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114200>.

Husain Khan, Afzal, Hamidi Abdul Aziz, Puganeshwary Palaniandy, Mu Naushad, Emre Cevik, and Sasan Zahmatkesh. 2023. 'Pharmaceutical Residues in the Ecosystem: Antibiotic Resistance, Health Impacts, and Removal Techniques'. *Chemosphere* 339 (October): 139647. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139647>.

Hutchings, Matthew I, Andrew W Truman, and Barrie Wilkinson. 2019. 'Antibiotics: Past, Present and Future'. *Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials*, 51 (October): 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

Ignak, Seyda, Yasar Nakipoglu, and Bulent Gurler. 2017. 'Frequency of Antiseptic Resistance Genes in Clinical Staphylococci and Enterococci Isolates in Turkey'. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 6 (August): 88. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0244-6>.

Ikhimiukor, Odion O., Erkison Ewomazino Odih, Pilar Donado-Godoy, and Iruka N. Okeke. 2022. 'A Bottom-up View of Antimicrobial Resistance Transmission in Developing Countries'. *Nature Microbiology* 7 (6): 757–65. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01124-w>.

Institut d'Émission des Départements d'Outre-Mer (IDEOM). 2023. Rapport annuel économique 2022. Available from: [https://www.iedom.fr/IMG/pdf/rapport\\_annuel\\_2022\\_-\\_iedom\\_guadeloupe.pdf](https://www.iedom.fr/IMG/pdf/rapport_annuel_2022_-_iedom_guadeloupe.pdf).

Ishii, Satoshi. 2020. 'Quantification of Antibiotic Resistance Genes for Environmental Monitoring: Current Methods and Future Directions'. *Current Opinion in Environmental Science & Health, Occupational safety and health: Emerging Microbial Contaminants and Human Health effects*, 16 (August): 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.02.004>.

Isidori, Marina, Margherita Lavorgna, Angela Nardelli, Luigia Pascarella, and Alfredo Parrella. 2005. 'Toxic and Genotoxic Evaluation of Six Antibiotics on Non-Target Organisms'. *Science of The Total Environment* 346 (1): 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017>.

Johar, A. A., M. A. Salih, H. A. Abdelrahman, H. Al Mana, H. A. Hadi, and N. O. Eltai. 2023. 'Wastewater-Based Epidemiology for Tracking Bacterial Diversity and Antibiotic Resistance in COVID-19 Isolation Hospitals in Qatar'. *Journal of Hospital Infection* 141 (November): 209–20. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.08.011>.

Johnson, Christopher M., and Alan D. Grossman. 2015. 'Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work'. *Annual Review of Genetics* 49: 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>.

Jones, Davey L., Jennifer M. Rhymes, Matthew J. Wade, Jessica L. Kevill, Shelagh K. Malham, Jasmine M. S. Grimsley, Charlotte Rimmer, Andrew J. Weightman, and Kata Farkas. 2023. 'Suitability of Aircraft Wastewater for Pathogen Detection and Public Health Surveillance'.

*Science of The Total Environment* 856 (January): 159162.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159162>.

Ju, Feng, Karin Beck, Xiaole Yin, Andreas Maccagnan, Christa S. McArdell, Heinz P. Singer, David R. Johnson, Tong Zhang, and Helmut Bürgmann. 2019. 'Wastewater Treatment Plant Resistomes Are Shaped by Bacterial Composition, Genetic Exchange, and Upregulated Expression in the Effluent Microbiomes'. *The ISME Journal* 13 (2): 346–60. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0277-8>.

Juksu, Kanokthip, Jian-Liang Zhao, You-Sheng Liu, Li Yao, Charoon Sarin, Siranee Sreesai, Pantip Klomjek, Yu-Xia Jiang, and Guang-Guo Ying. 2019. 'Occurrence, Fate and Risk Assessment of Biocides in Wastewater Treatment Plants and Aquatic Environments in Thailand'. *Science of The Total Environment* 690 (November): 1110–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.097>.

Junot, H., C. Méloni, A. Bleibtreu, and A. Robert. 2020. 'Impact de La Pandémie COVID-19 Sur Les Consommations Hospitalières En Antibiotiques, Étude Monocentrique d'un ESR Métropolitain'. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 21es Journées Nationales d'Infectiologie, 50 (6, Supplement): S94. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.06.190>.

Kaba, Hani E. J., Ellen Kuhlmann, and Simone Scheithauer. 2020. 'Thinking Outside the Box: Association of Antimicrobial Resistance with Climate Warming in Europe - A 30 Country Observational Study'. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 223 (1): 151–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.09.008>.

Kahle, Maren, Ignaz J. Buerge, Andrea Hauser, Markus D. Müller, and Thomas Poiger. 2008. 'Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters'. *Environmental Science & Technology* 42 (19): 7193–7200. <https://doi.org/10.1021/es8009309>.

Kalupahana, Ruwani S., Birgitta Duim, Koen M. Verstappen, Chandika D. Gamage, Nilanthi Dissanayake, Lakmali Ranatunga, Haitske Graveland, and Jaap A. Wagenaar. 2019. 'MRSA in Pigs and the Environment as a Risk for Employees in Pig-Dense Areas of Sri Lanka'. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2019.00025>.

Kang, Sanghoon, Joy D. Van Nostrand, Heidi L. Gough, Zhili He, Terry C. Hazen, David A. Stahl, and Jizhong Zhou. 2013. 'Functional Gene Array-Based Analysis of Microbial Communities in Heavy Metals-Contaminated Lake Sediments'. *FEMS Microbiology Ecology* 86 (2): 200–214. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12152>.

Karkman, Antti, Thi Thuy Do, Fiona Walsh, and Marko P. J. Virta. 2018. 'Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water'. *Trends in Microbiology* 26 (3): 220–28. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005>.

Karvelas, Michalis, Athanasios Katsoyiannis, and Constantini Samara. 2003. 'Occurrence and Fate of Heavy Metals in the Wastewater Treatment Process'. *Chemosphere* 53 (10): 1201–10. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00591-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00591-5).

Kennedy, K., and P. Collignon. 2010. 'Colonisation with Escherichia Coli Resistant to "Critically Important" Antibiotics: A High Risk for International Travellers'. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 29 (12): 1501–6. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1031-y>.



Kim, Dae-Wi, and Chang-Jun Cha. 2021. 'Antibiotic Resistome from the One-Health Perspective: Understanding and Controlling Antimicrobial Resistance Transmission'. *Experimental & Molecular Medicine* 53 (3): 301–9. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>.

Kim, Younghee, Kyungho Choi, Jinyong Jung, Sujung Park, Pan-Gyi Kim, and Jeongim Park. 2007. 'Aquatic Toxicity of Acetaminophen, Carbamazepine, Cimetidine, Diltiazem and Six Major Sulfonamides, and Their Potential Ecological Risks in Korea'. *Environment International* 33 (3): 370–75. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.017>.

Kim, Yun-Tae, #, Ji-Hyun Jang, Hyun-Chul Kim, Hyogyong Kim, Kyoung-Ryul Lee, Kyung Sun Park, Hee-Joo Lee, # & Young-Jin Kim, and \*. 2011. 'Identification of Strain Harboring Both Aac(6')-Ib and Aac(6')-Ib-Cr Variant Simultaneously in Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae'. *BMB Reports* 44 (4): 262–66.

Kirchhelle, Claas. 2018. 'Pharming Animals: A Global History of Antibiotics in Food Production (1935–2017)'. *Palgrave Communications* 4 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0152-2>.

Knight, Gwenan M., Nicholas G. Davies, Caroline Colijn, Francesc Coll, Tjibbe Donker, Danna R. Gifford, Rebecca E. Glover, et al. 2019. 'Mathematical Modelling for Antibiotic Resistance Control Policy: Do We Know Enough?' *BMC Infectious Diseases* 19 (November): 1011. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4630-y>.

Korzeniewska, Ewa, Anna Korzeniewska, and Monika Harnisz. 2013. 'Antibiotic Resistant Escherichia Coli in Hospital and Municipal Sewage and Their Emission to the Environment'. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91 (May): 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014>.

Kovalakova, Pavla, Leslie Cizmas, Thomas J. McDonald, Blahoslav Marsalek, Mingbao Feng, and Virender K. Sharma. 2020. 'Occurrence and Toxicity of Antibiotics in the Aquatic Environment: A Review'. *Chemosphere* 251 (July): 126351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>.

Koutsoumanis, Konstantinos, Ana Allende, Avelino Álvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, Robert Davies, et al. 2022. 'Transmission of Antimicrobial Resistance (AMR) during Animal Transport'. *EFSA Journal* 20 (10): e07586. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7586>.

Kristiansson, Erik, Jerker Fick, Anders Janzon, Roman Grabic, Carolin Rutgersson, Birgitta Weijdegård, Hanna Söderström, and D. G. Joakim Larsson. 2011. 'Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements'. *PLOS ONE* 6 (2): e17038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038>.

Kumar, Ayush, and Herbert P. Schweizer. 2005. 'Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake'. *Advanced Drug Delivery Reviews, Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Opportunities for New Targeted Therapies*, 57 (10): 1486–1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>.

Kümmerer, Klaus. 2009. 'Antibiotics in the Aquatic Environment – A Review – Part I'. *Chemosphere* 75 (4): 417–34. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>.

Kurenbach, Brigitta, Delphine Marjoshi, Carlos F. Amábile-Cuevas, Gayle C. Ferguson, William Godsoe, Paddy Gibson, and Jack A. Heinemann. 2015. 'Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate Cause Changes in Antibiotic Susceptibility in Escherichia Coli and Salmonella Enterica Serovar Typhimurium'. *mBio* 6 (2): e00009-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00009-15>.

Kyselková, Martina, Lucie Kotrbová, Gamonsiri Bhumibhamon, Alica Chroňáková, Jiří Jirout, Naděžda Vrchotová, Heike Schmitt, and Dana Elhottová. 2015. 'Tetracycline Resistance Genes Persist in Soil Amended with Cattle Feces Independently from Chlortetracycline Selection Pressure'. *Soil Biology and Biochemistry* 81 (February): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.018>.

Laborda, Pablo, Fernando Sanz-García, Luz Edith Ochoa-Sánchez, Teresa Gil-Gil, Sara Hernando-Amado, and José Luis Martínez. 2022. 'Wildlife and Antibiotic Resistance'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (May): 873989. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873989>.

Landman, C., and E. Quévrain. 2016. 'Le Microbiote Intestinal : Description, Rôle et Implication Physiopathologique'. *La Revue de Médecine Interne* 37 (6): 418–23. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2015.12.012>.

Langford, Bradley J., Miranda So, Marina Simeonova, Valerie Leung, Jennifer Lo, Tiffany Kan, Sumit Raybardhan, et al. 2023. 'Antimicrobial Resistance in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *The Lancet Microbe* 4 (3): e179–91. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00355-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00355-X).

Lansbury, Louise, Benjamin Lim, Vadsala Baskaran, and Wei Shen Lim. 2020. 'Co-Infections in People with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *Journal of Infection* 81 (2): 266–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>.

Larsen, Jesper, Marc Stegger, Paal S. Andersen, Andreas Petersen, Anders R. Larsen, Henrik Westh, Yvonne Agersø, et al. 2016. 'Evidence for Human Adaptation and Foodborne Transmission of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus'. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 63 (10): 1349–52. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw532>.

Larsson, D. G. Joakim, Cecilia de Pedro, and Nicklas Paxeus. 2007. 'Effluent from Drug Manufactures Contains Extremely High Levels of Pharmaceuticals'. *Journal of Hazardous Materials* 148 (3): 751–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008>.

Laupland, Kevin B., Deirdre L. Church, Jeanne Vidakovich, Melissa Mucenski, and Johann D. D. Pitout. 2008. 'Community-Onset Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing Escherichia Coli: Importance of International Travel'. *The Journal of Infection* 57 (6): 441–48. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.09.034>.

Leangapichart, Thongpan, Hervé Tissot-Dupont, Didier Raoult, Ziad A. Memish, Jean-Marc Rolain, and Philippe Gautret. 2017. 'Risk Factors for Acquisition of CTX-M Genes in Pilgrims during Hajj 2013 and 2014'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (9): 2627–35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx155>.

- Leclercq, Sebastien Olivier, Chao Wang, Zhihai Sui, Hai Wu, Baoli Zhu, Ye Deng, and Jie Feng. 2016. 'A Multiplayer Game: Species of Clostridium, Acinetobacter, and Pseudomonas Are Responsible for the Persistence of Antibiotic Resistance Genes in Manure-Treated Soils'. *Environmental Microbiology* 18 (10): 3494–3508. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13337>.
- Lecomte, Vivien, Joan Artigas, Chloé Bonnineau, Elodie BreLOT, Christophe Dagot, Didier Hocquet, Jérôme Labanowski, et al. 2023. 'Contamination Des Milieux Aquatiques Par Les Résidus de Médicaments : Exposition, Risques Écotoxicologiques, Antibiorésistance et Leviers d'actions'. *Environnement, Risques & Santé* 22 (5): 359–75. <https://doi.org/10.1684/ers.2023.1754>.
- Lee, Jangwoo, Jong Hun Jeon, Jingyeong Shin, Hyun Min Jang, Sungpyo Kim, Myoung Seok Song, and Young Mo Kim. 2017. 'Quantitative and Qualitative Changes in Antibiotic Resistance Genes after Passing through Treatment Processes in Municipal Wastewater Treatment Plants'. *Science of The Total Environment* 605–606 (December): 906–14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.250>.
- Lee, Shinyoung, Peixin Fan, Ting Liu, Anni Yang, Raoul K. Boughton, Kim M. Pepin, Ryan S. Miller, and Kwangcheol Casey Jeong. 2022. 'Transmission of Antibiotic Resistance at the Wildlife-Livestock Interface'. *Communications Biology* 5 (June): 585. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03520-8>.
- Leonard, Anne F. C., Lihong Zhang, Andrew J. Balfour, Ruth Garside, Peter M. Hawkey, Aimee K. Murray, Obioha C. Ukoumunne, and William H. Gaze. 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 (May): 326–33. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.003>.
- Lepper, Hannah C., Meghan R. Perry, Bryan A. Wee, David Wills, Hanne Nielsen, Saria Otani, Moray Simon, Frank M. Aarestrup, Mark E. J. Woolhouse, and Bram A. D. van Bunnik. 2023. 'Distinctive Hospital and Community Resistomes in Scottish Urban Wastewater: Metagenomics of a Paired Wastewater Sampling Design'. *Science of The Total Environment* 902 (December): 165978. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165978>.
- Ley, Ruth E. 2016. 'Prevotella in the Gut: Choose Carefully'. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13 (2): 69–70. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.4>.
- Li, Juan, Thanh Wang, Bing Shao, Jianzhong Shen, Shaochen Wang, and Yongning Wu. 2012. 'Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes and Antibiotic Residues in Wastewater and Soil Adjacent to Swine Feedlots: Potential Transfer to Agricultural Lands'. *Environmental Health Perspectives* 120 (8): 1144–49. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104776>.
- Li, Li-Guan, Qi Huang, Xiaole Yin, and Tong Zhang. 2020. 'Source Tracking of Antibiotic Resistance Genes in the Environment — Challenges, Progress, and Prospects'. *Water Research* 185 (October): 116127. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116127>.
- Li, Yeqing Q, Yumeng M Xi, Zedong D Wang, Hanfang F Zeng, and Zhaoyu Han. 2020. 'Combined Signature of Rumen Microbiome and Metabolome in Dairy Cows with Different Feed Intake Levels'. *Journal of Animal Science* 98 (3): skaa070. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa070>.

Liguori, Krista, Ishi Keenum, Benjamin C. Davis, Jeanette Calarco, Erin Milligan, Valerie J. Harwood, and Amy Pruden. 2022. ‘Antimicrobial Resistance Monitoring of Water Environments: A Framework for Standardized Methods and Quality Control’. *Environmental Science & Technology* 56 (13): 9149–60. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08918>.

Lindim, C., J. van Gils, D. Georgieva, O. Mekenyan, and I. T. Cousins. 2016. ‘Evaluation of Human Pharmaceutical Emissions and Concentrations in Swedish River Basins’. *Science of The Total Environment* 572 (December): 508–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.074>.

Linzey, Donald, Joy Burroughs, Lisa Hudson, Michele Marini, John Robertson, Jamie Bacon, Mitzi Nagarkatti, and Prakash Nagarkatti. 2003. ‘Role of Environmental Pollutants on Immune Functions, Parasitic Infections and Limb Malformations in Marine Toads and Whistling Frogs from Bermuda’. *International Journal of Environmental Health Research* 13 (2): 125–48. <https://doi.org/10.1080/0960312031000098053>.

Liu, Yi-Yun, Yang Wang, Timothy R. Walsh, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohei Doi, et al. 2016. ‘Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study’. *The Lancet. Infectious Diseases* 16 (2): 161–68. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).

Lobanovska, Mariya, and Giulia Pilla. 2017. ‘Penicillin’s Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?’ *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (1): 135–45.

Lolić, Aleksandar, Paula Paíga, Lúcia H. M. L. M. Santos, Sandra Ramos, Manuela Correia, and Cristina Delerue-Matos. 2015. ‘Assessment of Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Pharmaceuticals in Seawaters of North of Portugal: Occurrence and Environmental Risk’. *Science of The Total Environment* 508 (March): 240–50. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.097>.

López-Serna, Rebeca, Mira Petrović, and Damià Barceló. 2011. ‘Development of a Fast Instrumental Method for the Analysis of Pharmaceuticals in Environmental and Wastewaters Based on Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)–Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)’. *Chemosphere* 85 (8): 1390–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.071>.

Lv, Min, Qian Sun, Anyi Hu, Liyuan Hou, Jiangwei Li, Xiang Cai, and Chang-Ping Yu. 2014. ‘Pharmaceuticals and Personal Care Products in a Mesoscale Subtropical Watershed and Their Application as Sewage Markers’. *Journal of Hazardous Materials* 280 (September): 696–705. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.054>.

Ma, Liping, Xu-Xiang Zhang, Fuzheng Zhao, Bing Wu, Shupeí Cheng, and Liuyan Yang. 2013. ‘Sewage Treatment Plant Serves as a Hot-Spot Reservoir of Integrins and Gene Cassettes’. *Journal of Environmental Biology* 34 (2 Spec No): 391–99.

Machowska, Anna, and Cecilia Stålsby Lundborg. 2019. ‘Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe’. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (1): 27. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010027>.

Magnano San Lio, Roberta, Giuliana Favara, Andrea Maugeri, Martina Barchitta, and Antonella Agodi. 2023. ‘How Antimicrobial Resistance Is Linked to Climate Change: An

Overview of Two Intertwined Global Challenges’. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20 (3): 1681. <https://doi.org/10.3390/ijerph20031681>.

Makowska, Nicoletta, Ryszard Koczura, and Joanna Mokracka. 2016. ‘Class 1 Integrase, Sulfonamide and Tetracycline Resistance Genes in Wastewater Treatment Plant and Surface Water’. *Chemosphere* 144 (February): 1665–73. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.044>.

Manaia, Célia M. 2017. ‘Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk’. *Trends in Microbiology* 25 (3): 173–81. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.014>.

Manaia, Célia M., Jaqueline Rocha, Nazareno Scaccia, Roberto Marano, Elena Radu, Francesco Biancullo, Francisco Cerqueira, et al. 2018. ‘Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants: Tackling the Black Box’. *Environment International* 115 (June): 312–24. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044>.

Markowicz, Anna, Kinga Bondarczuk, Mariusz Cycoń, and Sławomir Sułowicz. 2021. ‘Land Application of Sewage Sludge: Response of Soil Microbial Communities and Potential Spread of Antibiotic Resistance’. *Environmental Pollution* 271 (February): 116317. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116317>.

Marques, António, Maria Leonor Nunes, Stephanie K. Moore, and Mark S. Strom. 2010. ‘Climate Change and Seafood Safety: Human Health Implications’. *Food Research International, Climate Change and Food Science*, 43 (7): 1766–79. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.010>.

Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb, and J. Davies. 1998. ‘A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio Cholerae* Genome’. *Science (New York, N.Y.)* 280 (5363): 605–8. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.605>.

Mazel, Didier. 2006. ‘Integrans: Agents of Bacterial Evolution’. *Nature Reviews. Microbiology* 4 (8): 608–20. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1462>.

McDaniel, Lauren D., Elizabeth Young, Jennifer Delaney, Fabian Ruhnau, Kim B. Ritchie, and John H. Paul. 2010. ‘High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans’. *Science* 330 (6000): 50–50. <https://doi.org/10.1126/science.1192243>.

McEwen, Scott A., and Peter J. Collignon. 2018. ‘Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective’. *Microbiology Spectrum* 6 (2): 10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>.

McInnes, Ross S, Gregory E McCallum, Lisa E Lamberte, and Willem van Schaik. 2020. ‘Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in the Human Gut Microbiome’. *Current Opinion in Microbiology, Host-Microbe Interactions: Bacteria*, 53 (February): 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>.

Mehainaoui, A., T. Menasria, S. Benouagueni, M. Benhadj, R. Lalaoui, and D. Gacemi-Kirane. 2021. ‘Rapid Screening and Characterization of Bacteria Associated with Hospital Cockroaches (*Blattella Germanica* L.) Using MALDI-TOF Mass Spectrometry’. *Journal of Applied Microbiology* 130 (3): 960–70. <https://doi.org/10.1111/jam.14803>.

- Mendes Moreira, Ana, Elodie Couvé-Deacon, Pauline Bousquet, Delphine Chainier, Thomas Jové, Marie-Cécile Ploy, and Olivier Barraud. 2019. 'Proteae: A Reservoir of Class 2 Integrons?' *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74 (6): 1560–62. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz079>.
- Merlin, Christophe, and Ariane Toussaint. 1999. 'Les Éléments Transposables Bactériens.' *Medecine/ Sciences* 15 (September): I–XIII. <https://doi.org/10.4267/10608/1491>.
- Miller, J.H., J.T. Novak, W.R. Knocke, and A. Pruden. 2014. 'Elevation of Antibiotic Resistance Genes at Cold Temperatures: Implications for Winter Storage of Sludge and Biosolids'. *Letters in Applied Microbiology* 59 (6): 587–93. <https://doi.org/10.1111/lam.12325>.
- Miłobedzka, Aleksandra, Catarina Ferreira, Ivone Vaz-Moreira, David Calderón-Franco, Adrian Gorecki, Sabina Purkrtova, Jan Bartacek, et al. 2022. 'Monitoring Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Environments: The Challenges of Filling a Gap in the One-Health Cycle'. *Journal of Hazardous Materials* 424 (February): 127407. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127407>.
- Miquel, S., R. Martín, O. Rossi, L. G. Bermúdez-Humarán, J. M. Chatel, H. Sokol, M. Thomas, J. M. Wells, and P. Langella. 2013. 'Faecalibacterium Prausnitzii and Human Intestinal Health'. *Current Opinion in Microbiology* 16 (3): 255–61. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.003>.
- Mokracka, Joanna, Ryszard Koczura, and Adam Kaznowski. 2012. 'Multiresistant Enterobacteriaceae with Class 1 and Class 2 Integrons in a Municipal Wastewater Treatment Plant'. *Water Research* 46 (10): 3353–63. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.037>.
- Monahan, Ciaran, Rajat Nag, Dearbháile Morris, and Enda Cummins. 2021. 'Antibiotic Residues in the Aquatic Environment - Current Perspective and Risk Considerations'. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 56 (7): 733–51. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1923311>.
- Mooney, D., K. G. Richards, M. Danaher, J. Grant, L. Gill, P. -E. Mellander, and C. E. Coxon. 2021. 'An Analysis of the Spatio-Temporal Occurrence of Anthelmintic Veterinary Drug Residues in Groundwater'. *Science of The Total Environment* 769 (May): 144804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144804>.
- Moreno-González, R., S. Rodriguez-Mozaz, M. Gros, D. Barceló, and V. M. León. 2015. 'Seasonal Distribution of Pharmaceuticals in Marine Water and Sediment from a Mediterranean Coastal Lagoon (SE Spain)'. *Environmental Research* 138 (April): 326–44. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.016>.
- Moura, Alexandra, Carolina Pereira, Isabel Henriques, and António Correia. 2012. 'Novel Gene Cassettes and Integrons in Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Urban Wastewaters'. *Research in Microbiology* 163 (2): 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.10.010>.
- Mukerji, Shewli, Mark O'Dea, Mary Barton, Roy Kirkwood, Terence Lee, and Sam Abraham. 2017. 'Development and Transmission of Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacteria in Animals and Their Public Health Impact'. *Essays in Biochemistry* 61 (1): 23–35. <https://doi.org/10.1042/EBC20160055>.

- Munir, Mariya, Kelvin Wong, and Irene Xagorarakis. 2011. 'Release of Antibiotic Resistant Bacteria and Genes in the Effluent and Biosolids of Five Wastewater Utilities in Michigan'. *Water Research* 45 (2): 681–93. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.033>.
- Munk, Patrick, Christian Brinch, Frederik Duus Møller, Thomas N. Petersen, Rene S. Hendriksen, Anne Mette Seyfarth, Jette S. Kjeldgaard, et al. 2022. 'Genomic Analysis of Sewage from 101 Countries Reveals Global Landscape of Antimicrobial Resistance'. *Nature Communications* 13 (December): 7251. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34312-7>.
- Munk, Patrick, Berith Elkær Knudsen, Oksana Lukjancenko, Ana Sofia Ribeiro Duarte, Liese Van Gompel, Roosmarijn E. C. Luiken, Lidwien A. M. Smit, et al. 2018. 'Abundance and Diversity of the Faecal Resistome in Slaughter Pigs and Broilers in Nine European Countries'. *Nature Microbiology* 3 (8): 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9>.
- Munoz-Price, L. Silvia, Laurent Poirel, Robert A. Bonomo, Mitchell J. Schwaber, George L. Daikos, Martin Cormican, Giuseppe Cornaglia, et al. 2013. 'Clinical Epidemiology of the Global Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases'. *The Lancet. Infectious Diseases* 13 (9): 785–96. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).
- Murray, Christopher J. L., Kevin Shunji Ikuta, Fablina Sharara, Lucien Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Authia Gray, Chieh Han, et al. 2022. 'Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis'. *The Lancet* 399 (10325): 629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- Nakata, K., T. Tsuchido, and Y. Matsumura. 2011. 'Antimicrobial Cationic Surfactant, Cetyltrimethylammonium Bromide, Induces Superoxide Stress in *Escherichia coli* Cells'. *Journal of Applied Microbiology* 110 (2): 568–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04912.x>.
- Nguyen, Anh Q., Hang P. Vu, Luong N. Nguyen, Qilin Wang, Steven P. Djordjevic, Erica Donner, Huabing Yin, and Long D. Nghiem. 2021. 'Monitoring Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment: Current Strategies and Future Challenges'. *Science of The Total Environment* 783 (August): 146964. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146964>.
- Nicolas, Emilien, Michael Lambin, Damien Dandoy, Christine Galloy, Nathan Nguyen, Cédric A. Oger, and Bernard Hallet. 2015. 'The Tn3-Family of Replicative Transposons'. *Microbiology Spectrum* 3 (4): 10.1128/microbiolspec.mdna3-0060-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0060-2014>.
- Nielsen, Marisa C., Nan Wang, and Sunny C. Jiang. 2021. 'Acquisition of Antibiotic Resistance Genes on Human Skin after Swimming in the Ocean'. *Environmental Research* 197 (June): 110978. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110978>.
- Niu, Lili, Weiping Liu, Albert Juhasz, Jun Chen, and Lena Ma. 2022. 'Emerging Contaminants Antibiotic Resistance Genes and Microplastics in the Environment: Introduction to 21 Review Articles Published in CREST during 2018–2022'. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 52 (23): 4135–46. <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2117847>.
- Nnorom, Mac-Anthony, Devendra Saroj, Lisa Avery, Rupert Hough, and Bing Guo. 2023. 'A Review of the Impact of Conductive Materials on Antibiotic Resistance Genes during the Anaerobic Digestion of Sewage Sludge and Animal Manure'. *Journal of Hazardous Materials* 446 (March): 130628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130628>.

- Nordahl Petersen, Thomas, Simon Rasmussen, Henrik Hasman, Christian Carøe, Jacob Bælum, Anna Charlotte Schultz, Lasse Bergmark, et al. 2015. ‘Meta-Genomic Analysis of Toilet Waste from Long Distance Flights; a Step towards Global Surveillance of Infectious Diseases and Antimicrobial Resistance’. *Scientific Reports* 5 (1): 11444. <https://doi.org/10.1038/srep11444>.
- Novick, R.P. 1987. ‘Plasmid Incompatibility’. *Microbiological Reviews* 51 (4): 381–95. <https://doi.org/10.1128/membr.51.4.381-395.1987>.
- Noyes, Noelle R, Xiang Yang, Lyndsey M Linke, Roberta J Magnuson, Adam Dettenwanger, Shaun Cook, Ifigenia Geornaras, et al. 2016. ‘Resistome Diversity in Cattle and the Environment Decreases during Beef Production’. Edited by Ben Cooper. *eLife* 5 (March): e13195. <https://doi.org/10.7554/eLife.13195>.
- Oh, Su Jin, Jeongim Park, Min Jung Lee, So Young Park, Jong-Hyeon Lee, and Kyungho Choi. 2006. ‘Ecological Hazard Assessment of Major Veterinary Benzimidazoles: Acute and Chronic Toxicities to Aquatic Microbes and Invertebrates’. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (8): 2221–26. <https://doi.org/10.1897/05-493r.1>.
- Omuferen, Loveth Oke, B. Maseko, and J. O. Olowoyo. 2022. ‘Occurrence of Antibiotics in Wastewater from Hospital and Convectional Wastewater Treatment Plants and Their Impact on the Effluent Receiving Rivers: Current Knowledge between 2010 and 2019’. *Environmental Monitoring and Assessment* 194 (4): 306. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09846-4>.
- O’Neill, Jim. 2016. ‘Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations’. Report. Government of the United Kingdom. United Kingdom. <https://apo.org.au/node/63983>.
- Opatowski, Lulla, Didier Guillemot, Pierre-Yves Boëlle, and Laura Temime. 2011. ‘Contribution of Mathematical Modeling to the Fight against Bacterial Antibiotic Resistance’. *Current Opinion in Infectious Diseases* 24 (3): 279–87. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283462362>.
- Orias, Frédéric, and Yves Perrodin. 2013. ‘Characterisation of the Ecotoxicity of Hospital Effluents: A Review’. *Science of The Total Environment* 454–455 (June): 250–76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.064>.
- Ostholm-Balkhed, Ase, Maria Tärnberg, Maud Nilsson, Lennart E. Nilsson, Håkan Hanberger, Anita Hällgren, and Travel Study Group of Southeast Sweden. 2013. ‘Travel-Associated Faecal Colonization with ESBL-Producing Enterobacteriaceae: Incidence and Risk Factors’. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (9): 2144–53. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt167>.
- Paíga, Paula, Lúcia H. M. L. M. Santos, Sandra Ramos, Sandra Jorge, Jaime Gabriel Silva, and Cristina Delerue-Matos. 2016. ‘Presence of Pharmaceuticals in the Lis River (Portugal): Sources, Fate and Seasonal Variation’. *Science of The Total Environment* 573 (December): 164–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.089>.
- Pal, Chandan, Johan Bengtsson-Palme, Erik Kristiansson, and D. G. Joakim Larsson. 2015. ‘Co-Occurrence of Resistance Genes to Antibiotics, Biocides and Metals Reveals Novel Insights into Their Co-Selection Potential’. *BMC Genomics* 16 (1): 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>.



Pal, Chandan, Johan Bengtsson-Palme, Erik Kristiansson, and D. G. Joakim Larsson. 2016. 'The Structure and Diversity of Human, Animal and Environmental Resistomes'. *Microbiome* 4 (1): 54. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0199-5>.

Palacios, Oskar A., Jaime Raúl Adame-Gallegos, Blanca Estela Rivera-Chavira, and Guadalupe Virginia Nevarez-Moorillon. 2021. 'Antibiotics, Multidrug-Resistant Bacteria, and Antibiotic Resistance Genes: Indicators of Contamination in Mangroves?' *Antibiotics* 10 (9): 1103. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091103>.

Pallares-Vega, Rebeca, Hetty Blaak, Rozemarijn van der Plaats, Ana M. de Roda Husman, Lucia Hernandez Leal, Mark C. M. van Loosdrecht, David G. Weissbrodt, and Heike Schmitt. 2019. 'Determinants of Presence and Removal of Antibiotic Resistance Genes during WWTP Treatment: A Cross-Sectional Study'. *Water Research* 161 (September): 319–28. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.100>.

Palm, Gottfried J., Thomas Lederer, Peter Orth, Wolfram Saenger, Masayuki Takahashi, Wolfgang Hillen, and Winfried Hinrichs. 2008. 'Specific Binding of Divalent Metal Ions to Tetracycline and to the Tet Repressor/Tetracycline Complex'. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13 (7): 1097–1110. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0395-2>.

Panel (OHHLEP), One Health High-Level Expert, Wiku B. Adisasmito, Salama Almuhairi, Casey Barton Behravesh, Pépé Bilivogui, Salome A. Bukachi, Natalia Casas, et al. 2022. 'One Health: A New Definition for a Sustainable and Healthy Future'. *PLOS Pathogens* 18 (6): e1010537. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010537>.

Papageorgiou, Myrsini, Christina Kosma, and Dimitra Lambropoulou. 2016. 'Seasonal Occurrence, Removal, Mass Loading and Environmental Risk Assessment of 55 Pharmaceuticals and Personal Care Products in a Municipal Wastewater Treatment Plant in Central Greece'. *Science of The Total Environment* 543 (February): 547–69. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.047>.

Pärnänen, Katariina M. M., Carlos Narciso-da-Rocha, David Kneis, Thomas U. Berendonk, Damiano Cacace, Thi Thuy Do, Christian Elpers, et al. 2019. 'Antibiotic Resistance in European Wastewater Treatment Plants Mirrors the Pattern of Clinical Antibiotic Resistance Prevalence'. *Science Advances* 5 (3): eaau9124. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>.

Partridge, Sally R., Stephen M. Kwong, Neville Firth, and Slade O. Jensen. 2018. 'Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance'. *Clinical Microbiology Reviews* 31 (4): 10.1128/cmr.00088-17. <https://doi.org/10.1128/cmr.00088-17>.

Patel, Manvendra, Rahul Kumar, Kamal Kishor, Todd Mlsna, Charles U. Jr. Pittman, and Dinesh Mohan. 2019. 'Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods'. *Chemical Reviews* 119 (6): 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>.

Pazda, Magdalena, Jolanta Kumirska, Piotr Stepnowski, and Ewa Mulkiewicz. 2019. 'Antibiotic Resistance Genes Identified in Wastewater Treatment Plant Systems – A Review'. *Science of The Total Environment* 697 (December): 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>.

- Peirano, Gisele, Kevin B. Laupland, Daniel B. Gregson, and Johann D. D. Pitout. 2011. 'Colonization of Returning Travelers with CTX-M-Producing Escherichia Coli'. *Journal of Travel Medicine* 18 (5): 299–303. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2011.00548.x>.
- Perron, Karl, Olivier Caille, Claude Rossier, Christian Van Delden, Jean-Luc Dumas, and Thilo Köhler. 2004. 'CzcR-CzcS, a Two-Component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in Pseudomonas Aeruginosa'. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (10): 8761–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312080200>.
- Petrović, Mira, Biljana Škrbić, Jelena Živančev, Laura Ferrando-Climent, and Damia Barcelo. 2014. 'Determination of 81 Pharmaceutical Drugs by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry with Hybrid Triple Quadrupole–Linear Ion Trap in Different Types of Water in Serbia'. *Science of The Total Environment* 468–469 (January): 415–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.079>.
- Pinnell, Lee J., Grace Kuiper, Kate L. Huebner, Enrique Doster, Jennifer K. Parker, Najla Alekozai, Jenny G. Powers, Rick L. Wallen, Keith E. Belk, and Paul S. Morley. 2023. 'More than an Anthropogenic Phenomenon: Antimicrobial Resistance in Ungulates from Natural and Agricultural Environments'. *Science of The Total Environment* 858 (February): 159789. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159789>.
- Piquer-Esteban, Samuel, Susana Ruiz-Ruiz, Vicente Arnau, Wladimiro Diaz, and Andrés Moya. 2021. 'Exploring the Universal Healthy Human Gut Microbiota around the World'. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 20 (December): 421–33. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.035>.
- Pokharel, Sunil, Shristi Raut, and Bipin Adhikari. 2019. 'Tackling Antimicrobial Resistance in Low-Income and Middle-Income Countries'. *BMJ Global Health* 4 (6): e002104. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-002104>.
- Port, Jesse A., James C. Wallace, William C. Griffith, and Elaine M. Faustman. 2012. 'Metagenomic Profiling of Microbial Composition and Antibiotic Resistance Determinants in Puget Sound'. *PLoS ONE* 7 (10): e48000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048000>.
- Porto, Rafael Silveira, Caio Rodrigues-Silva, Jerusa Schneider, and Susanne Rath. 2019. 'Benzimidazoles in Wastewater: Analytical Method Development, Monitoring and Degradation by Photolysis and Ozonation'. *Journal of Environmental Management* 232 (February): 729–37. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.121>.
- Pruden, Amy, Mazdak Arabi, and Heather N. Storteboom. 2012. 'Correlation Between Upstream Human Activities and Riverine Antibiotic Resistance Genes'. *Environmental Science & Technology* 46 (21): 11541–49. <https://doi.org/10.1021/es302657r>.
- Puckowski, Alan, Stefan Stolte, Marta Wagil, Marta Markiewicz, Paulina Łukaszewicz, Piotr Stepnowski, and Anna Białk-Bielińska. 2017. 'Mixture Toxicity of Flubendazole and Fenbendazole to *Daphnia Magna*'. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Special Issue: Eighth PhD students workshop: Water and Health – Cannes 2016, 220 (3): 575–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.01.011>.
- Qian, Xun, Santosh Gunturu, Jiarong Guo, Benli Chai, James R. Cole, Jie Gu, and James M. Tiedje. 2021. 'Metagenomic Analysis Reveals the Shared and Distinct Features of the Soil

Resistome across Tundra, Temperate Prairie, and Tropical Ecosystems'. *Microbiome* 9 (May): 108. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01047-4>.

Quintela-Baluja, Marcos, M. Abouelnaga, Jesus Romalde, Jian-Qiang Su, Yongjie Yu, Mariano Gomez-Lopez, Barth Smets, Yong-Guan Zhu, and David W. Graham. 2019. 'Spatial Ecology of a Wastewater Network Defines the Antibiotic Resistance Genes in Downstream Receiving Waters'. *Water Research* 162 (October): 347–57. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.075>.

Rafraf, Ikbel Denden, Itziar Lekunberri, Alexandre Sánchez-Melsió, Mahjoub Aouni, Carles M. Borrego, and José Luis Balcázar. 2016. 'Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Five Municipal Wastewater Treatment Plants in the Monastir Governorate, Tunisia'. *Environmental Pollution* 219 (December): 353–58. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.062>.

Rahbe, Eve, Laurence Watier, Didier Guillemot, Philippe Glaser, and Lulla Opatowski. 2023. 'Determinants of Worldwide Antibiotic Resistance Dynamics across Drug-Bacterium Pairs: A Multivariable Spatial-Temporal Analysis Using ATLAS'. *The Lancet Planetary Health* 7 (7): e547–57. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00127-4).

Ramirez, María Soledad, Nikolas Nikolaidis, and Marcelo Tolmasky. 2013. 'Rise and Dissemination of Aminoglycoside Resistance: The Aac(6')-Ib Paradigm'. *Frontiers in Microbiology* 4. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2013.00121>.

Razavi, Mohammad, Erik Kristiansson, Carl-Fredrik Flach, and D. G. Joakim Larsson. 2020. 'The Association between Insertion Sequences and Antibiotic Resistance Genes'. *mSphere* 5 (5): 10.1128/msphere.00418-20. <https://doi.org/10.1128/msphere.00418-20>.

Redgrave, Liam S., Sam B. Sutton, Mark A. Webber, and Laura J. V. Piddock. 2014. 'Fluoroquinolone Resistance: Mechanisms, Impact on Bacteria, and Role in Evolutionary Success'. *Trends in Microbiology* 22 (8): 438–45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.

Reygaert, Wanda C. 2018. 'An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria'. *AIMS Microbiology* 4 (3): 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.

Reynaga, Esteban, Marian Navarro, Anna Vilamala, Pere Roure, Manuel Quintana, Marian Garcia-Nuñez, Raül Figueras, Carmen Torres, Gianni Lucchetti, and Miquel Sabrià. 2016. 'Prevalence of Colonization by Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus ST398 in Pigs and Pig Farm Workers in an Area of Catalonia, Spain'. *BMC Infectious Diseases* 16 (1): 716. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2050-9>.

Reza, R., and G. Singh. 2010. 'Heavy Metal Contamination and Its Indexing Approach for River Water'. *International Journal of Environmental Science & Technology* 7 (4): 785–92. <https://doi.org/10.1007/BF03326187>.

Riber, Leise, Pernille H.B. Poulsen, Waleed A. Al-Soud, Lea B. Skov Hansen, Lasse Bergmark, Asker Brejnrod, Anders Norman, Lars H. Hansen, Jakob Magid, and Søren J. Sørensen. 2014. 'Exploring the Immediate and Long-Term Impact on Bacterial Communities in Soil Amended with Animal and Urban Organic Waste Fertilizers Using Pyrosequencing and Screening for Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance'. *FEMS Microbiology Ecology* 90 (1): 206–24. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12403>.

Rizvi, Sidra Ghazali, and Shaikh Ziauddin Ahammad. 2022. 'COVID-19 and Antimicrobial Resistance: A Cross-Study'. *The Science of the Total Environment* 807 (February): 150873. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150873>.

Rodriguez-Mozaz, Sara, Sara Chamorro, Elisabet Marti, Belinda Huerta, Meritxell Gros, Alexandre Sànchez-Melsió, Carles M. Borrego, Damià Barceló, and Jose Luis Balcázar. 2015. 'Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Hospital and Urban Wastewaters and Their Impact on the Receiving River'. *Water Research* 69 (February): 234–42. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>.

Roman, Véronica L., Christophe Merlin, Marko P. J. Virta, and Xavier Bellanger. 2021. 'EpicPCR 2.0: Technical and Methodological Improvement of a Cutting-Edge Single-Cell Genomic Approach'. *Microorganisms* 9 (8): 1649. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081649>.

Rosewarne, Carly P., Vincent Pettigrove, Hatch W. Stokes, and Yvonne M. Parsons. 2010. 'Class 1 Integrons in Benthic Bacterial Communities: Abundance, Association with Tn402-like Transposition Modules and Evidence for Coselection with Heavy-Metal Resistance'. *FEMS Microbiology Ecology* 72 (1): 35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00823.x>.

Rousham, Emily K., Leanne Unicomb, and Mohammad Aminul Islam. 2018. 'Human, Animal and Environmental Contributors to Antibiotic Resistance in Low-Resource Settings: Integrating Behavioural, Epidemiological and One Health Approaches'. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285 (1876): 20180332. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>.

Rozwandowicz, M, M S M Brouwer, J Fischer, J A Wagenaar, B Gonzalez-Zorn, B Guerra, D J Mevius, and J Hordijk. 2018. 'Plasmids Carrying Antimicrobial Resistance Genes in Enterobacteriaceae'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (5): 1121–37. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>.

Sabri, N. A., S. van Holst, H. Schmitt, B. M. van der Zaan, H. W. Gerritsen, H. H. M. Rijnaarts, and A. A. M. Langenhoff. 2020. 'Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes during Conventional and Additional Treatment Technologies in Wastewater Treatment Plants'. *Science of The Total Environment* 741 (November): 140199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140199>.

Sadikalay, Syndia. 2018. 'Influence Des Rejets Humains et Animaux Sur La Diffusion de l'antibiorésistance à l'homme, Aux Animaux et à l'environnement En Guadeloupe'. These de doctorat, Antilles. <https://www.theses.fr/2018ANTI0251>.

Salam, Md. Abdus, Md. Yusuf Al-Amin, Moushumi Tabassoom Salam, Jogendra Singh Pawar, Naseem Akhter, Ali A. Rabaan, and Mohammed A. A. Alqumber. 2023. 'Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health'. *Healthcare* 11 (13): 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>.

Sanseverino, I., Navarro Cuenca, A., Loos, R., Marinov, D. and Lettieri, T., State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance, EUR 29592 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79-98479-2, doi:10.2760/82376, JRC114775.

Santé Publique France. 2022a. Consommation d'antibiotiques et prévention de l'antibiorésistance en France en 2021 : où en sommes-nous ?. Available from:

<https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2022/consommation-d-antibiotiques-et-prevention-de-l-antibioresistance-en-france-en-2021-ou-en-sommes-nous>. [Accessed Feb 15, 2024]

Santé Publique France. 2022b. Surveillance de la consommation des antibiotiques et des résistances bactériennes en établissement de Santé. Mission Spares. Résultats synthétiques, année 2022. Accessible from: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/documents/enquetes-etudes/surveillance-de-la-consommation-des-antibiotiques-et-des-resistances-bacteriennes-en-etablissement-de-sante.-mission-spares.-resultats-synthetiques>. [Accessed Feb 15, 2024]

Santé Publique France. 2017. Consommation d'antibiotiques et antibiorésistance en France en 2017. Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2018/consommation-d-antibiotiques-et-antibioresistance-en-france-en-2017>. [Accessed Feb 15, 2024]

Santos, Lúcia H. M. L. M., Meritxell Gros, Sara Rodriguez-Mozaz, Cristina Delerue-Matos, Angelina Pena, Damià Barceló, and M. Conceição B. S. M. Montenegro. 2013. 'Contribution of Hospital Effluents to the Load of Pharmaceuticals in Urban Wastewaters: Identification of Ecologically Relevant Pharmaceuticals'. *Science of The Total Environment* 461–462 (September): 302–16. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>.

Schultsz, Constance, and Suzanne Geerlings. 2012. 'Plasmid-Mediated Resistance in Enterobacteriaceae: Changing Landscape and Implications for Therapy'. *Drugs* 72 (1): 1–16. <https://doi.org/10.2165/11597960-000000000-00000>.

Schwartz, Kevin L., and Shaun K. Morris. 2018. 'Travel and the Spread of Drug-Resistant Bacteria'. *Current Infectious Disease Reports* 20 (9): 29. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0634-9>.

Seiler, Claudia, and Thomas Berendonk. 2012. 'Heavy Metal Driven Co-Selection of Antibiotic Resistance in Soil and Water Bodies Impacted by Agriculture and Aquaculture'. *Frontiers in Microbiology* 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00399>.

Shin, Seung Won, Min Kyoung Shin, Myunghwan Jung, Kuastros Mekonnen Belaynehe, and Han Sang Yoo. 2015. 'Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in Escherichia Coli Isolates from Beef Cattle'. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (16): 5560–66. <https://doi.org/10.1128/AEM.01511-15>.

Shintani, Masaki, Zoe K. Sanchez, and Kazuhide Kimbara. 2015. 'Genomics of Microbial Plasmids: Classification and Identification Based on Replication and Transfer Systems and Host Taxonomy'. *Frontiers in Microbiology* 6 (March): 242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>.

Siguié, Patricia, Edith Gourbeyre, Alessandro Varani, Bao Ton-Hoang, and Mick Chandler. 2015. 'Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences'. *Microbiology Spectrum* 3 (2): 10.1128/microbiolspec.mdna3-0030–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0030-2014>.

Sim, Won-Jin, Hee-Young Kim, Sung-Deuk Choi, Jung-Hwan Kwon, and Jeong-Eun Oh. 2013. 'Evaluation of Pharmaceuticals and Personal Care Products with Emphasis on

Anthelmintics in Human Sanitary Waste, Sewage, Hospital Wastewater, Livestock Wastewater and Receiving Water'. *Journal of Hazardous Materials* 248–249 (March): 219–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.007>.

Šíma, Jan, Lubomír Svoboda, Martin Šeda, Jiří Krejsa, and Jana Jahodová. 2019. 'The Fate of Selected Heavy Metals and Arsenic in a Constructed Wetland'. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 54 (1): 56–64. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1515519>.

Sims, Natalie, Andrew Kannan, Elizabeth Holton, Kishore Jagadeesan, Leonardos Mageiros, Richard Standerwick, Tim Craft, Ruth Barden, Edward J. Feil, and Barbara Kasprzyk-Hordern. 2023. 'Antimicrobials and Antimicrobial Resistance Genes in a One-Year City Metabolism Longitudinal Study Using Wastewater-Based Epidemiology'. *Environmental Pollution* 333 (September): 122020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122020>.

Singer, Andrew C., Helen Shaw, Vicki Rhodes, and Alwyn Hart. 2016. 'Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators'. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01728>.

Sjölund, Maria, Jonas Bonnedahl, Jorge Hernandez, Stina Bengtsson, Gunilla Cederbrant, Jarone Pinhassi, Gunnar Kahlmeter, and Björn Olsen. 2008. 'Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic'. *Emerging Infectious Diseases* 14 (1): 70–72. <https://doi.org/10.3201/eid1401.070704>.

Song, Se Jin, Christian Lauber, Elizabeth K Costello, Catherine A Lozupone, Gregory Humphrey, Donna Berg-Lyons, J Gregory Caporaso, et al. 2013. 'Cohabiting Family Members Share Microbiota with One Another and with Their Dogs'. *eLife* 2 (April): e00458. <https://doi.org/10.7554/eLife.00458>.

Song, Xiaowei, Jingwei Zhang, Jinghan Song, and Yuanyuan Zhai. 2021. 'Decisive Effects of Life Stage on the Gut Microbiota Discrepancy Between Two Wild Populations of Hibernating Asiatic Toads (*Bufo Gargarizans*)'. *Frontiers in Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665849>.

Soucy, Shannon M., Jinling Huang, and Johann Peter Gogarten. 2015. 'Horizontal Gene Transfer: Building the Web of Life'. *Nature Reviews Genetics* 16 (8): 472–82. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>.

Stalder, Thibault. 2012. 'Implication Des Effluents d'activités Hospitalières et de La Filière Carnée Sur La Dissémination de l'antibiorésistance : Dynamique Des Intégrons de l'émission Au Rejet'. These de doctorat, Limoges. <https://www.theses.fr/2012LIMO4031>.

Subedi, Bikram, Keshava Balakrishna, Derrick Ian Joshua, and Kurunthachalam Kannan. 2017a. 'Mass Loading and Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products Including Psychoactives, Antihypertensives, and Antibiotics in Two Sewage Treatment Plants in Southern India'. *Chemosphere* 167 (January): 429–37. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.026>.

Subedi, Bikram, Keshava Balakrishna, Ravindra K. Sinha, Nobuyoshi Yamashita, Vellingiri G. Balasubramanian, and Kurunthachalam Kannan. 2015. 'Mass Loading and Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products, Including Psychoactive and Illicit Drugs and

Artificial Sweeteners, in Five Sewage Treatment Plants in India'. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3 (4, Part A): 2882–91. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.09.031>.

Subedi, Bikram, Neculai Codru, David M. Dziewulski, Lloyd R. Wilson, Jingchuan Xue, Sehun Yun, Ellen Braun-Howland, Christine Minihane, and Kurunthachalam Kannan. 2015. 'A Pilot Study on the Assessment of Trace Organic Contaminants Including Pharmaceuticals and Personal Care Products from On-Site Wastewater Treatment Systems along Skaneateles Lake in New York State, USA'. *Water Research*, Occurrence, fate, removal and assessment of emerging contaminants in water in the water cycle (from wastewater to drinking water), 72 (April): 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.049>.

Suda, Katie J., Lauri A. Hicks, Rebecca M. Roberts, Robert J. Hunkler, and Thomas H. Taylor. 2014. 'Trends and Seasonal Variation in Outpatient Antibiotic Prescription Rates in the United States, 2006 to 2010'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (5): 2763–66. <https://doi.org/10.1128/AAC.02239-13>.

Sulayyim, Hadi Jaber Al, Rohani Ismail, Abdullah Al Hamid, and Noraini Abdul Ghafar. 2022. 'Antibiotic Resistance during COVID-19: A Systematic Review'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (19): 11931. <https://doi.org/10.3390/ijerph191911931>.

Sulis, Giorgia, Sena Sayood, and Sumanth Gandra. 2022. 'Antimicrobial Resistance in Low- and Middle-Income Countries: Current Status and Future Directions'. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 20 (2): 147–60. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1951705>.

Sun, Jian, Xiao-Ping Liao, Alaric W. D'Souza, Manish Boolchandani, Sheng-Hui Li, Ke Cheng, José Luis Martínez, et al. 2020. 'Environmental Remodeling of Human Gut Microbiota and Antibiotic Resistome in Livestock Farms'. *Nature Communications* 11 (March): 1427. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15222-y>.

Sun, Lova, Eili Y. Klein, and Ramanan Laxminarayan. 2012. 'Seasonality and Temporal Correlation between Community Antibiotic Use and Resistance in the United States'. *Clinical Infectious Diseases* 55 (5): 687–94. <https://doi.org/10.1093/cid/cis509>.

Swift, Benjamin M. C., Malcolm Bennett, Katie Waller, Christine Dodd, Annie Murray, Rachel L. Gomes, Bethan Humphreys, et al. 2019. 'Anthropogenic Environmental Drivers of Antimicrobial Resistance in Wildlife'. *The Science of the Total Environment* 649 (February): 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.180>.

Tang, Ka Wah Kelly, Beverley C. Millar, and John E. Moore. 2023. 'Antimicrobial Resistance (AMR)'. *British Journal of Biomedical Science* 80 (June): 11387. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>.

Tang, Xianjin, Chenlu Lou, Shaoxian Wang, Yanhong Lu, Ming Liu, Muhammad Z. Hashmi, Xinqiang Liang, et al. 2015. 'Effects of Long-Term Manure Applications on the Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Paddy Soils: Evidence from Four Field Experiments in South of China'. *Soil Biology and Biochemistry* 90 (November): 179–87. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.027>.

Tängdén, Thomas, Otto Cars, Asa Melhus, and Elisabeth Löwdin. 2010. 'Foreign Travel Is a Major Risk Factor for Colonization with Escherichia Coli Producing CTX-M-Type Extended-

- Spectrum Beta-Lactamases: A Prospective Study with Swedish Volunteers'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (9): 3564–68. <https://doi.org/10.1128/AAC.00220-10>.
- Tatum, E. L., and Joshua Lederberg. 1947. 'Gene Recombination in the Bacterium Escherichia Coli'. *Journal of Bacteriology* 53 (6): 673–84.
- Tezel, Ulas, and Spyros G Pavlostathis. 2015. 'Quaternary Ammonium Disinfectants: Microbial Adaptation, Degradation and Ecology'. *Current Opinion in Biotechnology, Environmental biotechnology • Energy biotechnology*, 33 (June): 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>.
- Tham, Johan, Inga Odenholt, Mats Walder, Alma Brolund, Jonas Ahl, and Eva Melander. 2010. 'Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Patients with Travellers' Diarrhoea'. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 42 (4): 275–80. <https://doi.org/10.3109/00365540903493715>.
- Tiwari, Ananda, Paula Kurittu, Ahmad I. Al-Mustapha, Viivi Heljanko, Venla Johansson, Ocean Thakali, Shyam Kumar Mishra, et al. 2022. 'Wastewater Surveillance of Antibiotic-Resistant Bacterial Pathogens: A Systematic Review'. *Frontiers in Microbiology* 13 (December): 977106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.977106>.
- Tiwari, Ananda, Jaana Paakkanen, Monica Österblad, Juha Kirveskari, Rene S. Hendriksen, and Annamari Heikinheimo. 2022. 'Wastewater Surveillance Detected Carbapenemase Enzymes in Clinically Relevant Gram-Negative Bacteria in Helsinki, Finland; 2011–2012'. *Frontiers in Microbiology* 13. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.887888>.
- Tran, Ngoc Han, Taro Urase, and Thi Thao Ta. 2014. 'A Preliminary Study on the Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in Hospital Wastewater and Surface Water in Hanoi, Vietnam'. *CLEAN – Soil, Air, Water* 42 (3): 267–75. <https://doi.org/10.1002/clen.201300021>.
- Trevizani, Tailisi Hoppe, Camila Domit, Marcos César de Oliveira Santos, and Rubens Cesar Lopes Figueira. 2023. 'Bioaccumulation of Heavy Metals in Estuaries in the Southwest Atlantic Ocean'. *Environmental Science and Pollution Research* 30 (10): 26703–17. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23974-x>.
- Turgut, C. 2003. 'The Contamination with Organochlorine Pesticides and Heavy Metals in Surface Water in Küçük Menderes River in Turkey, 2000–2002'. *Environment International* 29 (1): 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00127-7).
- Ullah, Riaz, Muhammad Yasir, Fehmida Bibi, Turki S. Abujamel, Anwar M. Hashem, Sayed Sartaj Sohrab, Ahmed Al-Ansari, et al. 2019. 'Taxonomic Diversity of Antimicrobial-Resistant Bacteria and Genes in the Red Sea Coast'. *Science of The Total Environment* 677 (August): 474–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.283>.
- Urrea, Julen, Itziar Alkorta, Iker Mijangos, Lur Epelde, and Carlos Garbisu. 2019. 'Application of Sewage Sludge to Agricultural Soil Increases the Abundance of Antibiotic Resistance Genes without Altering the Composition of Prokaryotic Communities'. *Science of The Total Environment* 647 (January): 1410–20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.092>.
- Vali, Leila, Ali A. Dashti, Febine Mathew, and Edet E. Udo. 2017. 'Characterization of Heterogeneous MRSA and MSSA with Reduced Susceptibility to Chlorhexidine in Kuwait



Hospitals'. *Frontiers in Microbiology* 8 (July): 1359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01359>.

Van Boeckel, Thomas P., Charles Brower, Marius Gilbert, Bryan T. Grenfell, Simon A. Levin, Timothy P. Robinson, Aude Teillant, and Ramanan Laxminarayan. 2015. 'Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (18): 5649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.

Van Gompel, Liese, Roosmarijn E. C. Luiken, Rasmus B. Hansen, Patrick Munk, Martijn Bouwknegt, Lourens Heres, Gerdit D. Greve, et al. 2020. 'Description and Determinants of the Faecal Resistome and Microbiome of Farmers and Slaughterhouse Workers: A Metagenome-Wide Cross-Sectional Study'. *Environment International* 143 (October): 105939. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105939>.

Varani, Alessandro, Susu He, Patricia Siguier, Karen Ross, and Michael Chandler. 2021. 'The IS6 Family, a Clinically Important Group of Insertion Sequences Including IS26'. *Mobile DNA* 12 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/s13100-021-00239-x>.

Varela, Ana Rita, Sandra André, Olga C. Nunes, and Célia M. Manaia. 2014. 'Insights into the Relationship between Antimicrobial Residues and Bacterial Populations in a Hospital-Urban Wastewater Treatment Plant System'. *Water Research* 54 (May): 327–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.003>.

Vasconcelos, Diana S., D. James Harris, Isabel Damas-Moreira, Ana Pereira, and Raquel Xavier. 2023. 'Factors Shaping the Gut Microbiome of Five Species of Lizards from Different Habitats'. *PeerJ* 11. <https://doi.org/10.7717/peerj.15146>.

Vikram, Amit, Pablo Rovira, Getahun E. Agga, Terrance M. Arthur, Joseph M. Bosilevac, Tommy L. Wheeler, Paul S. Morley, Keith E. Belk, and John W. Schmidt. 2017. 'Impact of "Raised without Antibiotics" Beef Cattle Production Practices on Occurrences of Antimicrobial Resistance'. *Applied and Environmental Microbiology* 83 (22): e01682-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-17>.

Vilain, Claire. 2015. 'Évolution des anguilluloses malignes après traitement triphasé par rapport au traitement antiparasitaire classique', December, 130.

Vincent, W. F. 2009. 'Cyanobacteria'. In *Encyclopedia of Inland Waters*, edited by Gene E. Likens, 226–32. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00127-7>.

Vittecoq, Marion, Sylvain Godreuil, Franck Prugnotte, Patrick Durand, Lionel Brazier, Nicolas Renaud, Audrey Arnal, et al. 2016. 'Antimicrobial Resistance in Wildlife'. *Journal of Applied Ecology* 53 (2): 519–29. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>.

Volant, Stevann, Pierre Lechat, Perrine Woringer, Laurence Motreff, Pascal Campagne, Christophe Malabat, Sean Kennedy, and Amine Ghoulane. 2020. 'SHAMAN: A User-Friendly Website for Metataxonomic Analysis from Raw Reads to Statistical Analysis'. *BMC Bioinformatics* 21 (1): 345. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03666-4>.

Wang, Jiaqi, Siqi Xu, Kai Zhao, Ge Song, Shunan Zhao, and Ruiping Liu. 2023. 'Risk Control of Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes (ARGs) and Antibiotic Resistant Bacteria (ARB)

during Sewage Sludge Treatment and Disposal: A Review'. *Science of The Total Environment* 877 (June): 162772. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162772>.

Wang, Rumeng, Min Ji, Hongyan Zhai, Yujing Guo, and Yuan Liu. 2021. 'Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in WWTP Effluent-Receiving Water Bodies and Reclaimed Wastewater Treatment Plants'. *Science of The Total Environment* 796 (November): 148919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148919>.

Wang, Ying, Yunping Han, Lin Li, Junxin Liu, and Xu Yan. 2022. 'Distribution, Sources, and Potential Risks of Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment Plant: A Review'. *Environmental Pollution* 310 (October): 119870. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119870>.

Wang, Yue, Ji Lu, Jan Engelstädter, Shuai Zhang, Pengbo Ding, Likai Mao, Zhiguo Yuan, Philip L. Bond, and Jianhua Guo. 2020. 'Non-Antibiotic Pharmaceuticals Enhance the Transmission of Exogenous Antibiotic Resistance Genes through Bacterial Transformation'. *The ISME Journal* 14 (8): 2179–96. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0679-2>.

Wang, Zhiyuan, Qiuwen Chen, Jianyun Zhang, Tiesheng Guan, Yuchen Chen, and Wenqing Shi. 2020. 'Critical Roles of Cyanobacteria as Reservoir and Source for Antibiotic Resistance Genes'. *Environment International* 144 (November): 106034. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106034>.

Wang, Zhuo, Xi-Hui Zhang, Yong Huang, and Hui Wang. 2015. 'Comprehensive Evaluation of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Typical Highly Urbanized Regions across China'. *Environmental Pollution* 204 (September): 223–32. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.04.021>.

Wegener, Henrik C. 2012. 'ANTIBIOTIC RESISTANCE—LINKING HUMAN AND ANIMAL HEALTH'. In *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114485/>.

Wesgate, Rebecca, Pierre Grasha, and Jean-Yves Maillard. 2016. 'Use of a Predictive Protocol to Measure the Antimicrobial Resistance Risks Associated with Biocidal Product Usage'. *American Journal of Infection Control* 44 (4): 458–64. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.009>.

White, L., K. L. Hopkins, D. Meunier, C. L. Perry, R. Pike, P. Wilkinson, R. W. Pickup, J. Cheesbrough, and N. Woodford. 2016. 'Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Hospital Wastewater: A Reservoir That May Be Unrelated to Clinical Isolates'. *Journal of Hospital Infection* 93 (2): 145–51. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.03.007>.

Wild, Christopher Paul. 2005. 'Complementing the Genome with an "Exposome": The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology'. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14 (8): 1847–50. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>.

Williams, Claire E., Jordan G. Kueneman, Daniel J. Nicholson, Adam A. Rosso, Edita Folfas, Brianna Casement, Maria A. Gallegos-Koyner, et al. n.d. 'Sustained Drought, but Not Short-Term Warming, Alters the Gut Microbiomes of Wild Anolis Lizards'. *Applied and Environmental Microbiology* 88 (19): e00530-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00530-22>.

Williamson, Deborah A., Christopher K. Fairley, Benjamin P. Howden, Marcus Y. Chen, Kerrie Stevens, Vesna De Petra, Ian Denham, and Eric P. F. Chow. 2019. 'Trends and Risk Factors for Antimicrobial-Resistant *Neisseria Gonorrhoeae*, Melbourne, Australia, 2007 to 2018'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (10): e01221-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01221-19>.

World Health Organization. 2021. WHO integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a "One Health" approach: Implementation and Opportunities. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/340079/9789240021402-eng.pdf?sequence=1>. [Accessed Feb 15, 2024]

World Health Organization. 2019. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>. [Accessed Feb 15, 2024]

World Health Organization. 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Available from: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1). [Accessed Feb 15, 2024]

World Tourism Organization. 2014. UNWTO Tourism Highlights. Available from: <https://www.e-unwto.org/doi/pdf/10.18111/9789284416226>. [Accessed Feb 15, 2024]

World Tourism Organization. 2019. International Tourism Highlights. Available from: <https://www.e-unwto.org/doi/pdf/10.18111/9789284421152>. [Accessed Feb 15, 2024]

Worsley-Tonks, Katherine E. L., Elizabeth A. Miller, Chris L. Anchor, Jeff B. Bender, Stanley D. Gehrt, Shane C. McKenzie, Randall S. Singer, Timothy J. Johnson, and Meggan E. Craft. 2021. 'Importance of Anthropogenic Sources at Shaping the Antimicrobial Resistance Profile of a Peri-Urban Mesocarnivore'. *Science of The Total Environment* 764 (April): 144166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144166>.

Wu, Y., A. Chung, N. F. Y. Tam, N. Pi, and M. H. Wong. 2008. 'Constructed Mangrove Wetland as Secondary Treatment System for Municipal Wastewater'. *Ecological Engineering* 34 (2): 137–46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.07.010>.

Xiao, Liang, Jordi Estellé, Pia Kiilerich, Yuliaxis Ramayo-Caldas, Zhongkui Xia, Qiang Feng, Suisha Liang, et al. 2016. 'A Reference Gene Catalogue of the Pig Gut Microbiome'. *Nature Microbiology* 1 (September): 16161. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.161>.

Yan, Qing, Yi-Xin Zhang, Jia Kang, Xiu-Mei Gan, Peng Xu-Y, Jin-Song Guo, and Xu Gao. 2015. 'A Preliminary Study on the Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in the River Basins and Their Removal in Two Conventional Drinking Water Treatment Plants in Chongqing, China'. *CLEAN – Soil, Air, Water* 43 (6): 794–803. <https://doi.org/10.1002/clen.201400039>.

Yang, Ying, Bing Li, Shichun Zou, Herbert H. P. Fang, and Tong Zhang. 2014. 'Fate of Antibiotic Resistance Genes in Sewage Treatment Plant Revealed by Metagenomic Approach'. *Water Research* 62 (October): 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.019>.

- Ye, Lin, and Tong Zhang. 2011. 'Pathogenic Bacteria in Sewage Treatment Plants as Revealed by 454 Pyrosequencing'. *Environmental Science & Technology* 45 (17): 7173–79. <https://doi.org/10.1021/es201045e>.
- Yin, Xiaole, Yu Deng, Liping Ma, Yulin Wang, Lilian Y. L. Chan, and Tong Zhang. 2019. 'Exploration of the Antibiotic Resistome in a Wastewater Treatment Plant by a Nine-Year Longitudinal Metagenomic Study'. *Environment International* 133 (Pt B): 105270. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105270>.
- Yoo, Keunje, and Gihan Lee. 2021. 'Investigation of the Prevalence of Antibiotic Resistance Genes According to the Wastewater Treatment Scale Using Metagenomic Analysis'. *Antibiotics* 10 (2): 188. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020188>.
- Zhang, Junya, Qianwen Sui, Tiedong Lu, Hui Zhong, Peihong Shen, and Yuansong Wei. 2019. 'Sludge Bio-Drying Followed by Land Application Could Control the Spread of Antibiotic Resistance Genes'. *Environment International* 130 (September): 104906. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104906>.
- Zhang, Songhe, Bing Han, Ju Gu, Chao Wang, Peifang Wang, Yanyan Ma, Jiashun Cao, and Zhenli He. 2015. 'Fate of Antibiotic Resistant Cultivable Heterotrophic Bacteria and Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment Processes'. *Chemosphere* 135 (September): 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.001>.
- Zhang, Yizhe, Lei Duan, Bin Wang, Cristina Su Liu, Yanbo Jia, Nannan Zhai, Lee Blaney, and Gang Yu. 2020. 'Efficient Multiresidue Determination Method for 168 Pharmaceuticals and Metabolites: Optimization and Application to Raw Wastewater, Wastewater Effluent, and Surface Water in Beijing, China'. *Environmental Pollution* 261 (June): 114113. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114113>.
- Zhao, Li, Yiwen Li, Zhiwei Gan, Weiyi Sun, Shijun Su, Zhi Li, and Lingling Shi. 2024. 'Distribution, Fate and Removal Efficiency of Anthelmintic Drugs in Wastewater Treatment Plants'. *Science of The Total Environment* 908 (January): 168240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168240>.
- Zhao, Liang, Ziquan Lv, Liangqiang Lin, Xiaowei Li, Jian Xu, Suli Huang, Yuhua Chen, et al. 2023. 'Impact of COVID-19 Pandemic on Profiles of Antibiotic-Resistant Genes and Bacteria in Hospital Wastewater'. *Environmental Pollution* 334 (October): 122133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122133>.
- Zhao, Yi, Qiu E. Yang, Xue Zhou, Feng-Hua Wang, Johanna Muurinen, Marko P. Virta, Kristian Koefoed Brandt, and Yong-Guan Zhu. 2021. 'Antibiotic Resistome in the Livestock and Aquaculture Industries: Status and Solutions'. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 51 (19): 2159–96. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>.
- Zhen, Gengchong, Ying Li, Yindong Tong, Lei Yang, Yan Zhu, and Wei Zhang. 2016. 'Temporal Variation and Regional Transfer of Heavy Metals in the Pearl (Zhujiang) River, China'. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (9): 8410–20. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6077-7>.
- Zheng, Wanlin, Jiaoqi Huan, Zhe Tian, Yu Zhang, and Xianghua Wen. 2020. 'Clinical Class 1 Integron-Integrase Gene – A Promising Indicator to Monitor the Abundance and Elimination

of Antibiotic Resistance Genes in an Urban Wastewater Treatment Plant'. *Environment International* 135 (February): 105372. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105372>.

Zhu, Jianyu, Jingxia Zhang, Qian Li, Tao Han, Jianping Xie, Yuehua Hu, and Liyuan Chai. 2013. 'Phylogenetic Analysis of Bacterial Community Composition in Sediment Contaminated with Multiple Heavy Metals from the Xiangjiang River in China'. *Marine Pollution Bulletin* 70 (1): 134–39. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.023>.

Zhu, Yong-Guan, Michael Gillings, Pascal Simonet, Dov Stekel, Steve Banwart, and Josep Penuelas. 2017. 'Microbial Mass Movements'. *Science (New York, N.Y.)* 357 (6356): 1099–1100. <https://doi.org/10.1126/science.aao3007>.

Zhu, Yong-Guan, Timothy A. Johnson, Jian-Qiang Su, Min Qiao, Guang-Xia Guo, Robert D. Stedtfeld, Syed A. Hashsham, and James M. Tiedje. 2013. 'Diverse and Abundant Antibiotic Resistance Genes in Chinese Swine Farms'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (9): 3435–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>.

## Annexes

---

Annexe 1. Liste des amorces utilisées pour la quantification des gènes par Fluidigm PCR .....	224
Annexe 2. Poster présenté lors du congrès EDAR6 .....	226

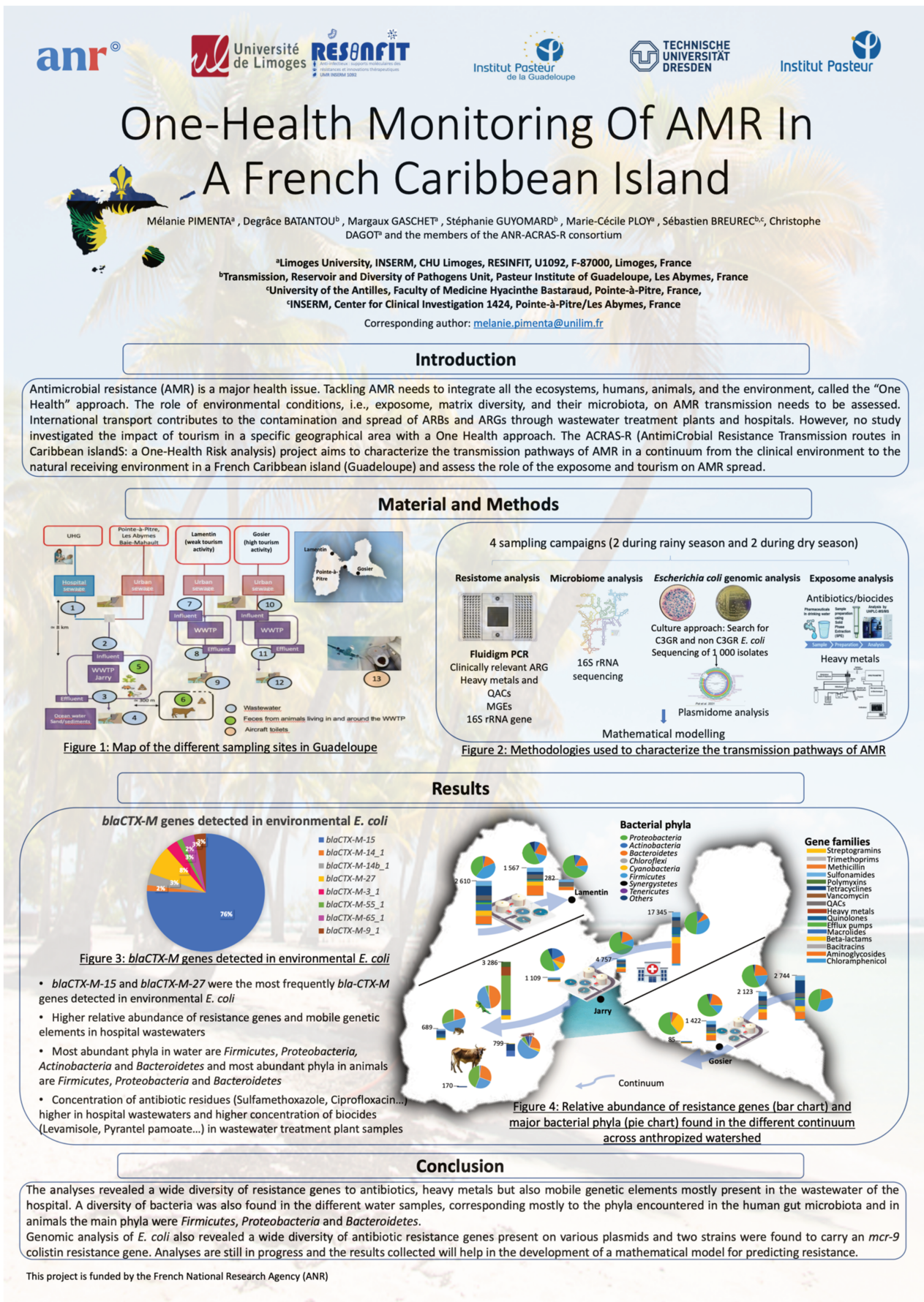
## Annexe 1. Liste des amorces utilisées pour la quantification des gènes par Fluidigm PCR

Classes	Gènes	Amorce sens	Amorce antisens
Phénicolés	<i>catB3</i>	AAGGCAAGCTGCTTCTGAG	TCGAATGAGTGCCCATGATA
	<i>cat</i>	CAATCCTCAATCGACACGAA	GATTGTGTAGCAAGGCAGCA
	<i>cmlA1</i>	AATGGGATGCCTGATAGCTG	ACCCACTAGCCACATTGGAG
Aminosides	<i>aac(3)-IId</i>	TGACGTATGAGATGCCGATG	GAGAATGCCGTTTGAATCGT
	<i>aadE</i>	GCATGATTTCTGGCTGATT	CCACAATCCTCTGGGACAT
	<i>aac(6')-Ib</i>	TTGCAATGCTGAATGGAGAG	TGGTCTATTCCGGTACTCC
	<i>aadA</i>	CAGCGGAGGAATCTTTGAC	GCTGCGAGTTCATAGCTTC
	<i>aac(6')-IIa</i>	GGAACACTACCTGCCAGAG	GCGACGTACGACTGAGCATA
	<i>spc</i>	TGACGAACGCAATGTGATTT	TCAGTGCCAGATCTTTTGA
	<i>aph(3')-III</i>	CCGGTATAAAGGGACCACCT	CTTTGGAACAGGCAGCTTTC
	<i>aph(2'')-I(de)</i>	CGGAGGTGGTTTTACAGGA	TTGCTTCGGCAGATTATTGA
	<i>aph(2'')-Ib</i>	ATCAAATCCCTGCGTAGTG	CAAGGGCATCCTTTCCITTT
	<i>aadB</i>	GCCGATGAAGTACCACAGT	CGCAAGACCTCAACCTTTTC
	<i>aac(3)-Ib</i>	CTACCCAAGTTCGAGCAAGC	GCTTCAGGTGGCTAATCAGG
	<i>strB</i>	GCGGATTATAGCCGATCAAA	CGCGACTGGAGAACATGATA
	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	TCCAAGAGCAATAAGGGCATA	TGCCCTCGTGAATTCATGT
Bacitracine	<i>bacA_2</i>	GAGGCATTGATCCTTGGTGT	AAACAATGCCGAACCGATAG
	<i>bacA_1</i>	GGCTGCGTTACTGTGTTTT	GGCCAATGATAAATGCATCC
Bêta-lactamines	<i>cepA</i>	ATGTCTGCCTGGTAGTTG	CTTGCCGTCGATAATGACT
	<i>cblA</i>	TGCTGCGACATCTTGATAG	CCGTCTTCTGTTCCGAGAG
	<i>cfxA</i>	GCGCAAATCCTCCTTAACA	ACAATAACCGCCACACCAAT
	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	AAGCCATACCAAAACGACGAG	TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA
	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	GCTACCGCAGCAGAGTCTTT	CCCACCCGTTAACTCTTCA
	<i>bla<sub>AMPC</sub></i>	ACCGCTAAACAGTGAATGG	GCAAGTCGCTTGGAGATTTC
	<i>bla<sub>DHA</sub></i>	AAAGTGCGCAAAGCCAGTAT	AAGATTCCGCATCAAGCTGT
	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	CGATCCGGTCACGAAATACT	CCTGCCGTATAGTGGCTAA
	<i>bla<sub>ACC</sub></i>	TTGTTACGCTACGTGCAAGC	CGATTTGAAATAGCCGGTGT
	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	CTTTCCATGATGAGCACCT	CAGATCCTGCTGGCGATAGT
	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	TGTCCGTGATGGTGATGAGT	TTTCAATCTCCGCGAGAAGT
	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	TGGCTAAAGGGAAACACGAC	TAGTCATTTGCCGTGCCATA
	<i>bla<sub>IMI</sub></i>	AGTCGATCCAGCAGCTTTA	CCAAGAACTGTGCATTCCA
	<i>bla<sub>BIC-1</sub></i>	CCATCAGCGACAACATAGT	CCAGAACGTTTTCCAGAAGC
	<i>bla<sub>GES</sub></i>	GACCCACACCATTGAGAGGT	GCGCAGGTACCAAGTTTCTC
	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	TGGATCAAGCAGGAGATCAA	ATTGGCATAAGTCGCAATCC
	<i>bla<sub>OXA</sub></i>	GTGGCATCGATTATCGGAAT	AGAGCACAACACTACGCCCTGT
	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	ACTATGGCACCAACAGAT	GGTTGAGGCTGGGTGAAGTA
	<i>blaPer-1</i>	GAAAGGTGCTGCAGAGATCCTA	CTCTGGTCTGTGGTGGTTT
Macrolides	<i>ermF</i>	AGCACCCGCTTTTTCTTAT	GATCAAGAGGGGCTTTAGGG
	<i>ermB</i>	GGTTGCTCTTGCACTCAA	CTGTGGTATGGCGGTAAGT
	<i>ermC</i>	TGAAATCGGCTCAGAAAAG	GGTCTATTTCAATGGCAGTTACG
	<i>ermY</i>	AAGTTCCCAAACAACAAAGCA	TTCACTTTCAAAGACAATTTTTCG
	<i>mfsA</i>	AATATGCTCTCCGGGCTTTT	TTTGACACCGTAAAATGGA
	<i>mefA_10</i>	CCTGCAAATGGCGATTATTT	CCAAGACCGCATAGGGTAA
	<i>macB</i>	GGCTGGAAGACCGTACAGAG	GTTGGTTCATCGGCAAGAAT
	<i>ermX</i>	TGACGCTGACTCCTCATGC	CGAGAACCCAGGTGAAATGT

Classes	Gènes	Amorce sens	Amorce antisens
Pompes à efflux	<i>acrA</i>	GAAGGTAGCGACATCGAAGC	CTTTGCAGATCACCTTTC
	<i>mdtO</i>	TTGTTGGCCTCTATCCAACC	TTAAGCGCTTGATGCATTTG
	<i>tolC</i>	CTGAAAGAAGCCGAAAAACG	CGTCGGTAAGTGACCATCCT
	<i>mdtL</i>	CGGACAAACACGAGAAAAT	GAAGGTGAGGATCACCGAAA
	<i>mdtF</i>	GGACCCGAAAAACTCAATA	AGTTGACCACCGGAAATCTG
Quinolones	<i>qnrA</i>	ATTTCTACGCCAGGATTTG	ACTGCAATCCTCGAACTGG
	<i>qnrB</i>	CGATCTGACCAATTCGGAGT	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC
	<i>qnrS</i>	TGGAAACCTACCGTCACACA	AATCGCATCGGATAAAGGTG
	<i>qnrC</i>	GCAGAAATCAGGGGTGTGAT	AACTGCTCAAAAAGCTGCTC
Métaux lourds	<i>cusF</i>	CCCAGGCTAACGAACATCAT	TGCTTTCAGATCGATACCC
	<i>copA</i>	CGACATGACCATCAACAACC	TAGTACTCCCCTGCGTGAT
	<i>copD</i>	GAGTGTGCTGACCCGTGTT	TCTTCGGCTACCAGCAGTTT
	<i>cadA</i>	CGATCGCTGTCTTTTAGGC	TACACCAAAGCCAACACGAA
	<i>merA</i>	TTGTACAAGGCAGTTGAGG	CGCCTTGTTCGATGGATAAT
	<i>czcA</i>	CGTTCGTGGACGTGATATTG	ACCCATGTCATCCAGTAGC
QAC	<i>qacA</i>	GACCCCTCTGGTACCCAACA	TCCCATTTATCAGCAAAGG
	<i>qacC</i>	TGGCGGGACTAGGTTTAG	ACGAAACTACCGCAGTATGA
	<i>qacE</i>	TCGGTGTGCTTATGCAGTC	ATCAAGCTTTGCCATGAA
Vancomycine	<i>vanA</i>	GTGCGGTATTGGGAAACAGT	TGCGTTTTCAGAGCCTTTTT
	<i>vanB</i>	CCTGCCTGGTTTTACATCGT	GCTGTCAATCAGTGACAGGAA
Tétracyclines	<i>tetQ</i>	GCAAAGGAAGGCATACAAGC	AAACGCTCCAATTCACACC
	<i>tetW</i>	GGTGCAAGTTGGAGGTTGTTT	AAATGACGGAGGGTTCCTTT
	<i>tetM</i>	TTGATGCGGGAAAACTACC	TACCTCTGCCAGCTTCCT
	<i>tetO</i>	GCGTCAAAGGGGAATCACTA	CGGTATACTCCGCCAAAAA
	<i>tetB</i>	CAAAACTTGCCCTAACCAA	GCTTTCAGGGATCACAGGAG
Polymyxines	<i>arnA</i>	GAAATTCACCGTCTGGTCGT	GTGGTGCAACAGAAATCACG
	<i>mcr-1</i>	TCCAAAATGCCCTACAGACC	TAGCACACCCAAACCAATGA
Sulfamides	<i>sul1</i>	AGGCTGGTGGTTATGCACTC	AAGAACCACCAATCTCGTC
	<i>sulA</i>	GATATTCGCGGTTTTCCAGA	GTCTTGACCCGAATGCATAA
Méthicilline	<i>mecA</i>	TCCAGGAATGCAGAAAGACC	GGCCAATCCACATTGTTTC
Triméthoprimine	<i>dfrA27</i>	TTGTGTTTCTGGTGGTGGGA	TTCCGGAAAGAAAACATTGC
	<i>dfrF</i>	GATTGTTGCGAGGTCAAAGAA	CGCCCCATAATAACCACATT
	<i>dfrB1</i>	GATTGTGCGGTGGTACTGCA	TCTGACTGAGCCTGGGTGA
Streptogramine	<i>vatB</i>	TGGGAAAAAGCAACTCCATC	TTCTGACCAATCCACATCA
	<i>vatA</i>	GGGTGGGAGAAGTATATGCCT	TCCCAATTTTCACCCCAGG
EGM	<i>ISSW1</i>	TTGAACAAGACCATCGTCCA	TCTCCATCCCCTAATCGTG
	<i>ISS1N</i>	GACAGAGCACCGAACTGTGA	TGCCCTTAATCGTGAAGAG
	<i>IS6_IS6100</i>	GAGAGAGCTTTTGGCATTGG	AGAGGTAGGCTGCTGCTCTG
	<i>Tp614</i>	TTTCACTGAGGGGATGGAAG	TTGCCCTCCCATTTCTCAAC
	<i>IS613</i>	GTGGCGGTTATTGACGACTT	TTCAGCTGTCTTCTGATG
	<i>IS6 group</i>	ACCTTTGATGGTGGCGTAAG	TACCGGAACAACGTGATTGA
	<i>tn3_tnpA</i>	TCTTCGTCGCTACAGAGCAA	CGTGCTATAGGCTTTCAGG
	<i>ISEc9</i>	TGAAAAGCGTGGTAAATGCTG	TCGCCAAAAATGACTTATGC
	<i>intl1</i>	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	GATCGGTCGAATGCGTGT
	<i>intl2</i>	TGCTTTCCACCCTTACC	GACGGCTACCTCTGTTATCTC
	<i>intl3</i>	GCCACCACTGTTTGAGGA	GGATGTCTGTGCTGCTTG
<i>Inc-P1</i>	TGATCCCAACACCGTCGATG	CTTCTTCCCCTGGCGTCAT	
	<i>crAssphage</i>	CAGAAGTACAAACTCTAAAAACGTAGAG	AATAACGATTTACGTGATGTAAC
	<i>TTV</i>	GTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAG	GCCGAATTGCCCTTGAC
	<i>16S rRNA</i>	CAACGCGARGAACCTTACC	ACAACACGAGCTGACGAC



## Annexe 2. Poster présenté lors du congrès EDAR6



## **Approche One-Health et épidémiologie sanitaire pour l'étude de la dynamique de la dissémination environnementale de la résistance aux antibiotiques en Guadeloupe**

---

La résistance aux antibiotiques est devenue au fil des années un problème de santé publique majeur au niveau mondial. Connaissant l'interdépendance entre les écosystèmes humains, animaux et environnementaux, il est nécessaire d'appréhender celle-ci au travers d'une approche globale, One-Health. Divers facteurs sont associés à la dynamique de la résistance. Parmi eux, les facteurs sociétaux, tels que le tourisme, et les facteurs environnementaux, incluant la saisonnalité ou les composés auxquels sont exposées les bactéries, composant l'exposome, ont été proposés. Afin d'évaluer les voies de transmission et l'impact de ces facteurs sur la résistance, nous avons utilisé une approche d'épidémiologie sanitaire par une surveillance des eaux usées et des milieux récepteurs. Pour cela, quatre campagnes d'échantillonnage ont été réalisées en Guadeloupe, île française des Caraïbes, le long de deux continuums. Un premier continuum allant du CHU jusqu'au milieu récepteur naturel, en passant par une station de traitement des eaux usées. Des fèces d'animaux vivant dans ou en dehors de la station ont également été prélevés. Le deuxième continuum comprenait deux villes avec un niveau de tourisme différent, et des prélèvements d'effluents collectés dans les toilettes d'avions provenant de France métropolitaine. Par analyse de l'exposome, du microbiome et du résistome nous avons montré une grande diversité de composés chimiques et métalliques auxquels sont exposées des bactéries potentiellement porteuses de gènes de résistance. Ce projet a permis de voir que la résistance en Guadeloupe était comparable à celle de la métropole, que la saisonnalité, pourtant spécifique, n'était pas discriminante et que le tourisme avait peu d'impact sur les résistomes. Il a été noté que la surveillance des effluents des zones hôtelières pourrait apporter des informations plus pertinentes sur les résistomes des touristes.

---

Mots-clés : Résistance aux antibiotiques, One-Health, Guadeloupe, Eaux usées

## **One-Health approach and health epidemiology to study the dynamic of the environmental spread of antibiotic resistance in Guadeloupe**

---

Over the years, antibiotic resistance has become a major public health issue worldwide. Given the interdependence between human, animal, and environmental ecosystems, we need to use a global approach, One-Health, to study this issue. Various factors are associated with the dynamic of resistance. These include societal factors, such as tourism, and environmental factors, including seasonality and the compounds to which bacteria are exposed, making up the exposome. To assess the transmission routes and the impact of these factors on resistance, we used an epidemiology approach involving the monitoring of wastewater and receiving environments. Four sampling campaigns were done in Guadeloupe, a French Caribbean Island, along two continuums. The first continuum ran from the teaching hospital to the natural receiving environment through a wastewater treatment plant. Samples of feces from animals living in or outside the plant were also taken. The second continuum included two cities with different levels of tourism, and samples of effluents collected in aircrafts' toilets coming from mainland France. By analyzing the exposome, the microbiome and the resistome, we showed a wide diversity of chemical and metallic compounds to which bacteria potentially carrying resistance genes are exposed. This project showed that antimicrobial resistance in Guadeloupe was comparable to that in mainland France, that seasonality, although specific, was not discriminating and that tourism had little impact on resistomes. It was noted that monitoring effluent from hotel areas could provide more relevant information on tourist resistomes.

---

Keywords: Antibiotic resistance, One-health, Guadeloupe, Wastewater

