anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Antibiorésistance et environnement

État et causes possibles de la contamination des milieux en France

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2020 - Édition scientifique

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Antibiorésistance et environnement

État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2020 - Édition scientifique

Avis de l'Anses
Saisine n° 2016-SA-0252

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 17 novembre 2020

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

relatif à « Antibiorésistance et environnement - État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 16 novembre 2016 par la Direction générale de la prévention des risques, la Direction générale de la santé et la Direction générale de l'alimentation pour la réalisation de l'expertise suivante : Antibiorésistance et environnement - État de la contamination des milieux par les antibiotiques et les bactéries pathogènes résistantes et mécanismes de développement de l'antibiorésistance dans l'environnement.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

1.1. Contexte

L'antibiorésistance (ABR) est une préoccupation majeure de santé publique, partagée par un très grand nombre d'acteurs de la santé humaine et animale au niveau mondial. Ainsi, dans la lettre de saisine adressée à l'Anses, les ministères en charge de la santé, de l'agriculture et de l'environnement indiquent : « *Les antibiotiques ont permis, depuis la généralisation de leur utilisation, en médecine humaine comme en médecine animale, de combattre des maladies bactériennes autrefois difficiles voire impossibles à soigner. Cependant, les mésusages des antibiotiques augmentent inévitablement les risques de sélection de bactéries résistantes dont l'impact en santé publique est majeur.* »

Face au défi de la dissémination de l'ABR, et sur la base du constat partagé de la nécessité d'agir, de nombreux acteurs internationaux, européens et français mettent en place des actions de lutte contre l'ABR. Celles-ci passent par des plans d'actions globaux ou ciblés sur la médecine humaine et/ou vétérinaire, et par la surveillance de l'ABR et/ou de l'utilisation des antibiotiques (ATB) (voir annexe 2 du rapport d'expertise).

L'ensemble des acteurs s'accorde sur la nécessité de retenir une approche multisectorielle « Un monde, une santé » ou « Une seule santé » (One Health, One World) *« particulièrement pertinente dans les domaines […] de la lutte contre la résistance aux ATB* » (OMS 2017b). Le concept « Une seule santé » est « *utilisé pour décrire le principe selon lequel la santé humaine et la santé animale sont liées entre elles, que l'homme transmet des maladies aux animaux et inversement, de sorte que les mesures de lutte doivent concerner tant l'homme que les animaux. La perspective « Une seule santé » suppose de prendre également en compte l'environnement – autre lien entre l'homme et l'animal –, qui peut lui aussi être une source de nouveaux micro-organismes résistants* » (Commission Européenne 2017).

Des actions relatives à l'ABR dans l'environnement sont identifiées à chaque niveau de gouvernance : international, européen et national. Cette prise en compte est néanmoins relativement récente, et les actions dans le domaine environnemental constituent, et de loin, le secteur le moins pris en compte dans le cadre des politiques publiques.

En France, la question de l'ABR dans l'environnement a été abordée dans le rapport « Tous ensemble, sauvons les ATB » (Carlet et Le Coz 2015), dans la « Feuille de route interministérielle pour maîtriser la résistance bactérienne aux antibiotiques » (Comité interministériel pour la santé 2016) ainsi que dans la « Feuille de route 2015 pour la transition écologique » (MEDDE 2015). Cette dernière a annoncé la présente saisine de l'Anses visant à « *objectiver les connaissances relatives aux mécanismes participant au développement de l'antibiorésistance dans l'environnement. L'objectif est de comprendre les mécanismes mis en œuvre dans l'environnement dans l'apparition et la diffusion des résistances bactériennes afin d'orienter les mesures à mettre en place pour limiter l'émergence de nouvelles résistances* ». La figure 1 illustre le champ de la saisine dans le cadre global de la circulation de l'ABR entre l'Homme, les animaux et l'environnement.

Parallèlement à la saisine adressée à l'Anses, et en réponse à un appel à projet du commissariat général au développement durable (CGDD) du ministère en charge de l'environnement, un consortium a réalisé une revue systématique de la littérature portant sur les solutions efficaces pour réduire la contamination de l'environnement par les antibiorésistances. Ce consortium a regroupé des scientifiques de l'ensemble des instituts ou structures nationales où se développent des recherches sur la problématique des ATB et bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) dans l'environnement, et des représentants des organismes gestionnaires concernés par la mise en place de mesures pour lutter contre la contamination de l'environnement par des antibiotiques ou des BRA. Les travaux, débutés en 2017, ont été finalisés en 2019 (Goulas *et al.* 2018 ; Goulas *et al.* 2020). L'expertise menée par l'Anses vise donc à compléter ce travail en appréhendant le questionnement de la dissémination de l'ABR dans l'environnement de façon plus globale, tout en se focalisant sur les données acquises sur le territoire français.

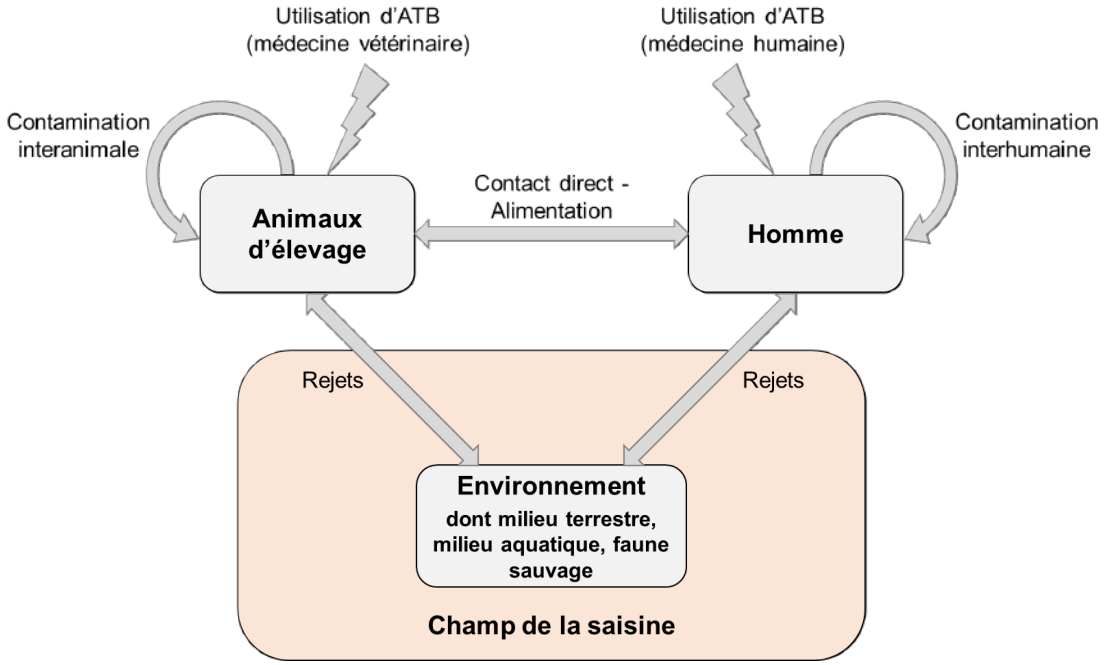


Figure 1. Schéma de la circulation de l'antibiorésistance et champ de la saisine.

1.2. Objet de la saisine

Les ministères en charge de la santé, de l'agriculture et de l'environnement ont saisi l'Anses d'une demande d'expertise sur l'ABR et l'environnement visant à :

- « *1. Dresser un état des lieux des connaissances actuelles sur la contamination des différents compartiments environnementaux (sols et eaux) par les antibiotiques et les bactéries pathogènes résistantes. L'expertise pourra inclure des recommandations pour l'élaboration d'une cartographie nationale des contaminations, en tenant compte de la diversité des méthodes et indicateurs utilisés pour détecter et mesurer l'antibiorésistance. Les résultats de cette expertise pourront être utilisés dans le cadre des actions menées par le comité interministériel pour la santé.*
- *2. Déterminer les mécanismes sous-jacents à la sélection et à la transmission de l'antibiorésistance via l'environnement. L'étude montrera, sur la base des publications sélectionnées, quels mécanismes contribuant au développement et à l'expansion de l'antibiorésistance ont été identifiés dans l'environnement (sources de contamination, voies de transmission à la faune et la flore notamment). Elle estimera également l'impact de l'utilisation des antibiotiques (également des résidus et métabolites) et d'autres molécules (biocides, métaux lourds, …) sur la sélection de l'antibiorésistance. L'étude identifiera enfin les éléments d'analyse éventuellement manquants et les actions opérationnelles ou de recherche pouvant être mises en œuvre pour les couvrir, en lien avec les travaux du comité interministériel pour la santé. Des recommandations quant aux mesures à mettre en place par les pouvoirs publics et autres acteurs pour limiter l'émergence de nouvelles résistances via l'environnement pourront être faites.* »

Le champ de l'expertise a été précisé par l'Anses en lien avec les tutelles, puis par le groupe de travail (GT) en charge de la saisine, qui a également reformulé les questions traitées. Ce cadrage affiné est présenté dans le chapitre 2 du rapport d'expertise et dans la partie 3.1 du présent avis.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ». L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au GT « Antibiorésistance et environnement ». Un appui scientifique et technique (AST) a été sollicité auprès des laboratoires de l'Anses sur les actions institutionnelles pour lutter contre l'antibiorésistance en Europe et en France d'une part, et d'autre part pour réaliser un état des connaissances sur l'antibiorésistance dans les eaux littorales. Deux rapporteurs ont également été nommés sur la question de l'impact de la présence des biocides dans l'environnement sur la résistance aux antibiotiques. Les contributions produites ont servi de base au GT pour la rédaction des parties correspondantes du rapport d'expertise.

Les travaux se basent sur les données et connaissances disponibles dans la littérature scientifique publiée (recherche *via* PubMed[1] et ScienceDirect[2]), les rapports institutionnels, la littérature grise et les bases de données, et sur celles produites par des laboratoires de recherche français dont les données n'ont pas encore été publiées.

Les travaux d'expertise du GT ont été présentés régulièrement au CES « Eaux », tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 6 novembre 2018 et le 13 octobre 2020. Trois relecteurs ont été nommés par le CES. Le rapport produit par le GT tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES « Eaux ». Les travaux ont été adoptés par le CES « Eaux » réuni le 10 novembre 2020.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge de la santé (https://dpi.sante.gouv.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT *« ANTIBIORESISTANCE ET ENVIRONNEMENT »* ET DU CES « EAUX »

Le présent avis résume le rapport d'expertise correspondant. Les définitions des termes spécifiques et récurrents de cette expertise figurent au début du rapport d'expertise.

3.1. Cadrage de la saisine

3.1.1. Caractérisation de l'antibiorésistance

Afin d'étudier l'ABR dans l'environnement, le GT a jugé nécessaire de traiter des **bactéries résistantes aux antibiotiques** (BRA) ainsi que des **supports génétiques de la résistance** : gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés (GRA) et éléments génétiques mobiles (EGM).

La majorité des travaux de recherche portant sur l'ABR dans l'environnement s'intéresse aux BRA ou aux GRA dans différents compartiments impactés par des activités anthropiques, et caractérise l'apport et l'enrichissement du résistome environnemental, sans en avoir évalué au préalable sa diversité initiale. Une des conséquences est que la majorité des BRA et des GRA recherchés est « d'intérêt clinique ». Dans ce contexte, en réponse à la lettre de saisine qui mentionne les « *bactéries pathogènes résistantes* » et afin de disposer de données, le GT a choisi d'axer le présent travail **du point de vue de la santé humaine** et de considérer en priorité les **espèces bactériennes résistantes pathogènes, dont pathogènes opportunistes, pour l'Homme**.

[1] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
[2] https://www.sciencedirect.com/

Ainsi, bien que la problématique de l'ABR se pose également en santé animale, ce travail n'aborde pas les BRA ou GRA spécifiquement préoccupants chez les animaux. De même, ni les bactéries environnementales résistantes, ni les GRA spécifiques aux bactéries environnementales n'ont été étudiés. En revanche, l'expertise aborde les conditions de transfert de GRA environnementaux vers des souches cliniques.

3.1.2. Environnement

La saisine adressée à l'Anses mentionne « *différents compartiments environnementaux (sols et eau)* », « *la faune et la flore* » et les « *sources de contamination* ». Par conséquent, l'expertise a été axée sur les **milieux aquatiques et terrestres et leurs sources de contamination.**

3.1.3. Zone géographique considérée

La contamination de l'environnement par les ATB, les BRA et les GRA est dépendante à la fois des règlementations en vigueur et des pratiques nationales. En effet, en fonction des pays, les règlementations relatives aux médicaments encadrent de manière plus ou moins stricte l'utilisation des ATB en médecine humaine et vétérinaire (dont l'élevage). De plus, la contamination environnementale par les bactéries d'origine humaine est très variable dans le monde, car elle reflète le niveau d'hygiène globale et l'accès des populations à des structures sanitaires. En 2015, la proportion de la population ayant accès aux structures sanitaires était de 98,7 % en France, de 78 % en Asie du Sud-Est et du Pacifique, et de 70 % en Afrique sub-saharienne (Banque mondiale 2019). Dans les pays en voie de développement, la dissémination de BRA et de GRA est une menace pour la santé humaine, la santé animale et des écosystèmes, d'autant plus que les infrastructures de traitement des eaux usées sont souvent inexistantes ou peu efficaces, en raison de problèmes économiques et de l'instabilité politique (Collignon *et al.* 2018). De telles carences en ingénierie sanitaires ont pour conséquence le rejet direct dans l'environnement d'ATB, de BRA et de GRA par les patients traités (Fekadu *et al.* 2019). À ceci s'ajoute la contamination de l'environnement par les rejets d'industries pharmaceutiques, qui se concentrent principalement en Asie, notamment en Inde et en Chine. Dans ces pays producteurs, la réglementation relative aux rejets dans l'environnement est moins contraignante qu'en Europe (Larsson, de Pedro et Paxeus 2007). L'absence d'unité de traitement des eaux usées industrielles dans la plupart de ces pays, conduit à des contaminations chroniques en ATB, BRA et GRA des écosystèmes aquatiques (Larsson 2014 ; Tell *et al.* 2019).

Compte tenu de ces différences de situations entre les pays, le GT a choisi de dresser **un état des lieux de la contamination environnementale par les ATB, les BRA et les GRA** qui repose sur une recherche bibliographique concernant en priorité la **France métropolitaine et les départements et régions d'outre-mer** (DROM). Lorsque cela s'est avéré pertinent, des données de contamination de l'environnement, produites au niveau européen, ont été utilisées à titre de comparaison, ou pour palier un manque de données françaises. Le reste de l'expertise est basé sur l'ensemble des données disponibles : nationales et internationales.

3.1.4. Questions traitées

La présente expertise vise à :

- Décrire les mécanismes sous-jacents à l'émergence et à la persistance de l'ABR dans l'environnement ;
- Décrire les méthodes de suivi des ATB et des BRA et GRA dans l'environnement ;
- Dresser un bilan des données existantes de contamination de l'environnement en France par :
  - Les ATB,
  - Les BRA et les GRA ;
- Caractériser les dynamiques spatiale et/ou temporelle des ATB et de l'ABR dans l'environnement.

3.1.5. Antibiotiques considérés dans cette expertise

Le GT a considéré comme ATB les substances actives possédant la propriété de tuer les bactéries (bactéricides) ou de limiter leur croissance (bactériostatiques), appartenant aux classes pharmacologiques bénéficiant ou ayant bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France pour leurs utilisations en médecine humaine et/ou vétérinaire. Les substances actives sont nommées par leur dénomination commune internationale. Le GT a choisi de rechercher les données disponibles concernant l'ensemble des ATB, sans appliquer de filtre spécifique et de cibler les données de concentrations des ATB dans l'environnement produites ou publiées entre 2008 et 2018.

En l'absence de donnée sur l'activité « antibiotique » de l'ensemble des produits de transformation des ATB formés lors de leur utilisation en médecine (métabolites) ou dans l'environnement par des processus de dégradations biotiques ou abiotiques, le GT a fait le choix de les prendre également en compte dans cette expertise. **Ils sont nommés « produits de transformation », quelles que soient leurs modalités de formation.** Certaines substances actives ou certains métabolites sont excrétés sous forme de conjugués qui peuvent être déconjugués lors des traitements de l'eau ou dans l'environnement (Dinh *et al.* 2017). Toutefois, peu de données relatives aux produits de dégradation des ATB ou à leurs formes conjuguées sont disponibles.

La partie 2.3.1 du rapport d'expertise détaille les données de consommation d'ATB et les classifications d'ATB considérés comme « critiques » pour la santé humaine, prises en compte pour l'interprétation des résultats.

3.1.6. Bactéries résistantes aux antibiotiques et gènes de résistance aux antibiotiques considérés dans cette expertise

Le GT a établi une liste des bactéries d'intérêt pour le suivi environnemental (tableau I), à partir de la liste des espèces ou genres pathogènes prioritaires résistants aux ATB définie par l'OMS (2017a). Bien que figurant dans la liste de l'OMS (2017a), les espèces *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ont été écartées des espèces bactériennes étudiées dans cette expertise puisqu'aucune donnée bibliographique ne renseigne leur présence dans l'environnement. Le GT a ajouté à cette liste les espèces bactériennes pathogènes potentiellement résistantes souvent retrouvées dans l'environnement, en tant que sources potentielles de GRA.

Toutefois, pour l'ensemble des espèces bactériennes présentées dans le tableau I, peu de données sont disponibles (bibliographie, rapports de recherche, bases de données). La faible contamination de l'environnements par la plupart de ces espèces bactériennes, explique que la majorité des études concernent *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux : espèces bactériennes indicatrices de contamination fécale, ou de l'efficacité de traitement des effluents.

Pour mener cette expertise, l'ensemble des études concernant les supports génétiques de la résistance a été retenu, auquel s'ajoutent les études de métagénomique les plus informatives.

Tableau I. Espèces, groupes ou genres bactériens d'intérêt pour un suivi environnemental.

Espèce, groupe ou genre bactérien	ATB ou classe d'ATB concernés par la résistance	Critères de prise en compte				Habitat réservoir principal* (Niche écologique)
		OMS (2017a)			Ajout du GT	
		Priorité 1	Priorité 2	Priorité 3		
Acinetobacter baumannii	Carbapénèmes	■				Animaux et Homme
Pseudomonas aeruginosa	Carbapénèmes	■				Homme, poissons et eaux
Klebsiella pneumoniae	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Escherichia coli	Carbapénèmes, C3G (indicateur)	■				Homme et animaux
Enterobacter spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Serratia spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Proteus spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Providencia spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Morganella spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Enterococcus faecium	Vancomycine		■			Homme et animaux
(*Staphylococcus aureus*)	Méticilline (indicateur)		■			Mammifères et oiseaux
(*Helicobacter pylori*)	Clarithromycine		■			Primates
(*Campylobacter* spp.)	Fluoroquinolones		■			Animaux
Salmonella non typhiques	Fluoroquinolones		■			Animaux
Salmonella non typhiques	C3G (indicateur)				■	Animaux
Salmonella Kentucky	Multi-R (indicateur)				■	Animaux
Shigella spp.	Fluoroquinolones			■		Homme
Aeromonas spp.					■	Eaux douces et animaux associés
Stenotrophomonas maltophilia					■	Sols (dont rhizosphère)
Vibrio spp.					■	Eaux littorale et marine et animaux marins
Flavobacterium spp.					■	Eaux et sols
Clostridium perfringens					■	Homme et animaux Sols et eaux
Clostridioides difficile					■	Homme et animaux
Burkholderia cepacia sensu lato					■	Plantes et sols

* Informations données à titre indicatif ; C3G=céphalosporines de 3e génération.

Les espèces ou genres bactériens entre parenthèses sont peu détectés dans l'environnement, sauf à rechercher les formes coccoïdes (dans le cas de *Helicobacter pylori*), l'état « viable mais non cultivable » (VBNC : « *Viable But Non Cultivable* ») ou leur présence dans les amibes libres en milieu aquatique.

3.2. Mécanismes sous-jacents à l'émergence et à la persistance de l'antibiorésistance dans l'environnement

Les mécanismes impliqués dans l'émergence ou la persistance de l'ABR dans l'environnement sont considérés à l'échelle de la cellule ou de la communauté bactérienne (chapitre 4 du rapport d'expertise). L'essentiel des données existantes est issu d'études menées *in vitro* en conditions contrôlées, et concerne les effets d'un ATB sur une espèce bactérienne spécifique. Ces études expérimentales sont rares car les conditions expérimentales sont difficiles à paramétrer, et ce d'autant plus pour les expériences menées à l'échelle des communautés bactériennes.

3.2.1. À l'échelle cellulaire

La réponse bactérienne induite par l'exposition à un ATB dépend de la concentration en ATB et de l'espèce bactérienne étudiée. Toutefois, de manière générale, on observe que :

- Le maintien des GRA peut s'accompagner d'un coût biologique ;
- En l'absence de pression de sélection exercée par l'ATB, la croissance de la population résistante est défavorisée, sauf si des mutations compensatoires permettent de contrebalancer le coût biologique des GRA.

L'exposition bactérienne à des concentrations sub-inhibitrices d'ATB (concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI)[3] d'un ATB) peut favoriser l'émergence et la persistance de l'ABR dans l'environnement, puisque ces faibles concentrations :

- Peuvent freiner la croissance des populations sensibles et donc favoriser le maintien des populations résistantes ;
- Sont particulièrement propices à l'accumulation de mutations de faible coût biologique permettant à la bactérie de présenter des résistances de bas niveau à différentes classes d'ATB ;
- Peuvent favoriser le transfert horizontal des GRA au sein de microbiotes environnementaux par des mécanismes de transduction ou de conjugaison ;
- Peuvent modifier la physiologie des espèces bactériennes (*i.e.* formation de biofilms et expression du *quorum sensing*) et indirectement leur résistance aux ATB.

Il existe très peu de données publiées sur l'effet cumulatif de l'exposition simultanée à plusieurs molécules ATB. Cependant, une combinaison des effets biologiques des sélecteurs[4] (ATB ou autres contaminants) présents simultanément dans l'environnement peut être fortement suspectée. En effet,

- La co-sélection d'un clone bactérien résistant à plusieurs classes d'ATB est possible par chacun des ATB auquel le clone est résistant ;
- Les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance aux éléments traces métalliques (ETM) et aux biocides, dont certains sont similaires à ceux impliqués dans la résistance aux ATB ;
- Les ETM et les biocides peuvent co-sélectionner une résistance aux ATB par résistance croisée ou co-résistance.

3.2.2. À l'échelle de la communauté bactérienne

Au sein d'une population ou d'une communauté, des bactéries peuvent coopérer pour résister à l'action d'ATB, par exemple :

[3] La CMI est la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance bactérienne.

[4] Éléments ou facteurs de nature abiotique ou biotique qui exerce la pression de sélection conduisant à l'évolution des espèces vivantes.

- Par la formation de structures protectrices telles que les biofilms qui permet alors la coordination de la réponse d'une population à l'ATB par le *quorum sensing* ;
- Par la production, par une ou plusieurs bactéries de la communauté, d'une enzyme qui désactive l'ATB permettant alors la croissance des espèces sensibles.

De plus, si, au sein d'une population bactérienne, une seule bactérie possède un plasmide portant un GRA, alors, l'exposition à l'ATB peut conduire à la diffusion du plasmide. Ainsi, lorsqu'une population bactérienne enrichit son patrimoine génétique d'un GRA, il est admis qu'une faible proportion de BRA persiste au sein de cette population, voire de la communauté, et ce même en absence de pression de sélection par les ATB.

Il existe peu de données relatives à la survie des BRA dans l'environnement. Toutefois, il est généralement admis que :

- Les niches écologiques sont très diverses :
  - De par leur composante abiotique qui exerce une pression de sélection sur les communautés microbiennes allochtones ;
  - De par leur composante biotique (communautés autochtones) spécifique d'une niche donnée.
- Ces composantes et leurs interactions constituent une barrière aux invasions biologiques par les bactéries allochtones apportées par les eaux usées traitées ou les produits résiduaires organiques (PRO). Celles-ci sont généralement éliminées par des mécanismes de prédation, de lyse virale et/ou de compétition pour les ressources.
- La pression de sélection par des ATB ou d'autres antimicrobiens co-sélecteurs de résistance peut favoriser la persistance de BRA allochtones.

Les communautés microbiennes environnementales constituent un réservoir de GRA, dont on ignore la nature et l'importance, qui sont susceptibles d'être transférés à une bactérie pathogène (y compris pathogène opportuniste), *via* un EGM.

- La sélection d'une nouvelle BRA pourrait être favorisée dans un environnement contaminé par un ou plusieurs agents antimicrobiens.
- Les experts estiment que les environnements où se côtoient les bactéries autochtones, les bactéries pathogènes et les agents antimicrobiens sélecteurs, dont les ATB, seraient potentiellement des niches écologiques favorables (« hotspots ») à l'émergence de souches pathogènes pour l'Homme, ayant acquis de nouveaux GRA.
- Le transfert d'un GRA à une bactérie pathogène est un évènement ponctuel rare. Différentes étapes sont ensuite nécessaires à la distribution des GRA au sein des populations humaines et/ou animales, étapes qui ne surviennent probablement qu'à une faible occurrence dans les milieux naturels.

3.3. Caractéristiques des milieux et des méthodes considérés pour définir l'état de la contamination

3.3.1. Milieux considérés

Les principales sources d'émission d'ATB, de BRA et de GRA sont les déjections humaines et animales, en particulier des individus ayant été traités aux ATB (urines et fèces pour les ATB et fèces pour les BRA et GRA). Ainsi, les principales sources de contamination de l'environnement par les ATB, les BRA et les GRA identifiées sont :

- Les **eaux usées traitées** issues des stations de traitement des eaux usées (STEU) : les réseaux d'assainissement collectent les eaux usées issues des activités humaines (dont domestiques, industrielles et d'activités de soins) et une partie des eaux pluviales pour les diriger vers des STEU dont le principal objectif est de limiter la contamination organique et

particulaire. Les eaux usées traitées sont majoritairement rejetées dans les eaux de surface. Ces rejets localisés et continus sont qualifiés de sources de contamination ponctuelles.

- Les **produits résiduaires organiques** (PRO) qui regroupent notamment les effluents d'élevage (fumiers, lisiers) et les boues issues du traitement des eaux usées urbaines. Après stockage et/ou traitement, les PRO sont généralement épandus sur les sols agricoles dans un contexte de valorisation des déchets pour fertiliser les sols, suivant un plan d'épandage défini par arrêté préfectoral. Ces rejets sont qualifiés de source de contamination diffuse.
- Les **eaux de pisciculture d'eau douce** : cinq ATB disposent d'une autorisation de mise sur le marché pour la filière piscicole. Les pisciculture sont directement connectées à l'environnement aquatique. Ainsi, les traitements ATB appliqués ainsi que les BRA et GRA présents dans les bassins peuvent être disséminés rapidement vers le milieu aquatique adjacent.

L'assainissement non collectif, les rejets des sites producteurs de principes actifs ATB ou de médicaments contenant des ATB, les anciens sites d'enfouissement de déchets ou les biodéchets issus des composteurs de proximité pourraient également contaminer l'environnement par les ATB, les BRA et/ou les GRA. Toutefois, par manque de données, ces sources de contamination n'ont pas pu être étudiées lors de l'expertise.

La figure 2 illustre les voies d'introduction et de répartition de ces sources de contamination dans les différents compartiments récepteurs de l'environnement considérés dans cette expertise :

- Les milieux aquatiques : eaux de surface, eaux souterraines et eaux littorales,
- Les milieux terrestres : sols et flore (rhizosphère et phyllosphère),
- La faune sauvage.

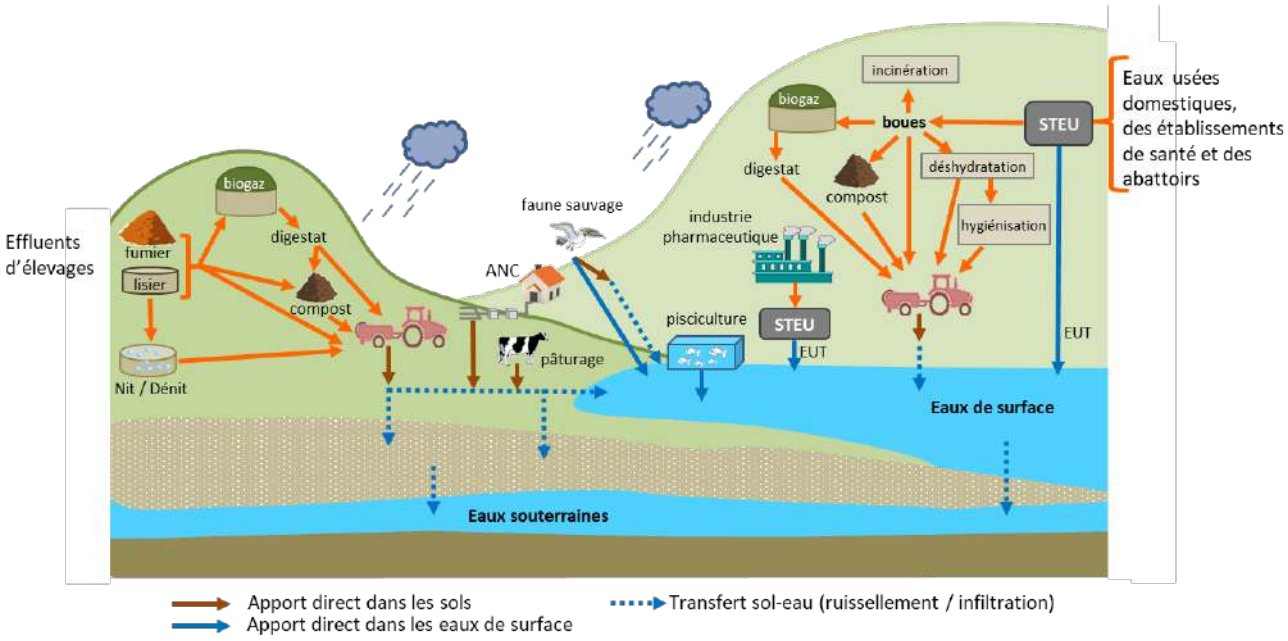


Figure 2. Principales voies de contamination des sols et des eaux par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques.

STEU=station de traitement des eaux usées ; EUT=eaux usées traitées ; ANC=assainissement non collectif ; Nit/Dénit=traitement biologique du lisier par nitrification / dénitrification.

Les sources principales de contamination et les compartiments récepteurs associés, tels que présentés dans l'expertise et dans la figure 2, correspondent aux conditions actuelles. Le changement climatique (ex : augmentation de la fréquence des événements pluvieux extrêmes) et le développement de l'économie circulaire de l'eau (ex : augmentation de l'utilisation d'eaux usées

traitées pour l'irrigation, recharge artificielle de nappes d'eau souterraine) auront un impact sur la dissémination des ATB, des BRA et des GRA. Cette évolution des pratiques n'a pas été prise en compte dans cette expertise.

3.3.2. Méthodes de détection et de quantification

La diversité des méthodes analytiques mises en œuvre pour la détection des ATB, des BRA et des GRA dans les différentes matrices environnementales complique la comparaison des études. Les techniques et les stratégies d'échantillonnage sont une première source de variation importante des résultats.

- **Antibiotiques**
  - La détection et la quantification des ATB reposent sur de nombreuses méthodes dont les outils ne sont pas encore totalement harmonisés. Pour les milieux aquatiques, des techniques d'échantillonnage basées sur l'échantillonnage passif sont de plus en plus utilisées. Les méthodes d'extraction doivent être adaptées en fonction du type de matrice (sols, PRO, sédiments, eaux, biofilms) et/ou de la fraction ciblée (phase dissoute/solide) selon les ATB.
  - Sur le volet analytique, les techniques de séparation par chromatographie en phase liquide, couplée à la détection par spectrométrie de masse, qui permettent de détecter et de quantifier simultanément, et de manière ciblée, un grand nombre de composés considérés comme polaires et peu volatils, sont les techniques de prédilection. Elles peuvent être complétées par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, pour les composés apolaires plus volatils. Le panel d'ATB étudiés est très variable selon les études, et il subsiste des molécules encore peu ou pas étudiées à ce jour (soit par difficulté technique, soit par absence de standards analytiques).
- **Antibiorésistance**
  - Les méthodes de détection et quantification de l'ABR se heurtent aux mêmes écueils. Deux approches peuvent être employées : une approche culturale qui détecte ou quantifie des BRA, ou une approche moléculaire qui détecte ou quantifie les GRA présents, à partir des ADN extraits des matrices environnementales. Pour ces deux approches, la multiplicité des méthodes employées en raison de la diversité des BRA et des GRA recherchés complique les comparaisons entre études. Comme pour les ATB, les méthodes d'échantillonnage, d'extraction d'ADN ainsi que les techniques de détection/quantification moléculaire des gènes, voire le choix des conditions de culture microbiologique souffrent d'un manque d'uniformisation.

De manière générale, l'absence d'harmonisation, voire de norme(s), concernant l'échantillonnage ou l'analyse des ATB, des BRA ou des GRA, est une source de variabilité importante des données, dont l'impact est difficile à évaluer et empêche la comparaison des données d'une étude à une autre.

La nécessité de disposer d'indicateurs est une problématique connue et discutée dans de nombreuses initiatives, toutefois, les indicateurs identifiés différent selon les objectifs attendus (voir § 5.2.4 du rapport d'expertise).

3.4. Contamination de l'environnement par les antibiotiques

Les concentrations en ATB dans les sources de contamination et les compartiments récepteurs mesurées en France ont été agrégées par ATB et par matrice, en attachant une valeur aux résultats inférieurs à une limite analytique[5] (chapitre 6 du rapport d'expertise). Pour les eaux de surface et les

[5] Les résultats inférieurs à une limite analytique ont été substitués par la moitié de cette limite analytique et ceux compris entre la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) par la somme des deux limites analytiques divisée par deux.

eaux souterraines, les données produites par les équipes de recherche ont été complétées par les données recensées dans le système d'information sur l'eau (SIE). Toutefois, en raison des disparités entre les deux jeux de données, ils n'ont pas pu être agrégés. De plus, la grande disparité du nombre d'échantillons prélevés par matrice (la majorité des études portant sur la phase dissoute des eaux de surface), du nombre d'analyses par ATB et du nombre d'ATB analysés par matrice, n'a permis d'obtenir qu'une image partielle de la contamination de l'environnement par les ATB en France. Les comparaisons entre compartiments sont donc à effectuer avec précaution.

En France, les concentrations en ATB dans les compartiments étudiés (eaux, sédiments, sols) restent faibles comparativement aux pays dont les systèmes d'assainissement sont moins performants, ou aux régions industrielles des pays producteurs d'ATB (ex : Inde, Chine).

- L'essentiel des ATB retrouvés dans l'environnement sont introduits par des sources anthropiques.
- Les apports continus en ATB confèrent à certains composés un caractère de contaminant ubiquiste.
- La persistance de certains ATB joue un rôle majeur dans la contamination de l'environnement :
  - Les ATB les plus persistants sont les plus fréquemment quantifiés : quinolones, fluoroquinolones, macrolides et sulfamides ;
  - Les β-lactamines, ATB les plus consommés, sont rarement quantifiés dans l'environnement en raison de leur forte dégradabilité.
- La dégradation de certains ATB génère des produits de transformation dont la présence, la persistance dans l'environnement et les propriétés « antibiotiques » sont méconnues.

3.4.1. Milieux aquatiques et leurs sources de contamination

La figure 3 illustre les concentrations mesurées par les équipes de recherche dans les eaux usées traitées et dans les compartiments récepteurs des milieux aquatiques pour six ATB[6] appartenant à des classes pharmacologiques différentes. Les principales conclusions sont :

- Les rejets des STEU constituent la source principale d'ATB dans les milieux aquatiques. Elle est complétée pour certains ATB par un apport significatif de la contamination diffuse due en particulier au ruissellement et/ou à l'infiltration des eaux depuis les sols agricoles.
- En France, les concentrations médianes des ATB quantifiés au moins une fois (données des travaux de recherche) sont inférieures ou égales à :
  - 17 000 $ng.L^{-1}$ dans les eaux usées brutes hospitalières,
  - 300 $ng.L^{-1}$ dans les eaux usées traitées de STEU,
  - 12 $ng.L^{-1}$ dans la phase dissoute des eaux de surface,
  - 6 $ng.L^{-1}$ dans la phase dissoute des eaux souterraine.
- Des ATB ont été quantifiés dans la quasi-totalité des échantillons d'**eaux usées traitées de STEU**. Une plus grande diversité d'ATB et des concentrations plus élevées ont été observées dans les eaux usées traitées de STEU recevant des eaux usées hospitalières.
- Dans la phase dissoute des **eaux de surface**, les concentrations d'ATB mesurées en aval des rejets de STEU sont plus élevées qu'en amont. Les concentrations décroissent progressivement entre deux zones de rejets (ex : entre les rejets de deux STEU consécutives) : cette diminution est due à la dilution, la sorption et la dégradation dans le milieu récepteur. Une partie des variations temporelles des concentrations en ATB s'explique par :

[6] Ces ATB ont été sélectionnés comme étant ceux pour lesquels le plus grand nombre de données est disponible dans leur classe pharmacologique, pour l'ensemble des matrices considérées.

- Des ruissellements de surfaces contaminées consécutifs à des évènements pluvieux et/ou des surverses de réseaux unitaires (déversement d'eaux usées non traitées ou partiellement traitées),
- Des variations de débit des cours d'eau modifiant le facteur de dilution.

- Dans **les périphytons et les sédiments des eaux de surface,** les concentrations sont inférieures à 100 ng.g MS^{-1}. Alors que les occurrences et les concentrations médianes sont généralement plus élevées dans les périphytons que dans les sédiments, les concentrations maximales ont été mesurées dans les sédiments.
  - Les ATB sorbés sur les sédiments de surface sont remobilisables lors d'événements perturbants la colonne sédimentaire.
  - Les phénomènes de dégradation réduits dans les sédiments conduisent à un archivage des contaminants dans la colonne sédimentaire.
- À l'exception du sulfaméthoxazole, les ATB ne sont que très rarement quantifiés dans les **eaux souterraines**. Toutefois, une fois dans les nappes, les ATB peuvent persister en raison de cinétiques de dégradation très lentes.
- Bien qu'identifié comme une source de contamination potentielle des milieux récepteurs, l'impact des pisciculture sur les concentrations en ATB dans l'environnement n'a pas pu être étudié en raison d'un manque de données.

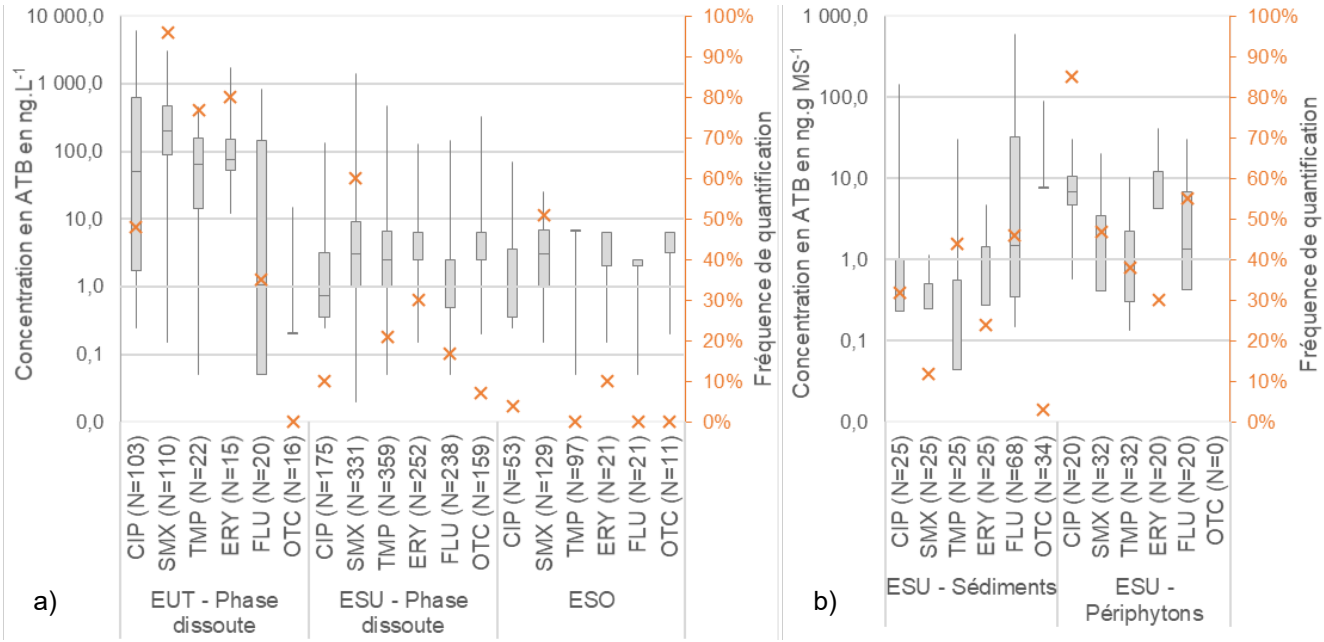


Figure 3. Concentrations de six antibiotiques de classes pharmacologiques différentes mesurées dans les phases dissoutes d'eaux usées traitées et des milieux aquatiques (a) et dans les sédiments et les périphytons (b) en France.

Les ATB sélectionnés sont ceux pour lesquels le plus grand nombre de données est disponible dans leur classe pharmacologique, pour l'ensemble des matrices considérées. Les données ont été produites dans le cadre de programmes de recherche et sont représentées sous forme de boîtes à moustaches (min, P25, médiane, P75 et max) pour les concentrations et de croix pour les fréquences de quantification. Les résultats inférieurs à la limite analytique ont été substitués[5].

CIP=ciprofloxacine, fluoroquinolone ; SMX=sulfaméthoxazole, sulfamide ; TMP=triméthoprime ; ERY=érythromycine, macrolide ; FLU=fluméquine, quinolone ; OTC=oxytétracycline, tétracycline ; EUT=eaux usées traitées ; ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; MS=matières sèches.

3.4.2. Milieux terrestres et leurs sources de contamination

Dans les sols, les seules données existantes portent sur les sols amendés par des PRO. La figure 4 illustre les concentrations mesurées en France dans les boues de STEU, les PRO d'élevage solides et les sols pour six ATB[6].

- Dans **les boues de STEU**, les quinolones et les fluoroquinolones sont les ATB les plus fréquemment quantifiés et dont les concentrations sont les plus élevées (médianes entre 2 600 et 3 000 ng.g MS^{-1} pour l'ofloxacine, la ciprofloxacine et la norfloxacine). Les autres ATB sont retrouvés à des concentrations médianes inférieures à 62 ng.g MS^{-1}.
- La ciprofloxacine est l'ATB le plus fréquemment quantifié dans les **PRO d'élevage solides** (44 %). Cinq ATB (trois tétracyclines et deux fluoroquinolones) présentent des concentrations maximales supérieures à 1 000 ng.g MS^{-1}.
- Dans les **PRO d'élevage liquides**, quatre ATB (deux tétracyclines, une quinolone et un sulfamide) présentent des concentrations maximales supérieures à 1 500 ng.L^{-1}.
- Dans **les sols amendés**, les concentrations médianes observées pour les ATB quantifiés au moins une fois ne dépassent pas 2,1 ng.g MS^{-1}.
  - Les ATB détectés dépendent du type et de la source de PRO.
  - Les variations temporelles de concentrations observées dépendent de la périodicité des amendements par les PRO.
  - Le travail superficiel du sol et un délai de plus de deux semaines entre l'épandage et les événements pluvieux diminuent la mobilité des ATB depuis les sols amendés.

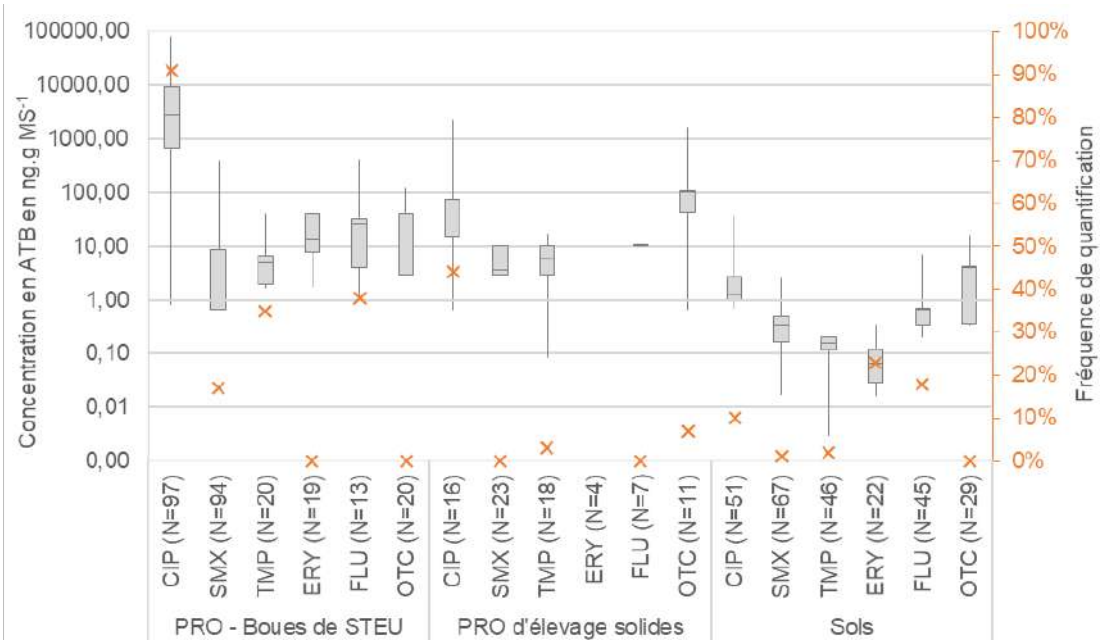


Figure 4. Concentrations de six antibiotiques de classes pharmacologiques différentes mesurées dans les boues de stations de traitement des eaux usées, les produits résiduaires organiques d'élevage solides et les sols en France.

Les ATB sélectionnés sont ceux pour lesquels le plus grand nombre de données est disponible dans leur classe pharmacologique, pour l'ensemble des matrices considérées. Les données ont été produites dans le cadre de programmes de recherche et sont représentées sous forme de boîtes à moustaches (min, P25, médiane, P75 et max) pour les concentrations et de croix pour les fréquences de quantification. Les résultats inférieurs à la limite analytique ont été substitués[5].

CIP=ciprofloxacine, fluoroquinolone ; SMX=sulfaméthoxazole, sulfamide ; TMP=triméthoprime ; ERY=érythromycine, macrolide ; FLU=fluméquine, quinolone ; OTC=oxytétracycline, tétracycline ; EUT=eaux usées traitées ; ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; MS=matières sèches.

3.5. Contamination de l'environnement par les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance

Les BRA et GRA contaminent tous les compartiments récepteurs (sols, eaux, sédiments) à des concentrations qui dépendent de l'exposition de ces milieux (localisée et continue par les rejets de STEU ou intermittente et diffuse par les PRO et le ruissellement), et de leurs capacités de résilience, mettant en jeu des mécanismes de dilution, de dégradation, de prédation et de compétition, pouvant aboutir à la disparition ou la persistance des BRA et GRA (chapitre 7 du rapport d'expertise).

- Les rejets de STEU sont la principale source de BRA et GRA dans les eaux de surface ; et l'épandage de PRO (boues de STEU et PRO d'origine animale) est la principale source de BRA et GRA dans les sols.
- Les concentrations en BRA et GRA d'origine allochtone diminuent dans l'espace à partir des points d'émission dans le milieu récepteur (observation de gradient amont/aval dans les cours d'eau), et dans le temps à l'échelle de plusieurs années dans les archives sédimentaires.
- Les bactéries d'origine fécale survivent difficilement dans l'environnement, et les BRA d'origine fécale plus difficilement encore.
- Les GRA peuvent persister plus longtemps dans l'environnement que les BRA. En effet, les GRA peuvent d'une part persister hors des cellules bactériennes et d'autre part être hébergés par un panel d'espèces bactériennes plus large que celles ciblées dans les études (majoritairement *E. coli* porteur de β-lactamases à spectre étendu (BLSE)).

Les données françaises sont rares ou inexistantes pour certaines sources (PRO, rejets de pisciculture) et certains compartiments étudiés (aquifères souterrains, zones côtières, sols, rhizosphère, phyllosphère, faune sauvage). Ceci peut s'expliquer par l'absence d'études sur ces environnements ou par l'obtention de résultats négatifs non publiés.

3.5.1. Sources de contamination : eaux usées traitées et produits résiduaires organiques

- Les eaux usées brutes hospitalières sont plus concentrées en GRA que les eaux usées brutes domestiques. Par exemple, les eaux usées brutes hospitalières contiennent 10 fois plus de copies d'intégron de résistance *intI1* ($\approx 10^{11}$ copies.L^{-1}) que les eaux usées brutes urbaines. Toutefois, la diversité des GRA est plus importante dans les eaux usées brutes domestiques que dans les eaux usées brutes hospitalières.
- Les procédés de traitement appliqués aux eaux usées ou aux PRO réduisent dans les mêmes proportions les concentrations de bactéries résistantes ou sensibles aux antibiotiques, mais souvent sans les supprimer totalement.
    - Les STEU réduisent les concentrations en GRA et BRA initialement présents dans les eaux usées brutes avec des abattements qui restent faibles sans traitement spécifique (abattements des *E. coli* BLSE et des entérocoques résistants à la vancomycine de l'ordre de 1,5 et de 2,5 log, respectivement).
    - Dans les PRO, la persistance des BRA et des GRA dépend de l'espèce bactérienne ou du gène considéré ainsi que du type de traitement appliqué. Le compostage permet de réduire les concentrations en BRA (de 4 à 6 log) ainsi que certains GRA alors que le simple stockage en fosse et la méthanisation mésophile ont un impact moindre.
- Selon les espèces et les gènes, les BRA et les GRA peuvent se retrouver dans les PRO traités, et par conséquent être disséminés dans le milieu terrestre et ses différents compartiments s'ils sont épandus aux champs.

3.5.2. Milieux aquatiques

La très grande majorité des BRA d'origine fécale retrouvées dans les milieux aquatiques provient de sources anthropiques :

- La présence de BRA et de GRA dans les milieux aquatiques dépend des émissions récurrentes de bactéries fécales par les rejets de STEU, du ruissellement à partir des zones agricoles amendées par des PRO, mais aussi du débordement des réseaux unitaires de collecte des eaux usées lors de fortes pluies.
- Il a été observé une disparition préférentielle de souches d'*E. coli* ou d'*E. faecium* résistantes aux antibiotiques d'origine clinique au profit d'une sous-population sensible, qui s'explique par une plus faible aptitude à survivre dans l'eau.
- Les concentrations en BRA dans les hydrosystèmes karstiques sont corrélées positivement à la pluviométrie et à l'occupation des sols (densité humaine et activité agricole).
- La variabilité spatiale de la contamination reflète le degré d'urbanisation. Comme pour les ATB, il existe un gradient en BRA et les GRA, à partir des points d'émission avec une diminution progressive à l'aval des rejets. Toutefois, ce phénomène de résilience du milieu, n'est plus observé dans des zones soumises à des apports continus et importants en BRA et GRA (ex : proximité immédiate des rejets de STEU).
- Les conséquences attendues du changement climatique en Europe : augmentation de la fréquence des évènements pluvieux extrêmes, allongement des périodes sèches/étiages, et augmentation des températures des cours d'eau, augmentent la vulnérabilité du milieu aquatique à une contamination par les bactéries, dont les BRA.

3.5.3. Milieux terrestres

Très peu d'études décrivent l'état de la contamination des sols par des BRA ou des GRA sur le territoire national. L'essentiel des études vise à évaluer le rôle de certaines pratiques agricoles sur la dissémination des BRA et GRA.

- Les observations, en adéquation avec celles faites dans d'autres pays, décrivent une présence généralisée de ces contaminants au sein des communautés bactériennes des quelques sols agricoles et forestiers étudiés, corroborant le statut de ces sols comme réservoir environnemental de BRA et GRA.
- La présence dans des sols agricoles d'*E. coli* porteurs de $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$[7] est certainement due à l'épandage de fumier de bovins ou au pâturage de bovins, ainsi qu'à la survie à long terme de cette BRA dans les sols.
- La persistance des GRA est liée à la survie de bactéries provenant de la source de contamination, mais aussi de l'enrichissement de certaines bactéries du sol *via* l'apport d'éléments nutritifs par les PRO.
- Les traitements appliqués au fumier (compostage, digestion anaérobie, déshydratation) ou aux boues de STEU (digestion anaérobie, stabilisation à la chaux, traitement thermique) peuvent réduire l'abondance des GRA, limitant ainsi le risque de transmission de ces GRA aux cultures ou aux ressources en eau.
- Les GRA peuvent persister au cours du temps dans les parcelles amendées lorsque les PRO épandus sont contaminés : leurs concentrations ne retrouvent pas systématiquement les valeurs basales après l'arrêt des amendements. La persistance des GRA dépend de nombreux facteurs tels que le climat, la topologie des parcelles amendées, la nature du sol, la fréquence d'épandage, les caractéristiques des PRO épandus ainsi que la composition des communautés bactériennes des sols.

[7] $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ code une BLSE conférant une résistance aux céphalosporines de dernières générations

3.5.4. Faune sauvage

- Les quelques travaux mesurant l'occurrence des BRA dans la faune sauvage aquatique ou terrestre montrent tous l'influence majeure du régime alimentaire des faunes considérées.
- Une étude a montré que la fréquence de détection d'*E. coli* résistants aux céphalosporines de 3e génération est plus importante chez les poissons omnivores se nourrissant des périphytons eux-mêmes contaminés par des rejets de STEU.
- Les animaux sauvages terrestres omnivores ou carnivores sont plus souvent contaminés par les BRA que les herbivores. La fréquence du portage de BRA par des oiseaux marins augmente avec la proximité de l'Homme.
- Les quelques études consacrées aux produits de la mer montrent que ces derniers sont peu contaminés par les BRA et que leur contamination est corrélée à leur proximité des zones contaminées par des bactéries d'origine fécale, par ruissellement après épandage ou par des rejets de STEU.

3.6. Impact potentiel des sélecteurs sur l'antibiorésistance dans l'environnement

La comparaison théorique des concentrations en ATB mesurées dans l'environnement en France avec celles pour lesquelles des effets biologiques ont été démontrés *in vitro* a été effectuée pour quatre classes pharmacologiques (fluoroquinolones, sulfamides, macrolides et tétracyclines) dans la phase dissoute des matrices liquides étudiées. Les conclusions de cet exercice sont les suivantes :

- La somme des concentrations en fluoroquinolones et en macrolides dans les eaux usées traitées de STEU ou dans les rivières les plus contaminées pourraient favoriser la dissémination de l'ABR.
- La somme des concentrations en sulfamides et en tétracyclines dans les phases dissoutes des matrices liquides sont inférieures à celles décrites comme pouvant favoriser la dissémination de l'ABR.

Ces conclusions fournissent une indication sur les classes pharmacologiques les plus susceptibles de favoriser la dissémination de l'ABR dans l'environnement. Elles sont toutefois à interpréter avec précaution puisque les données utilisées et les modalités de l'exercice ne permettent pas de tenir compte de nombreuses incertitudes, dont celles liées aux déterminants de l'exposition bactérienne dans l'environnement suivantes :

- Seule une fraction d'un composé présent dans l'eau ou le sol parvient au contact proche des micro-organismes (notion de bioaccessibilité), puis au niveau de la cible (notion de biodisponibilité) :
  - La bioaccessibilité exprime une contrainte dans le temps et/ou dans l'espace, liée à habitat, et est à prendre en compte en particulier dans les matrices complexes telles que les sols ou les biofilms.
  - La biodisponibilité dépend de la forme (chimique) du composé. Elle est fonction des conditions dans le milieu et de ses interactions avec la matrice environnante.
- Les environnements terrestres ou aquatiques sont potentiellement multicontaminés par les ATB, ETM, et biocides.
  - Les mécanismes de co-sélection permettent d'envisager que la multicontamination par les ATB, les ETM et les biocides pourrait favoriser l'apparition et le maintien de l'ABR. Cet effet cocktail (synergique, additif ou antagoniste) est cependant difficile à anticiper. Si un effet cumulé peut être craint, les rares études menées *in vitro* (notamment des ATB et des ETM) ne montrent pas systématiquement un effet synergique ou additif.

  - Bien que des études *in situ* mettent en évidence une corrélation positive entre la présence d'ETM ou de biocides dans l'environnement et la présence de BRA ou de GRA, les données actuellement disponibles ne permettent pas d'évaluer l'impact potentiel de leur présence sur la dissémination de l'ABR dans l'environnement.
  - Les environnements proches des rejets de STEU ou les sols agricoles amendés par des PRO sont contaminés en permanence par des BRA, des GRA, des ATB, des ETM et des biocides, et hébergent également des espèces bactériennes autochtones potentiellement sources de GRA.
- L'impact des activités anthropiques sur la biologie environnementale est généralement évalué à une échelle macroscopique. Pourtant, l'environnement dans lequel vivent les micro-organismes, étant donné leur taille, est à l'échelle du micromètre. Ainsi, les principes de l'écologie microbienne n'ont pas été suffisamment pris en compte pour l'étude de la résistance aux ATB, notamment à l'échelle de ces microenvironnements.

L'impact des sélecteurs dans l'environnement a principalement été étudié dans les matrices liquides. En effet, dans les matrices solides, la biodisponibilité et la bioaccessibilité des ATB sont difficilement quantifiables. À ce jour, toutes les études sur l'ABR dans les sols ont été menées *via* des approches de déstructuration par homogénéisation des échantillons, négligeant les notions d'habitats microbiens et conduisant à des mesures de BRA ou GRA susceptibles de mésestimer les niveaux d'exposition à l'échelle des agrégats.

Par ailleurs, il est généralement admis que la majorité des bactéries, dans pratiquement tous les environnements, sont intégrées dans des biofilms.

- Les biofilms peuvent être d'une extrême hétérogénéité de structure, de composition chimique et de composition de la communauté bactérienne. Les gradients de pH, d'oxygène et d'autres accepteurs d'électrons et de nutriments organiques peuvent être abrupts et très dynamiques, créant ainsi des microenvironnements distincts.
- Les bactéries vivant dans des biofilms peuvent être plus résistantes aux ATB que les mêmes bactéries à l'état planctonique. En effet,
  - La matrice du biofilm constitue une barrière physique à la pénétration des ATB ;
  - L'épuisement des nutriments dans ces microenvironnements conduit les bactéries à l'état viable mais non cultivable (VBNC) ou de persistance, ce qui peut les rendre moins sensibles aux ATB ;
  - La coopération de la communauté pourrait intervenir, permettant par exemple à des bactéries sensibles aux β-lactamines de survivre à proximité d'individus produisant des β-lactamases qui détruisent ces ATB ;
  - L'évolution de la résistance aux ATB au sein des communautés bactériennes de biofilms serait plus rapide qu'au sein des communautés planctoniques car le transfert horizontal de gènes par conjugaison, par exemple, nécessite une proximité physique des bactéries.

■ État des connaissances sur l'impact des sélecteurs sur l'ABR

Les connaissances sur l'impact des sélecteurs sur l'ABR dans l'environnement sont encore parcellaires. Toutefois, sur la base des études menées *in situ* et de l'analyse des informations précédemment exposées, les conclusions suivantes peuvent être énoncées :

- Concernant l'émergence de nouvelles BRA porteuses de GRA environnementaux
  - L'environnement héberge des communautés microbiennes complexes contenant un grand répertoire de GRA.
  - Les activités anthropiques favorisent la diversification des GRA et leur dissémination dans des espèces bactériennes phylogénétiquement éloignées.
  - Les conditions favorisant l'émergence dans les milieux récepteurs, aquatique ou terrestre, de souches bactériennes pathogènes porteuses de nouveaux GRA d'origine environnementale ou clinique sont résumées dans la figure 5.

- Cette probabilité d'émergence augmente avec l'intensité de la contamination de l'environnement par les bactéries pathogènes et par les agents sélecteurs.

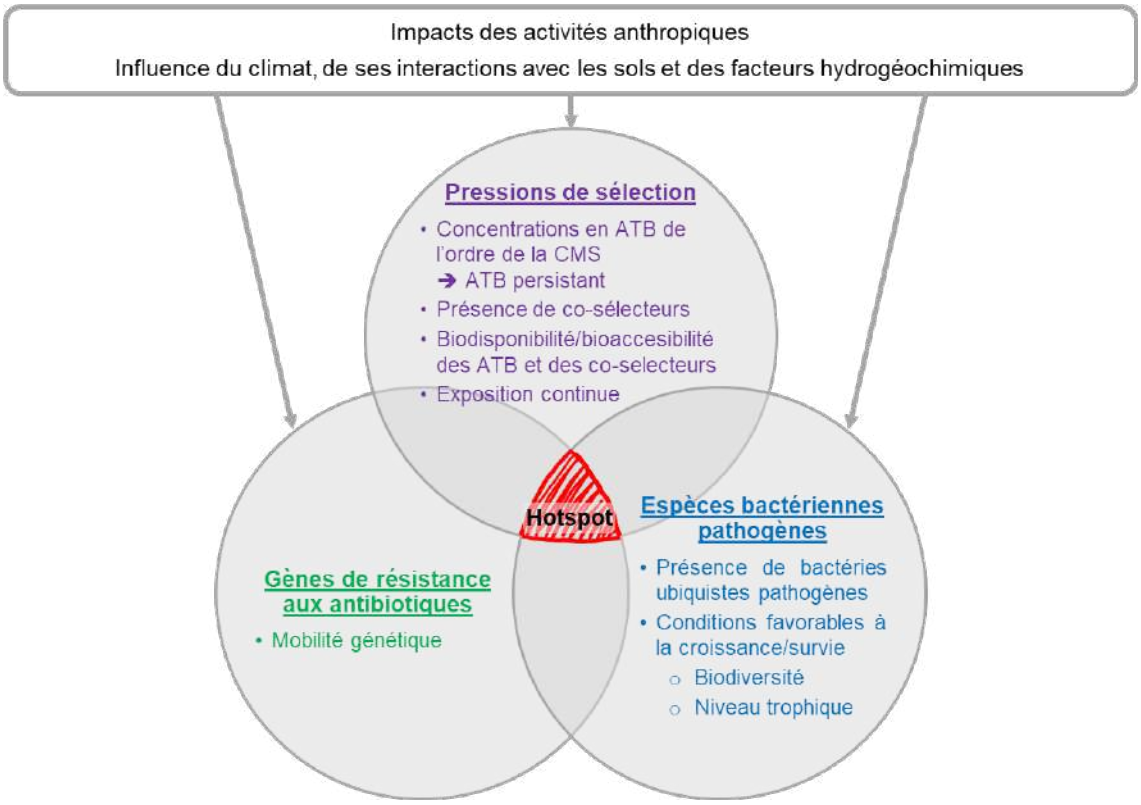


Figure 5. Conditions environnementales favorables au transfert de gènes de résistance aux antibiotiques vers des espèces bactériennes pathogènes.

- Concernant les BRA
  - Seuls les ATB les plus persistants sont détectés dans l'environnement. Ainsi, un environnement contaminé par une BRA ne contient pas, ou plus nécessairement les ATB auxquels elle est résistante (ex : β-lactamines).
  - L'absence de corrélation entre la présence d'*E. coli* et d'*Enterococcus* spp. antibiorésistants dans l'eau et les concentrations en ATB mesurées dans le milieu suggère que la résistance a été acquise dans le tractus digestif des individus sous antibiothérapie (Homme et/ou animal) et non dans l'environnement.
  - Dans les environnements peu ou pas contaminés par des sélecteurs, les BRA d'origine humaine ne se maintiennent pas et/ou sont diluées. Dans ces conditions, la sélection des BRA semble être un mécanisme minoritaire dans la dissémination environnementale de la résistance aux ATB.
- Concernant les GRA
  - Certains auteurs ont observé des corrélations positives entre les concentrations d'ATB et l'abondance de GRA dans certains environnements. Cependant, hormis dans les rejets d'industrie pharmaceutique qui se concentrent principalement en Asie, l'abondance des GRA est corrélée à la contamination fécale plutôt qu'à une sélection par les ATB.
  - Les EGM portent souvent conjointement des gènes de résistance aux ATB, aux ETM et aux biocides. Ainsi, la pression de sélection exercée par un de ces sélecteurs favorise le maintien de l'EGM complet et donc de la résistance aux ATB, aux ETM et aux biocides.

- La transmission de GRA mobiles à des espèces environnementales a été mise en évidence en l'absence de pression de sélection ATB et sans coût métabolique en conditions de laboratoire, ce qui ne peut exclure l'existence d'un tel transfert dans l'environnement. Ainsi, la contamination fécale permettrait la transmission des GRA au résistome environnemental.

En France, la présence d'ATB n'est pas suffisante pour favoriser la survie des BRA et la persistance des GRA dans l'environnement. La présence de co-sélecteur(s), la diversité des communautés bactériennes et l'hétérogénéité des milieux sont autant de facteurs influençant leurs dynamiques spatio-temporelles.

3.7. Recommandations

3.7.1. Préambule

L'état de la contamination de l'environnement par les ATB, BRA et GRA et de ses causes possibles, effectué dans cette expertise, est à repositionner dans le contexte sanitaire, environnemental et socio-économique **français**, dans lequel :

- L'accès aux soins est facilité pour une majeure partie de la population ;
- La prescription d'ATB est réglementée ;
- La production nationale de substances actives d'ATB est pratiquement inexistante ;
- Les systèmes de collecte et d'assainissement collectif des eaux usées sont largement répandus sur le territoire ;
- Les procédés d'hygiénisation des PRO avant leur valorisation agricole se développent.

En France, les milieux aquatiques (eaux et sédiments) semblent jusqu'ici en mesure de dissiper, ou pour le moins de diluer, les apports anthropiques actuels en ATB, BRA et GRA. L'introduction de BRA et/ou de GRA est aujourd'hui rendue possible en tout point de la planète par les flux continus internationaux (personnes, animaux, denrées). Par ailleurs, les connaissances sur le pouvoir sélecteur dans l'environnement de l'ensemble des contaminants (incluant les ATB, les ETM et les biocides), de leurs seuils d'action et de leurs effets combinés restent encore parcellaires. De plus, les capacités de dissipation des écosystèmes dépendent d'équilibres naturels soumis à de nouvelles pressions. Ainsi, au regard des connaissances déjà acquises, il convient d'anticiper les potentielles évolutions liées en particulier :

- Au changement climatique engagé qui modifiera les régimes de précipitation, le niveau des cours d'eau, le ruissellement, la contamination des milieux et l'atténuation des contaminations par la dilution, pouvant mettre en péril les capacités de résilience des écosystèmes récepteurs ;
- Au développement de nouvelles pratiques (réutilisation des eaux usées traitées, recharge artificielle de nappes, stockages d'eau) qui pourraient augmenter la pression anthropique sur l'environnement et ainsi dépasser la capacité de résilience des milieux récepteurs ;
- Au développement de l'industrie pharmaceutique nationale. Une relocalisation sur le territoire français de la fabrication des substances actives, actuellement centralisée dans quelques pays, surtout asiatiques (Chine et Inde), est souhaité au niveau gouvernemental[8]. Dans cette optique, il convient d'assurer que la régulation des rejets de cette industrie en France et en Europe tienne compte de l'impact des ATB sur l'évolution de la résistance aux ATB dans les communautés bactériennes de l'environnement.

[8] https://www.politico.eu/article/europe-still-coming-up-short-on-drug-supplies

3.7.2. Recommandations pour améliorer le suivi de la contamination environnementale par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance

Les données exposées, notamment aux chapitres 6 et 7 du rapport d'expertise, démontrent un socle déjà important de connaissances sur le suivi de la contamination environnementale par les ATB, les BRA et les GRA. Cependant, considérant les difficultés rencontrées pour dresser un bilan des données de contamination de l'environnement, résultant notamment de la diversité des paramètres mesurés et du caractère parcellaire, ponctuel et hétérogène des données à disposition, le GT et le CES estiment capital d'optimiser et de pérenniser les acquisitions de données.

3.7.2.1. Recommandations sur le déploiement d'indicateurs de contamination environnementale

Si le GT et le CES promeuvent une recherche exhaustive dans l'environnement des ATB et de leurs produits de transformation, des BRA, des GRA, de leurs relations et de leur expression, par tous les moyens analytiques actuellement en développement, ils recommandent en complément le déploiement d'indicateurs pour suivre la contamination de l'environnement par les ATB, BRA et GRA. Ces indicateurs permettront une comparaison spatio-temporelle de la dynamique de la contamination environnementale entre les études, mais également dans les différents compartiments. Un indicateur universel étant difficilement concevable, le GT et le CES s'orientent vers la prise en compte de la combinaison de plusieurs indicateurs pour rendre compte de situations environnementales complexes.

Le GT et le CES recommandent que ces indicateurs soient systématiquement suivis dans l'ensemble des études, en complément des paramètres mesurés pour répondre à l'objectif de l'étude ou à la question scientifique, en tenant compte des recommandations de suivis formulées dans le paragraphe 3.7.2.2 ci-dessous.

L'acquisition de données pour ces paramètres permettra de valider ou non leur statut d'indicateurs et de préciser, à terme, leurs conditions d'utilisation. Cette liste minimale pourra être complétée ou simplifiée par l'acquisition de nouvelles connaissances (voir § 3.7.3 du présent avis).

3.7.2.1.1. Indicateurs de contamination environnementale par les antibiotiques

Le suivi des résidus d'ATB permet d'évaluer l'imprégnation des milieux et d'identifier des « hotspots », mais il n'est pas suffisant pour suivre la pression de sélection qu'ils pourraient exercer sur le milieu. Néanmoins, il s'avère nécessaire de disposer, pour une liste minimale de substances actives, de données fiables reposant sur des suivis réguliers sur le long terme, afin d'évaluer les évolutions de la contamination des milieux. Ainsi, considérant :

- Les utilisations d'ATB en médecine humaine et vétérinaire,
- Les données de contamination actuellement disponibles,
- La disponibilité et l'accessibilité des méthodes analytiques (facilité de mise en œuvre, coût, méthodes uniformisées),
- Les ATB suivis dans le cadre de la surveillance existante des milieux aquatiques,
- La dégradation rapide de certaines classes d'ATB dans l'environnement, comme par exemple les pénicillines ;

Les indicateurs de contamination suivants sont proposés :

- **Fluoroquinolones : ciprofloxacine,**
- **Macrolides : érythromycine, clarithromycine et/ou azithromycine,**
- **Sulfamides : sulfaméthoxazole et sulfaméthazine.**

Ces substances actives doivent être suivies à la fois dans les phases dissoutes et particulaires des eaux de surface et souterraines, les sols, les sédiments, les effluents de STEU et les PRO.

Pour ces suivis, des méthodes d'analyse éprouvées et respectant les standards de la normalisation nationale et/ou internationale devront être utilisées, quand ils existent, afin de pouvoir comparer les résultats issus de différentes études.

3.7.2.1.2. Indicateurs de contamination environnementale par les bactéries résistantes aux antibiotiques et gènes de résistance aux antibiotiques

Considérant :

- Les données d'épidémiologie clinique humaine et vétérinaire,
- Les données de contamination actuellement disponibles,
- La disponibilité et l'accessibilité des méthodes analytiques (facilité de mise en œuvre, coût, méthodes uniformisées),
- Les travaux internationaux (JPI-AMR 2019 ; Groupe AGISAR de l'OMS ; EU) qui pointent le besoin de définir des BRA et des GRA indicateurs de contamination communs chez l'Homme, les animaux et dans l'environnement,
- Les indicateurs proposés par d'autres organismes impliqués ;

Le GT et le CES proposent les indicateurs de contamination listés dans le tableau II en précisant les modalités de quantification et d'expression des résultats à utiliser.

Tableau II. Proposition d'indicateurs et modalités de quantification et d'expression des résultats.

Indicateur proposé	Méthode de détermination	Résultats et unités	Intérêts	Limites
***E. coli* résistant aux céphalosporines de 3e génération ou *E. coli* BLSE[a]**	Culture sur milieux sélectifs	- Valeur absolue (CFU.L^{-1}) de préférence - Valeur relative (par rapport à la concentration d'*E. coli* totaux)	- Suivi relativement simple - Indicateurs de vulnérabilité du milieu - Présents dans les sols, eaux, sédiments - Évaluent l'impact anthropique sur l'ABR dans l'environnement - Identifient des hotspots et/ou des périodes à risque de contamination par les BRA d'origine anthropique - Indicateurs utilisés en médecine humaine et vétérinaire	- Ne permettent pas de décrire de nouvelles BRA - Perdent rapidement leur cultivabilité dans l'environnement - Pas de suivi du devenir spatio-temporel à grande échelle
***intI1* ou *sul1*[b]**	qPCR	- Abondance relative (copie de gènes/ADNr 16S) - Nombre de copies.L^{-1} pour les matrices liquides - Nombre de copies.g MS^{-1} pour les matrices solides	- Suivi relativement simple - Informent sur la dynamique de résistance globale - Indicateurs de pression anthropique - Peuvent être couplés avec la recherche de GRA pour apprécier la dynamique de transfert	- N'identifient pas les GRA présents - Méthode non standardisée - Problème possible d'inhibiteurs d'extraction et/ou d'amplification dans certaines matrices environnementales contaminées

[a] Ces deux paramètres se recouvrent partiellement. Actuellement, la résistance aux céphalosporines de 3e génération chez *E. coli* est majoritairement médiée par la production de BLSE ; [b] La mesure de ces deux paramètres est équivalente car *intI1* et *sul1* sont systématiquement présents sur les intégrons de classe 1.

3.7.2.2. Recommandations sur les stratégies de suivi des antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement

Les études descriptives de la contamination environnementale par les ATB, les BRA et/ou les GRA sont nombreuses, mais la plupart ne concerne qu'un compartiment à la fois, et repose sur des campagnes de prélèvements ponctuels (réalisés avec des méthodes d'échantillonnage propres à chaque étude), dans des écosystèmes très variables. Les valeurs générées sont donc difficilement comparables entre les compartiments ou entre les études pour un même compartiment.

Afin de faciliter la comparaison spatio-temporelle de la contamination environnementale par les ATB, BRA et GRA, le GT et le CES recommandent une harmonisation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse afin de permettre la comparaison des paramètres de suivi et des indicateurs.

La communauté scientifique devra participer, quand des manques sont identifiés, à l'établissement ou l'amélioration de protocoles standardisés d'échantillonnage, de préparation, et de conservation des échantillons environnementaux (sols, sédiments, eaux) et des sources de ATB, BRA et GRA (effluents, PRO).

Le GT et le CES recommandent que les futurs plans d'échantillonnage soient dimensionnés pour :

- Suivre la diffusion spatiale et temporelle des ATB, BRA et GRA afin de connaître leur devenir dans les milieux récepteurs ;
- Évaluer la variabilité dans le temps des concentrations en ATB, BRA et GRA dans les milieux récepteurs (ex : rivières, lacs) sur des sites pilotes et/ou sites ateliers instrumentés et représentatifs de la diversité géographique du territoire français.

Plus généralement, le GT et le CES recommandent de favoriser la mutualisation et la comparaison des données acquises sur différents sites et milieux, aux différentes échelles spatiales (*i.e.* transfert sol-nappe, bassin versant) au travers de :

- La création et/ou le renforcement de réseaux de suivi pérennes, représentatifs des différents compartiments de l'environnement et des sources d'ATB, BRA et GRA. Ces données temporelles fiables permettraient d'identifier les tendances évolutives, et de mesurer les effets des politiques publiques visant à réduire la consommation d'ATB en France ;
- La bancarisation systématique des données (y compris des résultats négatifs), particulièrement sur ces réseaux pérennes. Elle pourrait se faire à l'échelle nationale, mais aussi internationale.
- L'usage de contrôles internes et de techniques standardisées, quand ils existent, ou à défaut de procédures garantissant la qualité et la comparabilité des données et des métadonnées associées.
- Un rapprochement des différents outils de surveillance réglementaire (environnementaux et sanitaires) pour mutualiser les efforts.

3.7.3. Recommandations pour consolider et approfondir les connaissances actuelles

3.7.3.1. Besoins de recherche sur la contamination de l'environnement par les antibiotiques

Le GT et le CES ont mis en évidence des besoins dans trois axes principaux concernant le suivi des ATB dans l'environnement :

- *Élargissement du nombre de substances étudiées.* Les connaissances actuelles portent essentiellement sur un nombre assez restreint de substances actives, les autres n'ayant pas de standard ou étant plus complexes à analyser. Ce manque d'informations biaise fortement la connaissance de la réelle contamination des écosystèmes.
    - Des efforts spécifiques de développements méthodologiques doivent être entrepris notamment concernant :

  - Des classes à usage important pour lesquelles peu de données sont disponibles comme les streptogramines,
  - Des classes ATB de dernier recours comme les carbapénèmes ou les polymyxines,
  - Les produits de dégradation de substances actives.
- L'utilisation des méthodes qualitatives d'analyses non ciblées de type « screening » et les méthodes de traitement de données associées sont à considérer pour identifier de nouvelles molécules d'intérêt.

- *Élargissement des matrices étudiées.* Des études spécifiques sur la fraction particulaire des matrices liquides (matières en suspension) ainsi que sur les sédiments et les périphytons doivent être envisagées.
- *Élargissement des connaissances sur l'exposition réelle des bactéries aux ATB.* Les études actuelles quantifient principalement les concentrations totales en ATB. Des études spécifiques permettant de mieux caractériser la partition entre les fractions et de définir la biodisponibilité des ATB et leurs interactions avec les constituants du milieu sont essentielles. Dans ce cadre, des études sont à mener au niveau des microenvironnements bactériens.

3.7.3.2. Besoins d'acquisition de données de contamination par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance

Le GT et le CES estiment qu'il est important d'évaluer plus précisément les contributions relatives des multiples sources de contamination, et de documenter les niveaux de contamination d'autres compartiments récepteurs. Outre la poursuite de l'acquisition de données sur les sources majeures de contamination (effluents de STEU, PRO) et les compartiments déjà suivis (milieu aquatique continental), le GT et le CES recommandent d'étudier la contamination par les ATB, BRA et GRA des environnements suivants :

- *La pisciculture,* en tant que source potentielle de contamination directe dans les compartiments aquatiques.
- *Les eaux côtières* pour lesquelles la contamination par les ATB, les BRA et les GRA est actuellement presque inconnue, bien que des projets soient en cours sur ce sujet.
- *Les milieux terrestres* pour lesquels la contamination en France par les ATB, les BRA et les GRA est presque inconnue concernant :
  - Les sols urbains, périurbains et agroforestiers,
  - Les sites et sols pollués,
  - La rhizosphère et la phyllosphère,
  - Les micro et macrofaunes qui peuvent à la fois constituer des « hotspots » et jouer un rôle de vecteurs de dissémination (vers de terre, arthropodes, *etc.*).
- Et, finalement, toutes *les sources de contamination* pour lesquelles l'absence de donnée n'a pas permis de statuer sur l'existence et/ou l'importance d'un impact sur la contamination globale : assainissement non collectif, sites producteurs de principes actifs ATB ou de médicaments contenant des ATB, anciens sites d'enfouissement de déchets et biodéchets issus des composteurs de proximité.

3.7.3.3. Besoins de développement de nouvelles technologies d'acquisition et de traitement des données

L'expertise menée par le GT et sa synthèse ont aussi permis de pointer des besoins scientifiques et techniques qui pourraient ouvrir de vastes champs de connaissances pour approfondir l'étude de l'ABR :

- *Étude de l'expression des GRA* sous pression anthropique par métatranscriptomique.

- *Développement d'outils numériques de traitement de masse de données* (ex : « machine learning » et « deep learning » basés sur l'intelligence artificielle) pour analyser l'ensemble des données de surveillance de l'environnement et évaluer le risque de maintien de la résistance en fonction de l'exposition aux ATB, GRA et BRA au regard des différents sites et différentes situations.
- *Développement de modèles* de compréhension des interactions et des transferts d'ATB, BRA et GRA dans l'environnement *et d'outils numériques prédictifs* qui permettraient d'anticiper de potentielles évolutions : scénarios de changements climatiques, effet des changements de pratiques d'usages de l'eau, effet des leviers d'actions.

Cette meilleure compréhension de la dynamique de l'ABR dans l'environnement doit permettre d'identifier les liens entre les compartiments et les leviers d'atténuation de la dissémination de l'ABR dans l'environnement, et de développer des stratégies limitant cette dissémination.

3.7.3.4. Besoins de recherche sur les paramètres favorisant la dissémination environnementale des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques correspondants

La connaissance de la persistance puis de la dissémination des BRA et GRA dans l'environnement est le premier prérequis à l'étude de la transmission éventuelle des GRA à des espèces bactériennes pathogènes. Le GT et le CES recommandent que des efforts de recherche soient engagés sur les axes majeurs suivants :

- *Déterminer les concentrations sub-inhibitrices d'ATB, seuls ou en mélange, favorisant la persistance, la dissémination, la sélection et l'émergence de l'ABR* :
  - *In vitro* dans des milieux complexes,
  - Par des expérimentations à différentes échelles (biofilms, mésocosmes, parcelles au champ).
- *Identifier les mécanismes et conditions qui permettent la persistance et la dissémination environnementale des BRA et GRA*. Des questionnements demeurent notamment sur :
  - Le « *fitness* » des BRA (voir § 3.6 du rapport d'expertise) par rapport à leurs parents sensibles, ainsi que le « *fitness* » des BRA dans différentes niches écologiques au sein d'écosystèmes complexes ;
  - Le coût biologique du maintien des GRA dans les BRA à l'échelle de populations et de communautés microbiennes ;
  - Les bactéries à l'état de « *persisters* » (voir § 3.2 du rapport d'expertise).
- *Identifier les mécanismes et conditions qui favorisent le transfert de GRA dans l'environnement.* Le transfert de GRA à des bactéries pathogènes dans l'environnement a jusqu'à lors été documenté *a posteriori*. Des études sont nécessaires pour tenter de prévoir de telles émergences. Elles viseraient à :
  - Identifier les EGM favorisant le recrutement des GRA à partir d'espèces bactériennes environnementales et leur mobilité vers les espèces pathogènes. Ceci nécessitera d'identifier l'environnement génétique des GRA et des espèces porteuses des GRA par l'utilisation de nouveaux outils tels que la métagénomique et la reconstruction de plasmide à partir de données de séquençage ;
  - Identifier de nouveaux GRA dans l'environnement et déterminer leur aptitude et leurs conditions de transfert ;
  - Caractériser plus exhaustivement la composition taxonomique des communautés bactériennes de niches écologiques pertinentes (ex : rhizosphère, masses d'eau) pour rendre compte de la dissémination des GRA entre espèces bactériennes et identifier les espèces bactériennes pathogènes potentiellement réceptrices de ces GRA.
- *Documenter le profil de résistance aux ATB et l'expression des GRA des genres ou espèces bactériens ubiquistes pathogènes* (ex : *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*,

Stenotrophomonas maltophilia, *Aeromonas hydrophila*), dont les caractères culturaux (chimioorganotrophie, température de croissance) seraient favorables aux transferts de BRA ou GRA de l'écosystème naturel (eau, sol, faune et flore) à l'Homme, et inversement. L'objectif est de disposer à terme d'un panel de bactéries sentinelles, indicatrices d'une pression de sélection dans l'environnement.

3.7.3.5. Besoins de recherche sur l'évaluation des capacités maximales de résilience des écosystèmes contaminés de façon continu

Dans le contexte actuel de changement climatique et d'évolution des pratiques évoqués dans le préambule, l'étude de la résilience des milieux récepteurs (faisant intervenir des mécanismes de survie, dilution, prédation) est un axe de recherche à développer. Pour appréhender le devenir des ATB, BRA et GRA, et le rôle des co-sélecteurs (ETM, biocides, pesticides et autres), le GT et le CES recommandent que l'observation *in situ* s'accompagne d'approches en modèles expérimentaux (microcosmes, mésocosmes et parcelles expérimentales). Ces études devront permettre d'anticiper :

- La réponse des milieux face à divers stress abiotiques (présences de résidus d'ATB, crues/orages) ;
- Les effets de nouvelles pratiques (réutilisation des eaux usées, recharge artificielle de nappes, stockage d'eau) ;
- Les impacts du changement climatique, dont la multiplication des évènements extrêmes et la modification des températures ;
- Les points de rupture de la résilience des écosystèmes récepteurs et des fonctions écosystémiques qu'ils soutiennent, au-delà desquels la récupération écologique des milieux récepteurs ne serait plus possible.

Les approches proposées seront nécessairement multidisciplinaires et rassembleront des scientifiques issus de la microbiologie fondamentale, environnementale et clinique, des vétérinaires, des médecins, des pharmaciens, des chimistes, mais également des mathématiciens, informaticiens et des spécialistes des sciences sociales. Leurs résultats pourront orienter les priorités de recherche et d'investissement permettant de réduire la contamination de l'environnement par les ATB, BRA et GRA.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'antibiorésistance constitue un sujet dont les enjeux sanitaires sont majeurs et bien établis à partir de constats répétés de mises en échec de stratégies thérapeutiques face à des bactéries ayant acquis des gènes de résistance aux antibiotiques (Cassini *et al.* 2019). Sans actions déterminées, l'antibiorésistance pourrait devenir l'une des premières causes de mortalité humaine au niveau mondial (O'Neill 2016). Elle mobilise les communautés scientifiques, médicales et vétérinaires au niveau international et national, en France en particulier autour d'une « feuille de route interministérielle pour maîtriser la résistance bactérienne aux antibiotiques » établie en 2016. Le déploiement de cette feuille de route fait l'objet d'un point annuel sur l'avancement des actions menées et les défis à relever dans une approche nécessairement « One Health ». En matière de recherche, il est à noter un dispositif de programmation conjoint au niveau européen (JPI-AMR) et le lancement en 2020, en France, d'un programme prioritaire de recherche au titre des Investissements d'avenir, piloté par l'Inserm et l'ANR (Inserm 2020).

Le rôle du compartiment environnemental a fait l'objet d'investigations et d'attention moins soutenues que d'autres volets du sujet, c'est pourquoi l'Agence a été saisie par les ministères chargés de la santé, de l'alimentation et de l'écologie pour dresser un état des connaissances sur la contamination de l'environnement et les mécanismes sous-jacents à la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement. Issue également de la feuille de route de 2016, cette

saisine vient compléter, sur des aspects plus fondamentaux, la revue systématique de littérature portant sur les solutions efficaces pour réduire la contamination de l'environnement par les antibiorésistances (Goulas *et al.* 2018 ; Goulas *et al.* 2020) commanditée par le CGDD auprès d'un consortium scientifique.

Au cours de cette expertise, ciblée sur le compartiment environnemental, à la fois récepteur des rejets anthropiques et réservoir d'un patrimoine bactérien presque incommensurable (10^{11} à 10^{12} espèces bactériennes au total dont seulement une centaine d'intérêt médical), les experts ont explicité la complexité des mécanismes à l'œuvre dans ce compartiment. Ils ont étudié à la fois la contamination et le devenir des antibiotiques, des bactéries résistantes et des gènes de résistance dans les milieux terrestres et aquatiques. Les mécanismes de dégradation / accumulation qui prévalent pour les substances chimiques sont, pour ce sujet, inapplicables : les processus qui gouvernent la dissémination des antibiotiques et de leurs produits de transformation, la pression de sélection exercée sur les bactéries par les sélecteurs présents dans l'environnement, la présence de gènes de résistances mobiles ou encore les conditions favorables ou non à la survie et la croissance d'espèces bactériennes pathogènes, résistantes ou non, sont autant de paramètres à considérer. Les mécanismes à l'œuvre sont à la fois fortement plurifactoriels et multi-échelles (par exemple, bactérie/population/communauté), ce qui conduit à des dynamiques variables dans l'espace et le temps.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations des experts du GT « Antibiorésistance et environnement » et du CES « Eaux » relatives à ces travaux sur l'antibiorésistance dans l'environnement.

Au regard de la complexité que l'état des connaissances a mis en évidence, l'Agence soutient les recommandations des experts pour fédérer et rationnaliser les efforts aussi bien en matière de suivi que d'études. Ces préconisations ont trait tant aux méthodes (méthodes analytiques, indicateurs, bancarisation des données), qu'aux stratégies (milieux cibles, suivi pérenne, caractérisation des sites) pour que les résultats puissent être exploités dans l'optique de décrypter la complexité décrite ci-dessus. Ce n'est qu'au prix des efforts de chaque équipe de recherche pour s'assurer du caractère « interconnectable » des résultats que le défi pourra être relevé.

Enfin, au-delà d'une meilleure appréhension des mécanismes à l'œuvre au sein de l'environnement en matière d'antibiorésistance, l'Agence souligne également la recommandation des experts de travailler sur la capacité de résilience des écosystèmes et de l'environnement pour, *via* une approche plus globale, faire face aux évolutions de fond qui peuvent peser sur l'antibiorésistance : celles associées à l'évolution choisie des pratiques de prescription ou d'administration – tant en santé humaine qu'en santé animale – mais aussi celles associées à de nouvelles pratiques (réutilisation d'eaux usées traitées, recharge artificielle de nappes d'eau souterraine, *etc.*) ou suite à la pression, dans ses différentes formes, du changement climatique.

Roger Genet

MOTS-CLES

Antibiorésistance, Antibiotiques, Bactéries résistantes aux antibiotiques, Gènes de résistance aux antibiotiques, Milieu aquatique, Milieu terrestre, Eaux usées traitées, Produits résiduaires organiques, Concentration minimale sélective

Antibiotic resistance; Antibiotics; Antibiotic resistant bacteria; Antibiotic resistance genes; Aquatic environment; Terrestrial environment; Wastewater, Organic Waste Product; Minimum selective concentration

BIBLIOGRAPHIE

Banque mondiale. 2019. "Indicateurs." Consulté le 27/06/2019. https://donnees.banquemondiale.org/indicateur.

Carlet, J. et P. Le Coz. 2015. *Propositions du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques - Tous ensemble, sauvons les antibiotiques.* https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_antibiotiques.pdf.

Cassini, A., L. D. Högberg, D. Plachouras, A. Quattrocchi, A. Hoxha, G. S. Simonsen, M. Colomb-Cotinat, M. E. Kretzschmar, B. Devleesschauwer, M. Cecchini, D. A. Ouakrim, T. C. Oliveira, M. J. Struelens, C. Suetens, D. L. Monnet, R. Strauss, K. Mertens, T. Struyf, B. Catry, K. Latour, I. N. Ivanov, E. G. Dobreva, A. Tambic Andraševic, S. Soprek, A. Budimir, N. Paphitou, H. Žemlicková, S. Schytte Olsen, U. Wolff Sönksen, P. Märtin, M. Ivanova, O. Lyytikäinen, J. Jalava, B. Coignard, T. Eckmanns, M. Abu Sin, S. Haller, G. L. Daikos, A. Gikas, S. Tsiodras, F. Kontopidou, Á. Tóth, Á. Hajdu, Ó. Guólaugsson, K. G. Kristinsson, S. Murchan, K. Burns, P. Pezzotti, C. Gagliotti, U. Dumpis, A. Liuimiene, M. Perrin, M. A. Borg, S. C. de Greeff, J. C. M. Monen, M. B. G. Koek, P. Elstrøm, D. Zabicka, A. Deptula, W. Hryniewicz, M. Caniça, P. J. Nogueira, P. A. Fernandes, V. Manageiro, G. A. Popescu, R. I. Serban, E. Schréterová, S. Litvová, M. Štefkovicová, J. Kolman, I. Klavs, A. Korošec, B. Aracil, A. Asensio, M. Pérez-Vázquez, H. Billström, S. Larsson, J. S. Reilly, A. Johnson et S. Hopkins. 2019. "Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis." *The Lancet Infectious Diseases* 19 (1): 56-66. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4.

Collignon, P., J. J. Beggs, T. R. Walsh, S. Gandra et R. Laxminarayan. 2018. "Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: A univariate and multivariable analysis." *The Lancet Planetary Health* 2 (9): e398-e405. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4.

Comité interministériel pour la santé. 2016. Feuille de route interministérielle de maîtrise de l'antibiorésistance.

Commission Européenne. 2017. Plan d'action européen fondé sur le principe « Une seule santé » pour combattre la résistance aux antimicrobiens.

Dinh, Q. T., E. Moreau-Guigon, P. Labadie, F. Alliot, M. J. Teil, M. Blanchard, J. Eurin et M. Chevreuil. 2017. "Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network." *Science of The Total Environment* 575: 758-766. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.118.

Fekadu, S., E. Alemayehu, R. Dewil et B. Van der Bruggen. 2019. "Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge." *Science of The Total Environment* 654: 324-337. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072.

Goulas, A., D. Belhadi, A. Descamps, A. Andremont, P. Benoit, S. Courtois, C. Dagot, N. Grall, D. Makowski, S. Nazaret, S. Nélieu, D. Patureau, F. Petit, C. Roose-Amsaleg, M. Vittecoq, B. Livoreil et C. Laouénan. 2020. "How effective are strategies to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review." *Environmental Evidence* 9 (1): 4. https://doi.org/10.1186/s13750-020-0187-x.

Goulas, A., B. Livoreil, N. Grall, P. Benoit, C. Couderc-Obert, C. Dagot, D. Patureau, F. Petit, C. Laouénan et A. Andremont. 2018. "What are the effective solutions to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review protocol." *Environmental Evidence* 7 (1): 3. https://doi.org/10.1186/s13750-018-0118-2.

Inserm. 2020. *Programme prioritaire de recherche - Antibiorésistance.* Institut national de la santé et de la recherche médicale - Premier ministre - Ministère de la transition écologique et solidaire - Ministère des solidarités et de la santé - Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation - Ministère de l'agriculture et de l'alimentation - Investir l'avenir - Agence nationale de la recherche (Paris). https://i3m.aviesan.fr/Local/ihp/files/354/PPRAntibioresist25NovembreWeb.pdf.

Larsson, D. G. J. 2014. "Pollution from drug manufacturing: Review and perspectives." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1656): 20130571. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0571.

Larsson, D. G. J., C. de Pedro et N. Paxeus. 2007. "Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals." *Journal of Hazardous Materials* 148 (3): 751-755. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008.

MEDDE. 2015. Feuille de route 2015 issue des trois tables rondes de la Conférence environnementale. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie.

O'Neill, J. 2016. *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations.* http://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf.

OMS. 2017a. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.* Organisation mondiale de la santé.

OMS. 2017b. "L'approche multisectorielle de l'OMS « Un monde, une santé »." Organisation mondiale de la santé. Consulté le 25 avril 2019. https://www.who.int/features/qa/one-health/fr/.

Tell, J., D. J. Caldwell, A. Häner, J. Hellstern, B. Hoeger, R. Journel, F. Mastrocco, J. J. Ryan, J. Snape, J. O. Straub et J. Vestel. 2019. "Science-based targets for antibiotics in receiving waters from pharmaceutical manufacturing operations." *Integrated Environmental Assessment and Management* 15 (3): 312-319. https://doi.org/10.1002/ieam.4141.

Antibiorésistance et environnement
État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques

Saisine 2016-SA-0252 - Antibiorésistance et environnement

RAPPORT
d'expertise collective

GT « Antibiorésistance et environnement »

Novembre 2020

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail,
14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort Cedex
Téléphone : + 33 (0)1 49 77 13 50 - Télécopie : + 33 (0)1 49 77 26 26 - www.anses.fr

ANSES/PR1/9/01-04 [version d]

Mots clés

Antibiorésistance, Antibiotiques, Bactéries résistantes aux antibiotiques, Gènes de résistance aux antibiotiques, Milieu aquatique, Milieu terrestre, Eaux usées traitées, Produits résiduaires organiques, Concentration minimale sélective

Antibiotic resistance; Antibiotics; Antibiotic resistant bacteria; Antibiotic resistance genes; Aquatic environment; Terrestrial environment; Wastewater, Organic Waste Product; Minimum selective concentration

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae,* et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Didier HOCQUET - Université de Bourgogne Franche-Comté - Bactéries pathogènes résistances ; Rejets hospitaliers ; Pression de sélection des résistances (antibiotiques et anticancéreux)

Vice-président jusqu'à août 2019

M. Pierre MARIS - Retraité - Résistances aux biocides ; Résistances croisées ; Biocides (dont réglementation) - Démission en août 2019

Membres

Mme Sandrine BARON - Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané - Antibiorésistance ; Pisciculture ; Méthodes de biologie moléculaire pour étudier l'antibiorésistance

Mme Delphine BIBBAL - École Nationale Vétérinaire de Toulouse - Vétérinaire ; Épidémiologie environnementale ; Antibiorésistance ; Hygiène alimentaire ; Microbiote animale

M. Olivier CHESNEAU - Institut Pasteur Paris - Bactériologie ; Souches cliniques ; Staphylocoques

M. Christophe DAGOT - Université de Limoges, UMR Inserm 1092, RESINFIT - Antibiorésistance : intégrons - Génie des procédés - Qualité des effluents (antibiotiques et bactéries résistantes)

Mme Marisa HAENNI - Anses, Laboratoire de Lyon - Bactériologie ; Antibiorésistance ; Mesure et mécanismes de résistance

M. Jérôme LABANOWSKI - Université de Poitiers - UMR CNRS 7285 IC2MP - École Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers - Qualité des effluents (antibiotiques et bactéries résistantes) ; Biofilm en rivière ; Sédiments ; Devenir des contaminants effluents-rivière

M. Fabrice MARTIN-LAURENT - INRAE - Biodégradation des xénobiotiques dans les sols ; Écologie microbienne des sols

Mme Sylvie NAZARET - Université Lyon 1 - Écologie bactérienne des sols ; Bactéries résistantes des sols ; Lien sol-plante ; Réponses bactériennes aux stress environnementaux

Mme Fabienne PETIT - Université de Rouen - Antibiorésistance ; Écologie bactérienne dans les milieux aquatiques - Pression de sélection des résistances

Mme Anne-Marie POURCHER - INRAE - Effluents urbains et d'élevage et bactéries résistantes

Mme Anne TOGOLA - BRGM - Métrologie environnementale ; Contaminants chimiques organiques dans les milieux aquatiques

M. Edward TOPP - Agriculture and Agri-Food Canada, University of Western Ontario Antibiorésistance et environnement (sols, eau) ; Microbiologie ; Antibiotiques

Mme Michèle VIALETTE - Institut Pasteur de Lille - Hygiène hospitalière et antibiorésistance ; Analyse en bactériologie ; Bactéries pathogènes pour l'Homme

RAPPORTEURS POUR LA RELECTURE DU RAPPORT

M. Johnny GASPÉRI - Chercheur - Université Gustave Eiffel - Micropolluants organiques, eaux urbaines, eaux de surface, traitements des eaux usées.

M. Jean-Yves MADEC - Directeur scientifique Antibiorésistance et Chef de l'Unité antibiorésistance et virulence bactérienne - Laboratoire de Lyon, Anses - Antibiorésistance

M. Laurent MOULIN - Responsable du département recherche et développement - Eau de Paris - Microbiologie, virologie, traitements de désinfection, amibes.

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- **CES « Eaux »**

Président

M. Gilles BORNERT - Chef de service, Groupe vétérinaire des armées de Rennes - Microbiologie, réglementation, situations dégradées, water defense.

Membres

Mme Claire ALBASI - Directrice de recherche / Docteur ingénieur - UMR 5503, Laboratoire de génie chimique, CNRS-INPT-UPS, Toulouse - Produits et procédés de traitement de l'eau dont membranes, assainissement, chimie de l'eau, utilisation de ressources en eau alternatives.

Mme Sophie AYRAULT - Chef d'équipe / Docteur habilité à diriger des recherches, CEA, Gif-sur-Yvette - Géochimie des métaux dans l'environnement.

M. Jean BARON - Responsable de département / Ingénieur de recherche, Eau de Paris - Matériaux au contact de l'eau, produits et procédés de traitement de l'eau (filières de traitement), corrosion.

M. Jean-Luc BOUDENNE - Professeur - Université Aix-Marseille - Métrologie des eaux, chimie et qualité des eaux. Laboratoire Chimie de l'environnement.

Mme Corinne CABASSUD - Professeure - INSA, Toulouse - Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, UMR INSA-CNRS-INRAE - Produits et procédés de traitement de l'eau dont membranes, chimie de l'eau.

Mme Véronique CARON - Expert médical en santé au travail - INRS - Médecin du travail en charge du risque biologique (zoonotique) et milieu de travail (démission au 1er septembre 2020).

M. Jean CARRÉ - Retraité, Docteur en sciences - Hydrogéologie, ressources en eau, périmètres de protection des captages et expérience terrain.

Mme Hélène CELLE-JEANTON - Professeure - Université Franche Comté - Hydrogéologie, hydrogéochimie.

M. Nicolas CIMETIERE - Enseignant chercheur - École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes - Analyse et traitement des eaux (EDCH, micropolluants organiques).

M. Christophe DAGOT - Université de Limoges - UMR Inserm 1092, RESINFIT – Antibiorésistance : intégrons - Génie des procédés - Qualité des effluents (antibiotiques et bactéries résistantes)

Mme Isabelle DUBLINEAU - Chargée de mission auprès du directeur de la radioprotection de l'Homme / Docteur habilité à diriger des recherches - IRSN, Fontenay-aux-Roses – Toxicologie, Radioéléments.

M. Johnny GASPÉRI - Chercheur - Université Gustave Eiffel - Micropolluants organiques, eaux urbaines, eaux de surface, traitements des eaux usées.

M. Jean-Louis GONZALEZ - Chercheur HDR - IFREMER - Milieu marin, contaminants chimiques, spéciation, modélisation, échantillonnages passifs.

M. Jean-François HUMBERT - Directeur de recherche / Docteur habilité à diriger des recherches - UMR BIOENCO, INRAE, Paris - Microbiologie de l'eau dont cyanobactéries, écologie microbienne.

M. Frédéric HUNEAU - Chef du département Géologie Hydrogéologie - Université de Corse - Hydrogéologie, hydrogéochimie.

M. Yves LÉVI - Professeur de santé publique et environnement – Université Paris Sud – Santé publique, Santé environnement, polluants émergents, évaluation de risques sanitaires, écologie microbienne.

M. Laurent MOULIN - Responsable du département recherche et développement - Eau de Paris - Microbiologie, virologie, traitements de désinfection, amibes.

M. Daniel PERDIZ - Maître de conférences / Pharmacien toxicologue - Université Paris 11 Sud - Toxicologie, génotoxicité, perturbateurs endocriniens dans l'eau.

Mme Fabienne PETIT - Enseignant chercheur / Professeur - Université de Rouen / UMR CNRS M2C - Écologie microbienne.

M. Mohamed SARAKHA - Professeur - Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal - Produits et procédés de traitement de l'eau, photochimie, oxydation avancée, chimie réactionnelle de l'eau.

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT - Professeur - Université d'Auvergne / Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand - Santé publique et environnement, épidémiologie, évaluation de risques sanitaires.

Mme Anne TOGOLA - Chef de projet de recherche, BRGM - Micropolluants organiques, chimie analytique, eaux souterraines

Mme Michèle TREMBLAY - Docteur en médecine spécialiste en santé communautaire / Médecin conseil en santé au travail et en maladies infectieuses - Institut de santé publique du Québec / Direction de santé publique de Montréal - Santé travail, microbiologie de l'eau.

Mme Michèle VIALETTE - Chef de service / Docteur habilité à diriger des recherches, Institut Pasteur de Lille - Microbiologie de l'eau dont virologie.

Mme Bénédicte WELTÉ - Retraitée, Docteur en sciences - Produits et procédés de traitement de l'eau (tous procédés, filières de traitement).

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

Mme Morgane BACHELOT - Coordinatrice d'expertise scientifique, Unité d'évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation des risques - Anses

Contribution scientifique aux travaux du GT

M. Damien BOUCHARD - Expert antibiotique et antibiorésistance, Mission antibiorésistance, Agence nationale du médicament vétérinaire - Anses

Mme Louisiane CALSAT - Stagiaire, Unité d'évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation des risques – Anses

Pascale PANETIER - Chef de l'Unité d'évaluation des risques liés à l'eau, Direction de l'évaluation des risques - Anses

Appui scientifique et technique sur les actions de luttes contre l'ABR en Europe et en France

M. Jean-Yves MADEC - Directeur scientifique Antibiorésistance et Chef de l'Unité antibiorésistance et virulence bactérienne, Laboratoire de Lyon - Anses

Appui scientifique et technique sur la contamination des eaux côtières par les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques

Thomas BRAUGE - Chargé de projet scientifique, Unité bactériologie et parasitologie des produits de la pêche et de l'aquaculture, Laboratoire de Sécurité des Aliments - Anses

Anne BRISABOIS - Directrice scientifique sécurité des aliments - Anses

Graziella MIDELET - Chef de l'Unité bactériologie et parasitologie des produits de la pêche et de l'aquaculture, Laboratoire de Sécurité des Aliments - Anses

Contribution scientifique sur l'impact des biocides dans l'environnement

M. Arnaud BRIDIER - Chargé de projet de recherche, unité Antibiotiques, biocides, résidus et résistance, Laboratoire de Fougères - Anses

M. Christophe SOUMET - Chef de l'unité Antibiotiques, biocides, résidus et résistance, Laboratoire de Fougères - Anses

Secrétariat administratif

Mme Virginie SADÉ - Direction de l'évaluation des risques - Anses

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Consortium scientifique pour la réalisation d'une revue systématique sur les solutions pour contrôler la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement

Anaïs GOULAS - Chargée de mission - Systematic Review: Solutions to Control Antibiotic Resistance in the Environment (SCARE) - UMR 1137 IAME, INSERM, Universités Paris Diderot et Paris Nord

CONTRIBUTIONS EXTÉRIEURES AUX COLLECTIFS

Transmission des « Données de ventes d'antibiotiques en médecine humaine en France en 2017 et 2018 » : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (Ansm) 2020.

Transmission des « Données issues d'analyses réalisées dans le cadre de l'observatoire SIPIBEL, rendues communes dans la base DoMinEau » : Groupe de recherche, animation technique et information sur l'eau (GRAIE) 2019.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants **3**
Sigles et abréviations **13**
Définitions **15**
Liste des tableaux **18**
Liste des figures **20**

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise **22**
1.1 Contexte **22**
1.2 Objet de la saisine **23**
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation **24**
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts **24**

2 Cadrage de la saisine **25**
2.1 Délimitation du champ de la saisine **25**
2.1.1 Rappel de l'objectif du travail 25
2.1.2 Caractérisation de l'antibiorésistance 25
2.1.3 Environnement 25
2.1.4 Zone géographique considérée 26
2.2 Questions traitées **26**
2.3 Antibiotiques, bactéries résistantes aux antibiotiques et gènes de résistance aux antibiotiques considérés dans cette expertise **26**
2.3.1 Antibiotiques 26
2.3.1.1 Consommation d'antibiotiques en France 29
2.3.1.2 Antibiotiques classés comme critiques en lien avec la problématique de l'antibiorésistance 31
2.3.2 Bactéries résistantes et supports génétiques de la résistance 32

3 Généralités sur l'antibiorésistance **35**
3.1 Origine(s) naturelle(s) des antibiotiques et de l'antibiorésistance **35**
3.2 Définition et caractérisation d'un phénotype de résistance **36**
3.3 Mécanismes et génétique de la résistance aux antibiotiques **38**
3.4 Modes de dissémination de la résistance aux antibiotiques **40**
3.5 Autres éléments de résistance associés aux gènes de résistance aux antibiotiques 43
3.5.1 Résistance bactérienne aux éléments traces métalliques 44
3.5.2 Résistance bactérienne aux biocides 44
3.6 Dynamique de la résistance dans le temps et l'espace **45**

4 Mécanismes sous-jacents à l'émergence et à la persistance de l'antibiorésistance dans l'environnement **47**
4.1 Résistance à l'échelle cellulaire **47**
4.1.1 Réponses bactériennes à la présence d'antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices 47
4.1.1.1 Sélection de mutants bactériens résistants préexistants 47
4.1.1.2 Sélection *de novo* de mutants bactériens résistants 47

4.1.1.3 Modification de la physiologie de la bactérie et phénotypes « hypermutateurs » 48
4.1.1.4 Réponse SOS et émergence de mutants résistants 48
4.1.2 Mécanismes de co-sélection 49
4.2 Résistance à l'échelle des communautés bactériennes 50
4.2.1 Survie des bactéries allochtones dans l'environnement 50
4.2.1.1 Notions générales sur la compétition de niches microbiennes 50
4.2.1.2 Mécanismes généraux, facteurs d'implantation 50
4.2.1.3 Principales données de survie par espèce bactérienne 51
4.2.1.4 Cas spécifique de la survie des bactéries résistantes aux antibiotiques 52
4.2.2 Conditions environnementales favorisant l'émergence d'espèces bactériennes pathogènes résistantes 52
4.2.2.1 L'environnement comme réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques 52
4.2.2.2 Conditions de transfert d'un gène de résistance aux antibiotiques vers des espèces pathogènes 53
4.2.2.3 Dissémination horizontale des gènes de résistance aux antibiotiques après acquisition par une bactérie pathogène 53
4.2.2.4 Évolution d'un gène de résistance aux antibiotiques au sein d'une bactérie résistante aux antibiotiques 53
4.3 Synthèse 54
4.3.1 À l'échelle cellulaire 54
4.3.2 À l'échelle de la communauté bactérienne 54

5 Caractéristiques des milieux et des méthodes considérés pour définir l'état de la contamination 56
5.1 Milieux considérés 56
5.1.1 Sources de contamination de l'environnement 56
5.1.1.1 Eaux usées et eaux usées traitées 57
5.1.1.1.1 Classification des eaux usées 57
5.1.1.1.2 Types d'eaux usées brutes d'intérêt dans la présente saisine 58
5.1.1.1.3 Collecte et traitement des eaux usées 60
5.1.1.1.4 Assainissement collectif : stations de traitement des eaux usées urbaines 61
5.1.1.1.5 Rejets urbains par temps de pluie dans les réseaux unitaires 62
5.1.1.2 Produits résiduaires organiques (PRO) 63
5.1.1.2.1 Boues de stations de traitement des eaux usées 64
5.1.1.2.2 Lisiers et fumiers 64
5.1.1.2.3 Épandage 65
5.1.1.3 Eaux en sortie de pisciculture d'eau douce 67
5.1.1.4 Sources potentielles de contamination non étudiées dans le rapport par manque de données 67
5.1.1.4.1 Assainissement non collectif (ANC) 67
5.1.1.4.2 Eaux usées d'industries productrices d'antibiotiques 68
5.1.1.4.3 Anciens sites d'enfouissement des déchets 68
5.1.1.4.4 Biodéchets issus des composteurs de proximité 69
5.1.2 Compartiments récepteurs de l'environnement 69
5.1.2.1 Milieux aquatiques 69
5.1.2.1.1 Eaux de surface continentales 70
5.1.2.1.2 Eaux souterraines 70
5.1.2.1.3 Eau littorale 71
5.1.2.1.4 Cadre réglementaire 72
5.1.2.2 Milieux terrestres 73
5.1.2.2.1 Sols 73
5.1.2.2.2 Flore 74
5.1.2.3 Faune sauvage 75
5.1.3 Évolutions liées au changement climatique et aux modifications des pratiques liées à l'économie circulaire 75
5.2 Méthodes de détection et de quantification des antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement 75
5.2.1 Méthodes d'échantillonnage 75
5.2.1.1 Échantillonnage des matrices liquides 76

5.2.1.2 Échantillonnage de sédiments ... 77
5.2.1.3 Échantillonnage des périphytons des cours d'eau ... 77
5.2.1.4 Échantillonnage des produits résiduaires organiques ... 78
5.2.1.5 Échantillonnage des sols ... 78
5.2.1.6 Conservation des échantillons ... 79
5.2.2 Quantification des antibiotiques dans l'environnement ... 79
5.2.2.1 Méthodes de quantification ... 79
5.2.2.1.1 Méthodes d'extraction ... 79
5.2.2.1.2 Méthodes d'analyse ... 80
5.2.2.2 Verrous méthodologiques ... 81
5.2.2.2.1 Complexité analytique ... 81
5.2.2.2.2 Disponibilité des standards analytiques ... 82
5.2.2.3 Méthodes alternatives ... 82
5.2.3 Détection et quantification des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement ... 82
5.2.3.1 Méthodes dépendantes de la culture ... 82
5.2.3.2 Méthodes indépendantes de la culture ... 84
5.2.3.2.1 Approche ciblée de la détection des supports génétiques de la résistance ... 85
5.2.3.2.2 Approche non ciblée de la détection des supports génétiques de la résistance ... 86
5.2.4 Indicateurs et surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement ... 86
5.3 Synthèse ... 88
5.3.1 Milieux considérés ... 88
5.3.2 Méthodes de détection et de quantification ... 90

6 Contamination de l'environnement par les antibiotiques ... 91
6.1 Bilan des données de contamination de l'environnement par les antibiotiques en France ... 91
6.1.1 Données disponibles et modalités de traitement des données ... 91
6.1.1.1 Recensement, sélection et traitement des données ... 91
6.1.1.1.1 Recensement des données produites par des équipes de recherche ... 91
6.1.1.1.2 Recensement des données issues des bases de données sur la contamination de l'environnement ... 91
6.1.1.1.3 Traitement des données ... 92
6.1.1.2 Antibiotiques pour lesquels aucune donnée de contamination n'est disponible ... 92
6.1.1.3 Description générale des données exploitées ... 93
6.1.1.3.1 Données produites par des équipes de recherche exploitées de manière agrégée ... 93
6.1.1.3.2 Données du Système d'information sur l'eau ... 94
6.1.2 Sources de contamination de l'environnement par les antibiotiques ... 94
6.1.2.1 Eaux usées ... 95
6.1.2.1.1 Eaux usées brutes issues d'établissements de soins ... 95
6.1.2.1.2 Eaux usées traitées urbaines ... 97
6.1.2.1.3 Eaux usées d'abattoirs ... 99
6.1.2.2 Eaux en sortie de pisciculture d'eau douce ... 99
6.1.2.3 Produits résiduaires organiques ... 100
6.1.2.3.1 Produits résiduaires organiques d'origine humaine ... 100
6.1.2.3.2 Produits résiduaires organiques d'origine animale ... 101
6.1.2.3.3 Impact du traitement des produits résiduaires organiques sur les concentrations en antibiotiques ... 102
6.1.3 Compartiments récepteurs de l'environnement ... 103
6.1.3.1 Caractéristiques des données disponibles ... 103
6.1.3.1.1 Répartition géographique des données disponibles ... 103
6.1.3.1.2 Données produites par les équipes de recherche ... 104
6.1.3.1.3 Données du système d'information sur l'eau (SIE) ... 105
6.1.3.2 Milieux aquatiques ... 108
6.1.3.2.1 Eaux de surface continentale ... 108
6.1.3.2.2 Eaux souterraines ... 110
6.1.3.3 Sols et sols amendés ... 111
6.2 Devenir des antibiotiques dans l'environnement ... 112
6.2.1 Processus contrôlant le devenir des antibiotiques ... 112
6.2.1.1 Partition ... 113

6.2.1.2 Dégradation ... 114
6.2.1.3 Transport ... 117
6.2.2 Devenir spatio-temporel dans les milieux aquatiques ... 117
6.2.2.1 Eaux de surface ... 117
6.2.2.1.1 Influence des sources de contamination ... 117
6.2.2.1.2 Influence des facteurs hydrologiques ... 118
6.2.2.1.3 Influence des processus ... 119
6.2.2.2 Eaux souterraines ... 120
6.2.2.2.1 Influence des sources de contamination ... 120
6.2.2.2.2 Influence des facteurs hydrogéochimiques ... 121
6.2.2.2.3 Influence des processus ... 122
6.2.3 Devenir spatio-temporel dans les milieux terrestres ... 122
6.3 Synthèse ... 124
6.3.1 Milieux aquatiques et leurs sources de contamination ... 124
6.3.2 Milieux terrestres et ses sources de contamination ... 126

7 Contamination de l'environnement par les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance ... 128
7.1 Bilan des données de contamination de l'environnement par les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance en France 128
7.1.1 Sources de contamination de l'environnement ... 128
7.1.1.1 Les stations de traitement des eaux usées ... 128
7.1.1.1.1 Eaux usées de stations de traitement des eaux usées ... 129
7.1.1.1.2 Eaux usées hospitalières ... 131
7.1.1.2 Eaux usées d'abattoirs ... 132
7.1.1.2.1 Contamination des eaux usées brutes d'abattoirs par des souches d'E. coli résistantes aux antibiotiques 132
7.1.1.2.2 Efficacité du traitement des eaux usées brutes d'abattoirs sur les populations d'E. coli résistantes aux antibiotiques ... 132
7.1.1.2.3 Caractéristiques des souches d'E. coli résistantes aux antibiotiques isolées des eaux usées et boues d'abattoirs ... 133
7.1.1.2.4 Conclusions sur les données françaises ... 134
7.1.1.3 Rejets d'usine productrice d'antibiotiques ... 134
7.1.1.4 Eaux en sortie de pisciculture d'eau douce ... 135
7.1.1.5 Produits résiduaires organiques (PRO) ... 136
7.1.1.5.1 Bactéries résistantes aux antibiotiques dans les produits résiduaires organiques ... 136
7.1.1.5.2 Gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés dans les produits résiduaires organiques ... 137
7.1.2 Compartiments récepteurs de l'environnement ... 139
7.1.2.1 Milieux aquatiques ... 140
7.1.2.1.1 Aquifères continentaux de surface ... 141
7.1.2.1.2 Eaux souterraines - Occurrence des bactéries résistantes aux antibiotiques d'origine fécale dans des hydrosystèmes karstiques ... 145
7.1.2.1.3 Eaux côtières ... 146
7.1.2.1.4 Biote aquatique ... 148
7.1.2.2 Milieux terrestres ... 148
7.1.2.2.1 Sols ... 148
7.1.2.2.2 Rhizosphère et phyllosphère ... 150
7.1.2.2.3 Faune sauvage ... 150
7.2 Devenir des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement ... 151
7.2.1 Milieux aquatiques ... 151
7.2.1.1 Influence de l'urbanisation ... 152
7.2.1.2 Modification de la structure des populations bactériennes dans les continuums ... 153
7.2.1.3 Sédiments ... 154
7.2.2 Milieux terrestres ... 154
7.2.2.1 Études de terrain et sur dispositifs expérimentaux en France ... 155
7.3.1.1.1 En France métropolitaine ... 155
7.3.1.1.2 En Guadeloupe ... 160

7.2.2.2 Études sur dispositifs expérimentaux au Canada 162
7.2.2.3 Études en microcosmes 165
7.2.2.3.1 Études françaises 165
7.2.2.3.2 Étude des apports de lisier de porcs 167
7.2.2.4 Bilan des travaux menés 168
7.2.2.5 Rhizosphère et phyllosphère 169

7.3 Synthèse 170

7.3.1 Sources de contamination : eaux usées traitées et produits résiduaires organiques 170
7.3.2 Milieux aquatiques 171
7.3.3 Milieux terrestres 171
7.3.4 Faune sauvage 172

8 Impact potentiel des sélecteurs sur l'antibiorésistance dans l'environnement 173

8.1 Impact potentiel des antibiotiques 173

8.1.1 Exposition à des antibiotiques naturels 173
8.1.2 Comparaison théorique des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques impliquant une réponse bactérienne avec les concentrations mesurées dans l'environnement 174
8.1.2.1 Méthodes 174
8.1.2.2 Incertitudes de l'exercice 174
8.1.2.3 Résultats sur la phase dissoute des matrices liquides 175
8.1.2.3.1 Fluoroquinolones 175
8.1.2.3.2 Sulfamides 175
8.1.2.3.3 Macrolides 176
8.1.2.3.4 Tétracyclines 176
8.1.3 Antibiotiques, résistance et environnement : études réalisées *in situ* 178

8.2 Impact potentiel des éléments traces métalliques (ETM) 179

8.2.1 Contamination de l'environnement 179
8.2.2 Co-sélection de résistance aux antibiotiques par les éléments traces métalliques dans l'environnement 180

8.3 Impact potentiel des biocides 181

8.3.1 Contamination de l'environnement 181
8.3.2 Co-sélection de résistance aux antibiotiques par les biocides dans l'environnement 182

8.4 Déterminants de l'exposition bactérienne dans l'environnement 183

8.4.1 Biodisponibilité et bioaccessibilité des antibiotiques 183
8.4.1.1 *Via* les biofilms 183
8.4.1.2 *Via* l'eau 184
8.4.1.3 *Via* les sédiments 185
8.4.1.4 *Via* les boues et les sols amendés 185
8.4.2 Microenvironnement bactérien 185
8.4.3 Exposition à des mélanges de sélecteurs 186

8.5 Synthèse 187

9 Recommandations 191

9.1 Préambule 191

9.2 Recommandations pour améliorer le suivi de la contamination environnementale par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance 191

9.2.1 Recommandations sur le déploiement d'indicateurs de contamination environnementale 192
9.2.1.1 Indicateurs de contamination environnementale par les antibiotiques 192

9.2.1.2 Indicateurs de contamination environnementale par les bactéries résistantes aux antibiotiques et gènes de résistance aux antibiotiques 193
9.2.2 Recommandations sur les stratégies de suivi des antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement..... 193
9.3 Recommandations pour consolider et approfondir les connaissances actuelles 194
9.3.1 Besoins de recherche sur la contamination de l'environnement par les antibiotiques..... 194
9.3.2 Besoins d'acquisition de données de contamination par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance 195
9.3.3 Besoins de développement de nouvelles technologies d'acquisition et de traitement des données . 195
9.3.4 Besoins de recherche sur les paramètres favorisant la dissémination environnementale des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques correspondants 196
9.3.5 Besoins de recherche sur l'évaluation des capacités maximales de résilience des écosystèmes contaminés de façon continu 197

10 Bibliographie..... 198
10.1 Publications..... 198
10.2 Normes..... 230
10.3 Législation et réglementation..... 230
10.3.1 Européennes..... 230
10.3.2 Françaises 231

ANNEXES 233
Annexe 1 : Lettre de saisine..... 234
Annexe 2 : Actions institutionnelles pour lutter contre l'antibiorésistance 236
Annexe 3 : Bioaccumulation des antibiotiques dans le biote aquatique 250
Annexe 4 : Déterminants génétiques suggérés comme de possibles indicateurs pour évaluer le statut de résistance aux antibiotiques dans un environnement..... 252
Annexe 5 : Concentrations en antibiotiques mesurées dans les matrices d'intérêt..... 253

Sigles et abréviations

ABR : Antibiorésistance
ADN : Acide désoxyribonucléique
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
ANC : Assainissement non collectif
ANMV : Agence nationale du médicament vétérinaire (Anses)
Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Ansm : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN : Acide ribonucléique
AST : Appui scientifique et technique
ATB : Antibiotique
ATC : Anatomique, thérapeutique et chimique
BAC : Chlorure de benzalkonium
BLSE : β-lactamase à spectre étendu
BMR : Bactérie multirésistante
BHA : Bactérie hétérotrophe aérobie
BRA : Bactérie résistante aux ATB
CIP : Ciprofloxacine
CXG : Céphalosporine de X^{e} génération
CES : Comité d'experts spécialisé
CGDD : Commissariat général au développement durable
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CMS : Concentration minimale sélective
COD : Carbone organique dissous
DCE : Directive cadre sur l'eau
DROM : Départements et régions d'outre-mer
EDCH : Eau destinée à la consommation humaine
EGM : Élément génétique mobile
EH : Équivalent habitant
EHPAD : Établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes
ESO : Eau souterraine
ESU : Eau de surface
ETM : Élément trace métallique
EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FQ : Fluoroquinolone
GT : Groupe de travail
GRA : Gène de résistance aux ATB et gène associé
IAGG : Groupe spécial de coordination inter-institutions
ICE : Integrative and Conjugative Element

INRA: Institut national de la recherche agronomique
INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IR : Intégron de résistance
LD : Limite de détection
LQ : Limite de quantification
MES : Matière en suspension
ML : Macrolide
MLS : Macrolides, lincosamides et streptogramines
MS : Matière sèche
NGS (ou NGS ADN total) : Next Generation Sequencing
OIE : Organisation mondiale de la santé animale
OMS : Organisation mondiale de la santé
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction*)
PLP : Protéine liant la pénicilline
PRO : Produit résiduaire organique
QAAC : Composé d'ammonium à chaînes linéaires d'alkylammonium
QAC : Composé d'ammonium quaternaire
QRDR : Quinolone resistance determining regions
QS : Quorum sensing
RMQS : Réseau de mesures de la qualité des sols
RSD : Règlement sanitaire départemental
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SIE : Système d'information sur l'eau
SMRT : Single molecule real time sequencing
SMX : Sulfaméthoxazole
SPANC : Service public d'assainissement non collectif
ST : Sequence type
STEU : Station de traitement des eaux usées
TD : Tractus digestif
THG : Transfert horizontal de gène
UFC : Unité formant colonie
VBNC : Viable mais non cultivable (*Viable But Non Cultivable*)
VRE : Entérocoques résistant à la vancomycine

Définitions

Antibiorésistance : Résistance bactérienne aux antibiotiques utilisés en médecine humaine et/ou vétérinaire.

Antibiotique (ATB) : Substance active possédant la propriété de tuer les bactéries (bactéricide) ou de limiter leur croissance (bactériostatique), appartenant aux classes pharmacologiques bénéficiant ou ayant bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché en France pour leurs utilisations en médecine humaine et/ou vétérinaire. Les substances actives sont nommées par leur dénomination commune internationale. En France, les ATB sont utilisés uniquement en traitements curatifs, prophylactiques et métaphylactiques.

Bactéries pathogènes opportunistes : Bactéries qui ne provoquent pas de maladie (bactéries pas ou peu virulentes) chez un individu sain mais qui peuvent présenter un risque pour la santé chez un individu dont le système immunitaire est affaibli (immunodéprimé). Ces bactéries sont responsables d'infections nosocomiales (*i.e.* acquises à l'hôpital) et communautaires (acquises hors de l'hôpital). Elles ont souvent la particularité de présenter une résistance naturelle à de nombreux antimicrobiens et de développer facilement de nouvelles propriétés de résistance et/ou d'augmenter leur seuil de résistance à ces antimicrobiens. Parmi ces espèces opportunistes, on rencontre des phénotypes de multi-résistances susceptibles de conduire à des échecs thérapeutiques lors d'infections.

Bioaccessibilité : Un composé bioaccessible est un composé disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un organisme depuis l'environnement, et auquel le micro-organisme à un accès immédiat. La bioaccessibilité exprime une contrainte implicite dans le temps et/ou dans l'espace, liée à habitat, empêchant l'organisme d'avoir accès au composé immédiatement.

Biodisponibilité : Un composé biodisponible est un composé qui est librement disponible pour traverser immédiatement la membrane cellulaire d'un micro-organisme depuis l'environnement.

Clone bactérien : Lignée bactérienne définie comme un ensemble de souches, isolées indépendamment, qui montrent une parenté génétique proche par typage moléculaire. Le plus souvent, un clone est défini par une combinaison d'allèles communs lors d'un typage moléculaire par MultiLocus Sequence Typing.

Communauté bactérienne : Ensemble de bactéries d'espèces différentes vivant dans un même biotope (ou se développant dans les mêmes conditions de culture *in vitro*) et/ou assurant une même fonction au sein du cycle biogéochimique (ex des communautés nitrifiantes).

Concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un ATB : Plus faible concentration capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI caractérise la sensibilité d'un isolat bactérien (d'une espèce bactérienne) à un antibiotique donné. Les CMI sont déterminées par des méthodes standardisées (par l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - EUCAST en Europe).

Concentration minimale sélective (CMS) d'un ATB : Plus faible concentration conférant un avantage compétitif à une souche résistante vis-à-vis d'une souche sensible dans des conditions spécifiques, la souche résistante ne différant de la souche sensible que par la présence d'une mutation ou d'un gène conférant la résistance à l'ATB considéré (Gullberg *et al.* 2011). La CMS est toujours inférieure à la CMI (donc sub-inhibitrice). Les CMS sont déterminées par des laboratoires de recherche selon des méthodes non standardisées.

Co-résistance : Processus dans lequel au moins deux mécanismes de résistance sont codés par des gènes dont les localisations sont proches (sur un même réplicon ou EGM), et dont le transfert et l'expression interviennent de manière coordonnée (gènes liés génétiquement).

Espèce bactérienne : Unité fondamentale de la classification scientifique correspondant au taxon de base de la systématique des espèces. Cependant, au sein d'une même espèce bactérienne, il est possible de distinguer des souches et des clones.

Genre bactérien : Unité de classement de la systématique des espèces bactériennes, au-dessus des espèces. Un genre bactérien comprend plusieurs espèces.

Indicateur : Par définition, un indicateur est une information choisie, ou un agrégat de résultats de mesure, associée à un critère (signe qui permet de distinguer une chose, une notion, de porter un jugement d'appréciation), destinée à en observer les évolutions à intervalles définis, au regard d'objectifs périodiquement définis (Normes FD X 50-171- ISO 8402). La définition et l'utilisation d'un indicateur s'inscrit dans une démarche qui répond à un objectif et qui se situe dans un contexte donné. Il n'a de sens qu'accompagné de ses éléments d'interprétation.

Intégrons : Plateformes génétiques permettant aux bactéries l'acquisition, le stockage, l'expression, l'excision et le réordonnancement de séquences de codage appelées cassettes (Escudero, Loot et Mazel 2018).

Les intégrons de résistance aux antibiotiques (IR) représentent le principal mécanisme de capture et de dissémination des gènes de résistance aux ATB parmi les bactéries à Gram négatif, et sont une source d'évolution rapide du génome bactérien. Ils peuvent être mobiles lorsqu'ils sont intégrés sur des transposons ou des plasmides conjugatifs. Un IR mobilise plusieurs gènes de résistance.

Périphyton, parfois appelé « biofilm de rivière » : Communauté complexe de micro-organismes (algues, bactéries, archées, protozoaires voire métazoaires) qui se développe sur des surfaces solides immergées et produisent une matrice extracellulaire protectrice. Ces surfaces peuvent être inertes (roches, branches, quai, lames de verre, etc.) ou vivantes (plantes aquatiques, coquillages, etc.). Dans les milieux aquatiques, les péryphytons, qui sont à la base du réseau trophique, sont des matrices organo-minérales où peuvent se fixer les contaminants chimiques.

Population bactérienne : Ensemble des bactéries d'une même espèce vivant dans un même biotope (ou se développant dans les mêmes conditions de culture *in vitro*).

Pression de sélection : Processus conduisant à l'évolution des espèces vivantes sous la contrainte environnementale d'un facteur (biotique ou abiotiques) aboutissant à l'émergence de populations plus adaptées à la contrainte environnementale.

Produit de transformation d'ATB : Molécule formée à partir d'un ATB lors de son utilisation en médecine (métabolite) ou dans l'environnement par des processus de dégradation biotique ou abiotique.

Résistance croisée : Processus par lequel un même mécanisme peut conférer à une bactérie une résistance à plusieurs antibiotiques ou plusieurs substances actives, comme des biocides antimicrobiens. La conséquence majeure de ce phénomène est la sélection croisée : n'importe laquelle de ces molécules peut sélectionner des bactéries résistantes à l'ensemble des classes pharmacologiques incluses dans le spectre de résistance.

Résistome : Le terme résistome proposé par Wright (2007) se définit par le répertoire global des gènes de résistance aux antibiotiques avérés ou potentiels. Il regroupe quatre types de gènes :

- Les gènes de résistance connus, trouvés chez les bactéries pathogènes,
- Les gènes de résistance qu'on peut ne pas connaître et qui sont nécessairement présents chez les producteurs ATB,
- Les gènes de résistance cryptiques/cryptogéniques, *i.e.* présents dans le génome bactérien mais pas ou faiblement exprimés,
- Les gènes précurseurs des gènes de résistance, qui confèrent une activité de niveau basal contre la molécule d'ATB, ou qui ont une affinité pour cette molécule.

Plus simplement, le résistome proposé par Dantas et Sommer (2012) regroupe l'ensemble des gènes capables de conférer une résistance à un ATB lorsqu'exprimés chez un hôte sensible. Il peut être défini à différents niveaux de complexité : celui d'un plasmide ou d'une souche, celui d'une communauté microbienne ou celui d'une niche environnementale. Ces auteurs mettent l'emphase sur l'interaction forte entre phénotype et génotype et soulignent l'importance de l'hôte considéré.

Sélecteur : Élément ou facteur de nature abiotique ou biotique qui exerce la pression de sélection conduisant à l'évolution des espèces vivantes.

Souche bactérienne : Isolat bactérien caractérisé par des techniques génotypiques et phénotypiques au laboratoire et qu'on conserve en lui attribuant une désignation.

Typage moléculaire : Étude de la diversité (ou polymorphisme génétique) au sein d'une même espèce bactérienne, qui repose sur des techniques moléculaires de comparaison des génomes (MultiLocus Sequence Typing, phylogroupage chez *E. coli*, séquencage du génome) permettant de développer une approche d'épidémiologie tant en milieu clinique qu'environnemental.

Liste des tableaux

Tableau I. Antibiotiques pour lesquels des données de contamination de l'environnement ont été identifiées dans le rapport, par classe pharmacologique. 27

Tableau II. Tonnes d'antibiotiques à usage systémique vendus par an en France par classe pharmacologique, en médecine humaine et en médecine vétérinaire, en 2017 et 2018. 30

Tableau III. Espèces, groupes ou genres bactériens d'intérêt pour un suivi environnemental. 33

Tableau IV. Principaux gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés évoqués dans ce rapport (plus d'informations sur les GRA sont disponibles sur https://card.mcmaster.ca/). 34

Tableau V. Distance d'épandage en fonction du type de produits résiduaires organiques (SATEGE Nord-Pas de Calais 2019). 66

Tableau VI. Modalités de substitution des données censurées à gauche. 92

Tableau VII. Nombre d'antibiotiques recherchés dans des matrices environnementales en France et nombre d'analyses par classe pharmacologique. 93

Tableau VIII. Nombre d'échantillons et de sources de données par matrice. 94

Tableau IX. Concentrations en antibiotiques mesurées dans les eaux usées brutes issues d'établissements de soins pour les 10 antibiotiques quantifiés dans le plus grand nombre d'échantillons. 96

Tableau X. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles dans les eaux usées traitées urbaines pour les 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois dans les sources de contamination d'origine humaine en France. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5. 98

Tableau XI. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles dans les produits résiduaires organiques d'origine humaine pour les 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois dans les sources de contamination d'origine humaine en France. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5. 101

Tableau XII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles pour les 11 antibiotiques quantifiés plus d'une fois dans les produits résiduaires organiques d'élevage en France. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5. 102

Tableau XIII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles mesurées dans les compartiments récepteurs en France des 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5. 106

Tableau XIV. Synthèse, réalisée à partir des données du système d'information sur l'eau, des concentrations individuelles mesurées dans les compartiments récepteurs en France des 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5. 107

Tableau XV. Abondance d'*E. coli* antibiorésistants dans l'eau de surface du bassin versant de la Seine (d'après (Laroche *et al.* 2009 ; Laroche *et al.* 2010 ; Petit *et al.* 2017) et projets GIP Seine-Aval et PANDORE). 142

Tableau XVI. Abondance de *intI1* dans des sédiments de surface (0-3 cm, quantification par qPCR et normalisation, copies *intI1*/ADNr16S) (d'après (Laroche *et al.* 2009 ; Laroche *et al.* 2010 ; Petit *et al.* 2017) et projets DYNAPAT, GIP Seine-aval, PANDORE, PIREN-Seine et Zootrans). 144

Tableau XVII. Contamination d'un hydrosystème karstique par des *E. coli* antibiorésistants pour différentes conditions hydrologiques et d'usage du bassin versant (Site Norville, SNO karst CNRS) (Petit *et al.* 2018) d'après (Laroche *et al.* 2010 ; Ratajczak *et al.* 2010). 146

Tableau XVIII. Synthèse des données existantes sur la contamination des eaux côtières par les bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques en France et en Europe... 147

Tableau XIX. Avantages et inconvénients des études menées à différentes échelles. 155

Tableau XX. Caractéristiques des sites français analysés. 156

Tableau XXI. Description des successions d'épandage de composts de produits résiduaires organiques. 161

Tableau XXII. Quantités de contaminants apportés dans les contrôles (C et CM) et dans les essais (D1 à D4). 166

Tableau XXIII. Concentrations dans différents compartiments de l'environnement du triclosan et des composés d'ammoniums quaternaires (QAC). 182

Tableau XXIV. Proposition d'indicateurs et modalités de quantification et d'expression des résultats. 193

Tableau XXV. Liste de l'OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques (OMS 2017a). 240

Tableau XXVI. Classification et niveau de priorité des antibiotiques considérés comme d'importance critique, d'importance élevée ou importants par l'OMS (2019). 241

Tableau XXVII. Listes des antibiotiques critiques retenues par l'Ansm (2016). 246

Tableau XXVIII. Listes des antibiotiques d'importance critique définis par l'arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotique d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue à l'article R. 5141-117-2. 247

Tableau XXIX. Gammes de Kow par classe d'antibiotiques (Jafari Ozumchelouei *et al.* 2020). 250

Tableau XXX. Facteurs de bioaccumulation (BAF en $L.kg^{-1}$) des antibiotiques détectés dans les gammares et dans les poissons par Dinh (2012). 251

Tableau XXXI. Déterminants génétiques suggérés comme de possibles indicateurs permettant d'évaluer le statut de résistance aux antibiotiques dans un environnement (Berendonk *et al.* 2015). 252

Tableau XXXII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les sources de contamination d'origine humaine en France. 253

Tableau XXXIII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les sources de contamination d'origine animale en France. 256

Tableau XXXIV. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les compartiments récepteurs en France. 258

Tableau XXXV. Synthèse, réalisée à partir des données du SIE, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les compartiments récepteurs en France. 261

Liste des figures

Figure 1. Schéma de la circulation de l'antibiorésistance et champ de la saisine. 23
Figure 2. Nombre de prescriptions en ville (médecine humaine) de tous les antibiotiques à usage systémique en 2018 (prescriptions.1 000 hab.$^{-1}$.j^{-1}). 31
Figure 3. Résistance, tolérance et persistance face aux antibiotiques (Balaban *et al.* 2019). 38
Figure 4. Principaux mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. 39
Figure 5. Transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques : conjugaison plasmidique, transposition et/ou transduction (Schroeder, Brooks et Brooks 2017). 40
Figure 6. Organisation générale d'un mécanisme de recombinaison des intégrons et des cassettes de gènes (Barraud et Ploy 2011 ; Stalder *et al.* 2012). 42
Figure 7. Évolution du phénotype de tolérance à l'isopropanol pour 139 isolats d'*Enterococcus faecium* collectés de 1998 à 2015 dans deux grands hôpitaux australiens (Pidot *et al.* 2018). 45
Figure 8. Effets biologiques des faibles concentrations de ciprofloxacine. 49
Figure 9. Sources globales d'antibiotiques, de bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés vers les milieux aquatiques et terrestres. 57
Figure 10. Termes utilisés dans le rapport pour décrire les eaux usées. 59
Figure 11. Hydrosystème karstique (Bakalowicz 1999). 71
Figure 12. Exemple de comparaison de la quantification d'antibiotiques en aval d'un rejet après échantillonnage ponctuel par rapport à l'utilisation d'intégrateurs passifs de type POCIS (Capdeville 2011). 77
Figure 13. Principales étapes de traitement d'un échantillon depuis l'extraction jusqu'à l'analyse chimique. 81
Figure 14. Principales méthodes de détection ou de quantification de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement, d'après Manaia *et al.* (2016). 84
Figure 15. Approches de détection et de quantification des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance, et de quantification de l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques. 85
Figure 16. Principales voies de contamination des sols et des eaux par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques. 89
Figure 17. Répartition des échantillons par grands bassins hydrographiques : pour les données produites par les équipes de recherche (en violet), pour les données relatives aux eaux de surface (ESU) du SIE (en vert) et pour les données relatives aux eaux souterraines (ESO) du SIE (en marron). 104
Figure 18. Processus contrôlant le devenir des antibiotiques dans l'environnement. 112
Figure 19. Concentrations de six antibiotiques de classes pharmacologiques différentes mesurées dans les phases dissoutes d'eaux usées traitées et des milieux aquatiques (a) et dans les sédiments et les périphytons (b) en France. 126
Figure 20. Concentrations de six antibiotiques de classes pharmacologiques différentes mesurées dans les boues de stations de traitement des eaux usées, les produits résiduaires organiques d'élevage solides et les sols en France. 127
Figure 21. Concentration en *E. coli*, *E. coli* BLSE, entérocoques et VRE dans les eaux usées domestiques (dom.), eaux usées d'établissements de soins (hosp.), les eaux usées brutes (brut.) et eaux usées traitées (trait.) par les STEU en France[a] et en Europe[b]. 129
Figure 22. Diminution des concentrations en *E. coli*, *E. coli* BLSE, entérocoques et entérocoques VRE par les STEU. 130
Figure 23. Proportion d'isolats d'*E. coli* antibiorésistants isolés de stations de traitement des eaux usées d'un abattoir de bovins adultes (bandes vides) et d'un abattoir de veaux (bandes pleines) (Um *et al.* 2016). 133
Figure 24. Proportion d'isolats d'*E. coli* antibiorésistants isolés de six stations de traitement des eaux usées d'abattoirs de bovins adultes, veaux, petits ruminants, et/ou porcs (Bibbal *et al.* 2009). 134
Figure 25. Cartographie des sites français métropolitains générant des données relatives à la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques et de supports génétiques de la résistance (milieu aquatique en bleu ; sols en rouge). 140

Figure 26. Répartition géographique des sites français étudiés dans le cadre du projet DABARES. Les chiffres renvoient aux sites décrits dans le tableau XX (plan ECOANTIBIO). 157

Figure 27. Abondance absolue de gènes de résistance aux antibiotiques et d'intégrons dans des PRO dérivés de fumiers ou de composts de fumier de bovins. 157

Figure 28. Abondance absolue de gènes de résistance aux antibiotiques et d'intégrons dans des sols agricoles de 9 sites fertilisés avec des produits résiduaires organiques d'origine bovine. 158

Figure 29. Abondance de gènes de résistance aux antibiotiques dans des sols du site de Feucherolles (Octobre 2013) avant et un mois après un épandage de produits résiduaires organiques [fumier ou compost de déchets verts et boues de stations de traitement des eaux usées (4 répétitions)]. 159

Figure 30. Photo du dispositif expérimental en Guadeloupe. 160

Figure 31. Abondance au cours du temps (T0 à T6) des gènes *sul* et *intI* dans les sols au cours de trois cycles de cultures maraichères et après un ou plusieurs épandages de produits résiduaires organiques (compost de déchets verts, de fientes de volailles/déchets verts, de crottins, et de boues de stations de traitement des eaux usées/déchets verts. 162

Figure 32. Abondance relative des gènes *sul1* et d'*intI1* dans le sol de parcelles sans amendement (contrôle) et avec amendement (après épandage de lisier de porcs au printemps 2012). 163

Figure 33. Concentrations en gènes *sul1, strA* et *strB* dans le sol témoin et dans les sols amendés avec du compost de lisier de porcs (CLP) de déchets alimentaires (CDA) et de déchets de jardin (CDJ). 164

Figure 34. Évolution du nombre de copies des gènes *sul1* et *sul2* au cours du temps dans des microcosmes de sol amendés par du fumier ou un compost de boues et déchets verts (DVB) supplémentés par du sulfaméthoxazole (SMX) en doses croissantes. 165

Figure 35. Dispositif « grandes colonnes » (H = 40 cm et diamètre = 15 cm) et principe général des expérimentations dose-réponse au laboratoire et avec contamination des produits résiduaires organiques (fumier) avant son mélange au sol, puis incorporation dans l'horizon de surface. 166

Figure 36. Abondance des gènes *sul1* (A) et *sul2* (B) dans les horizons supérieur et inférieur des colonnes de sol amendé par différentes doses de cocktails d'antibiotiques et d'éléments traces métalliques et à différents temps. 167

Figure 37. Évolution de l'abondance relative de 13 gènes de résistance aux antibiotiques dans un sol amendé avec du lisier de porcs (Leclercq *et al.* 2016). 168

Figure 38. Concentrations en ATB dans la phase dissoute de différentes matrices environnementales liquides (en gris clair) et entraînant une réponse bactérienne (en gris foncé) pour les fluoroquinolones (a), les sulfamides (b), les macrolides (c) et les tétracyclines (d). 177

Figure 39. Concept de bioaccessibilité et de biodisponibilité des antibiotiques pour les bactéries dans les biofilms. 184

Figure 40. Conditions environnementales favorables au transfert de gènes de résistance aux antibiotiques vers des espèces bactériennes pathogènes. 189

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

L'antibiorésistance (ABR) est une préoccupation majeure de santé publique, partagée par un très grand nombre d'acteurs de la santé humaine et animale au niveau mondial. Ainsi, dans la lettre de saisine adressée à l'Anses, les ministères en charge de la santé, de l'agriculture et de l'environnement indiquent : « *Les antibiotiques ont permis, depuis la généralisation de leur utilisation, en médecine humaine comme en médecine animale, de combattre des maladies bactériennes autrefois difficiles voire impossibles à soigner. Cependant, les mésusages des antibiotiques augmentent inévitablement les risques de sélection de bactéries résistantes dont l'impact en santé publique est majeur.* »

Face au défi de la dissémination de l'ABR, et sur la base du constat partagé de la nécessité d'agir, de nombreux acteurs internationaux, européens et français mettent en place des actions de lutte contre l'ABR. Celles-ci passent par des plans d'actions globaux ou ciblés sur la médecine humaine et/ou vétérinaire, et par la surveillance de l'ABR et/ou de l'utilisation des antibiotiques (ATB) (voir annexe 2).

L'ensemble des acteurs s'accorde sur la nécessité de retenir une approche multisectorielle « Un monde, une santé » ou « Une seule santé » (One Health, One World) *« particulièrement pertinente dans les domaines […] de la lutte contre la résistance aux ATB* » (OMS 2017b). Le concept « Une seule santé » est « *utilisé pour décrire le principe selon lequel la santé humaine et la santé animale sont liées entre elles, que l'homme transmet des maladies aux animaux et inversement, de sorte que les mesures de lutte doivent concerner tant l'homme que les animaux. La perspective « Une seule santé » suppose de prendre également en compte l'environnement – autre lien entre l'homme et l'animal –, qui peut lui aussi être une source de nouveaux micro-organismes résistants* » (Commission Européenne 2017).

Des actions relatives à l'ABR dans l'environnement sont identifiées à chaque niveau de gouvernance : international, européen et national. Cette prise en compte est néanmoins relativement récente, et les actions dans le domaine environnemental constituent, et de loin, le secteur le moins pris en compte dans le cadre des politiques publiques.

En France, la question de l'ABR dans l'environnement a été abordée dans le rapport « Tous ensemble, sauvons les ATB » (Carlet et Le Coz 2015), dans la « Feuille de route interministérielle pour maîtriser la résistance bactérienne aux antibiotiques » (Comité interministériel pour la santé 2016) ainsi que dans la « Feuille de route 2015 pour la transition écologique » (MEDDE 2015). Cette dernière a annoncé la présente saisine de l'Anses visant à « *objectiver les connaissances relatives aux mécanismes participant au développement de l'antibiorésistance dans l'environnement. L'objectif est de comprendre les mécanismes mis en œuvre dans l'environnement dans l'apparition et la diffusion des résistances bactériennes afin d'orienter les mesures à mettre en place pour limiter l'émergence de nouvelles résistances* ». La figure 1 illustre le champ de la saisine dans le cadre global de la circulation de l'ABR entre l'Homme, les animaux et l'environnement.

Parallèlement à la saisine adressée à l'Anses, et en réponse à un appel à projet du commissariat général au développement durable (CGDD) du ministère en charge de l'environnement, un consortium a réalisé une revue systématique de la littérature portant sur les solutions efficaces pour réduire la contamination de l'environnement par les antibiorésistances. Ce consortium a regroupé des scientifiques de l'ensemble des instituts ou structures nationales où se développent des recherches sur la problématique des ATB et bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) dans l'environnement, et des représentants des organismes gestionnaires concernés par la mise en place de mesures pour lutter contre la contamination de l'environnement par des antibiotiques ou des BRA. Les travaux, débutés en 2017, ont été finalisés en 2019 (Goulas *et al.* 2018 ; Goulas *et al.* 2020). L'expertise menée par l'Anses vise donc à compléter ce travail en appréhendant le

questionnement de la dissémination de l'ABR dans l'environnement de façon plus globale, tout en se focalisant sur les données acquises sur le territoire français.

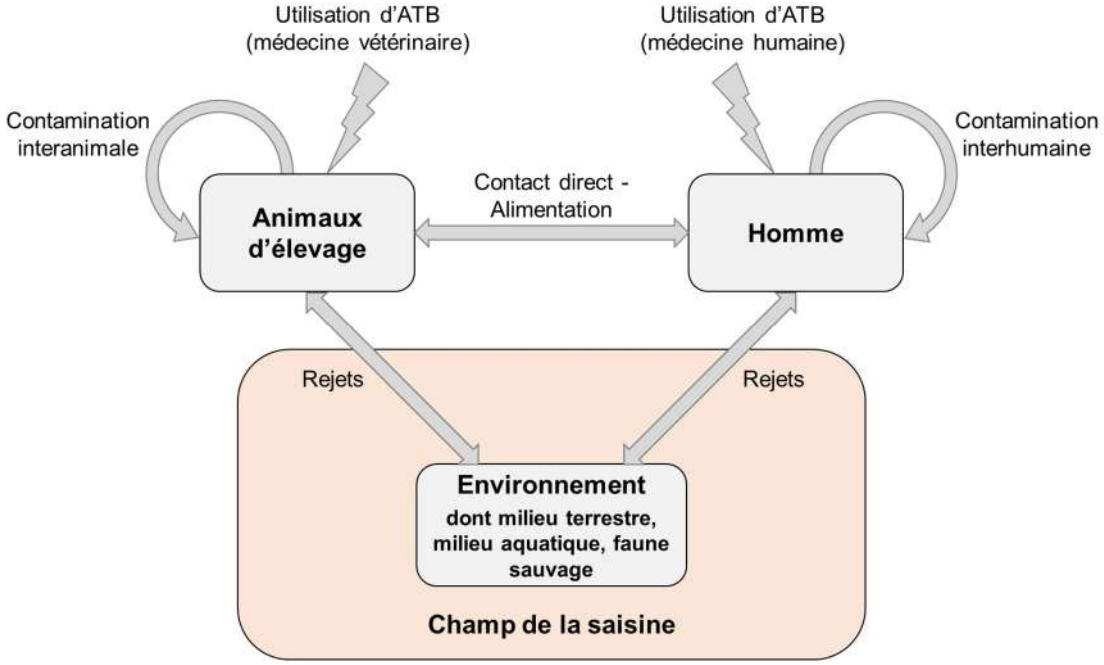


Figure 1. Schéma de la circulation de l'antibiorésistance et champ de la saisine.

1.2 Objet de la saisine

Les ministères en charge de la santé, de l'agriculture et de l'environnement ont saisi l'Anses d'une demande d'expertise sur l'ABR et l'environnement visant à :

- « *1. Dresser un état des lieux des connaissances actuelles sur la contamination des différents compartiments environnementaux (sols et eaux) par les antibiotiques et les bactéries pathogènes résistantes. L'expertise pourra inclure des recommandations pour l'élaboration d'une cartographie nationale des contaminations, en tenant compte de la diversité des méthodes et indicateurs utilisés pour détecter et mesurer l'antibiorésistance. Les résultats de cette expertise pourront être utilisés dans le cadre des actions menées par le comité interministériel pour la santé.*
- *2. Déterminer les mécanismes sous-jacents à la sélection et à la transmission de l'antibiorésistance via l'environnement. L'étude montrera, sur la base des publications sélectionnées, quels mécanismes contribuant au développement et à l'expansion de l'antibiorésistance ont été identifiés dans l'environnement (sources de contamination, voies de transmission à la faune et la flore notamment). Elle estimera également l'impact de l'utilisation des antibiotiques (également des résidus et métabolites) et d'autres molécules (biocides, métaux lourds, …) sur la sélection de l'antibiorésistance. L'étude identifiera enfin les éléments d'analyse éventuellement manquants et les actions opérationnelles ou de recherche pouvant être mises en œuvre pour les couvrir, en lien avec les travaux du comité interministériel pour la santé. Des recommandations quant aux mesures à mettre en place par les pouvoirs publics et autres acteurs pour limiter l'émergence de nouvelles résistances via l'environnement pourront être faites.* »

Le champ de l'expertise a été précisé par l'Anses en lien avec les tutelles, puis par le groupe de travail (GT) en charge de la saisine, qui a également reformulé les questions traitées. Ce cadrage affiné est présenté dans le chapitre 2.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au GT « Antibiorésistance et environnement », rattaché au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ». Un appui scientifique et technique (AST) a été sollicité auprès des laboratoires de l'Anses sur les actions institutionnelles pour lutter contre l'ABR dans l'Union européenne et en France d'une part, et d'autre part pour réaliser un état des connaissances sur l'ABR dans les eaux littorales. Deux rapporteurs ont également été nommés sur la question de l'impact de la présence des biocides dans l'environnement sur la résistance aux antibiotiques (voir § Présentation des intervenants). Les contributions produites ont servi de base au GT pour la rédaction des parties correspondantes du rapport d'expertise.

Les travaux se basent sur les données et connaissances disponibles dans la littérature scientifique publiée (recherche *via* PubMed[1] et ScienceDirect[2]), les rapports institutionnels, la littérature grise et les bases de données, et sur celles produites par des laboratoires de recherche français dont les données n'ont pas encore été publiées. Dans ce dernier cas, lorsqu'aucune référence n'est disponible, les programmes de recherche correspondant sont mentionnés en note de bas de page.

Les travaux d'expertise du GT ont été soumis régulièrement au CES « Eaux », tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 6 novembre 2018 et le 15 septembre 2020. Trois relecteurs ont été nommés par le CES. Le rapport produit par le GT tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES « Eaux ». Il a été validé par le CES « Eaux » le 13 octobre 2020 et l'ensemble des travaux ont été adoptés par le CES « Eaux » réuni le 10 novembre 2020.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise - prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) ».

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge de la santé (https://dpi.sante.gouv.fr).

[1] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

[2] https://www.sciencedirect.com/

2 Cadrage de la saisine

2.1 Délimitation du champ de la saisine

2.1.1 Rappel de l'objectif du travail

Le présent rapport vise à documenter la contamination de l'environnement par l'antibiorésistance (ABR) et les antibiotiques (ATB) en France et les mécanismes favorisant l'émergence et la diffusion de l'ABR dans l'environnement. Par conséquent, **ne sont pas abordés** dans ce travail :

- Les voies d'exposition à l'ABR de l'Homme ou l'animal à partir de l'environnement,
- Les liens entre gènes de virulence et résistance aux ATB,
- Les effets des ATB sur les communautés bactériennes fonctionnelles environnementales,
- Les solutions pour réduire la contamination de l'environnement par l'ABR, qui, à la demande du CGDD, ont fait l'objet du travail d'un consortium de scientifiques (voir § 1.1) (Goulas *et al.* 2018a ; Goulas *et al.* 2020).

2.1.2 Caractérisation de l'antibiorésistance

Afin d'étudier l'ABR dans l'environnement, le GT a jugé nécessaire de traiter des **bactéries résistantes aux antibiotiques** (BRA) ainsi que des **supports génétiques de la résistance** : gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés (GRA) et éléments génétiques mobiles (EGM).

La majorité des travaux de recherche portant sur l'ABR dans l'environnement s'intéresse aux BRA ou aux GRA dans différents compartiments impactés par des activités anthropiques, et caractérise l'apport et l'enrichissement du résistome environnemental, sans en avoir évalué au préalable sa diversité initiale. Une des conséquences est que la majorité des BRA et des GRA recherchés est « d'intérêt clinique ». Dans ce contexte, en réponse à la lettre de saisine qui mentionne les « *bactéries pathogènes résistantes* » et afin de disposer de données, le GT a choisi d'axer le présent travail **du point de vue de la santé humaine** et de considérer en priorité les **espèces bactériennes résistantes pathogènes, dont pathogènes opportunistes, pour l'Homme**. La partie 2.3.2 détaille les BRA et GRA étudiés dans le rapport.

Ainsi, bien que la problématique de l'ABR se pose également en santé animale, ce travail n'aborde pas les BRA ou GRA spécifiquement préoccupants chez les animaux. De même, ni les bactéries environnementales résistantes, ni les GRA spécifiques aux bactéries environnementales n'ont été étudiés. En revanche, l'expertise aborde les conditions de transfert de GRA environnementaux vers des souches cliniques, comme cela a été documenté pour les gènes *arm* (codant des méthylases du ribosome, conférant une résistance aux aminosides), *qepA* (codant une pompe d'efflux conférant la résistance aux fluoroquinolones) ou $bla_{CTX\text{-}M}$ (codant des β-lactamases à spectre étendu conférant une résistance aux céphalosporines de dernières générations) (Canteón 2009 ; Jiang *et al.* 2017).

2.1.3 Environnement

La saisine adressée à l'Anses mentionne « *différents compartiments environnementaux (sols et eau)* », « *la faune et la flore* » et les « *sources de contamination* ». Par conséquent, l'expertise a été axée sur les **milieux aquatiques et terrestres et leurs sources de contamination.** La partie 5.1 détaille les sources d'émission vers l'environnement et les compartiments environnementaux récepteurs étudiés dans le rapport.

Le milieu aérien, les environnements intérieurs domestiques et de soins en médecine humaine, les filières d'élevage et les produits de cultures **n'ont pas été étudiés** dans cette saisine.

Concernant le milieu marin, compte tenu des spécificités des eaux du large (forte dilution, salinité, courants, *etc.*) par rapport aux autres compartiments aquatiques, seules les eaux littorales, sous influence étroite des milieux terrestres et aquatiques continentaux, ont été abordées.

2.1.4 Zone géographique considérée

La contamination de l'environnement par les ATB, les BRA et les GRA est dépendante à la fois des règlementations en vigueur et des pratiques nationales. En effet, en fonction des pays, les règlementations relatives aux médicaments encadrent de manière plus ou moins stricte l'utilisation des ATB en médecine humaine et vétérinaire (dont l'élevage). De plus, la contamination environnementale par les bactéries d'origine humaine est très variable dans le monde, car elle reflète le niveau d'hygiène globale et l'accès des populations à des structures sanitaires. En 2015, la proportion de la population ayant accès aux structures sanitaires était de 98,7 % en France, de 78 % en Asie du Sud-Est et du Pacifique, et de 70 % en Afrique sub-saharienne (Banque mondiale 2019). Dans les pays en voie de développement, la dissémination de BRA et de GRA est une menace pour la santé humaine, la santé animale et des écosystèmes, d'autant plus que les infrastructures de traitement des eaux usées sont souvent inexistantes ou peu efficaces, en raison de problèmes économiques et de l'instabilité politique (Collignon *et al.* 2018). De telles carences en ingénierie sanitaires ont pour conséquence le rejet direct dans l'environnement d'ATB, de BRA et de GRA par les patients traités (Fekadu *et al.* 2019). À ceci s'ajoute la contamination de l'environnement par les rejets d'industries pharmaceutiques, qui se concentrent principalement en Asie, notamment en Inde et en Chine. Dans ces pays producteurs, la réglementation relative aux rejets dans l'environnement est moins contraignante qu'en Europe (Larsson, de Pedro et Paxeus 2007). L'absence d'unité de traitement des eaux usées industrielles dans la plupart de ces pays, conduit à des contaminations chroniques en ATB, BRA et GRA des écosystèmes aquatiques (Larsson 2014 ; Tell *et al.* 2019).

Compte tenu de ces différences de situations entre les pays, le GT a choisi de dresser **un état des lieux de la contamination environnementale par les ATB, les BRA et les GRA** qui repose sur une recherche bibliographique concernant en priorité la **France métropolitaine et les départements et régions d'outre-mer** (DROM). Lorsque cela s'est avéré pertinent, des données de contamination de l'environnement, produites au niveau européen, ont été utilisées à titre de comparaison, ou pour palier un manque de données françaises. Le reste de l'expertise est basé sur l'ensemble des données disponibles : nationales et internationales.

2.2 Questions traitées

Le présent rapport vise à :

- Décrire les mécanismes sous-jacents à l'émergence et à la persistance de l'ABR dans l'environnement (chapitre 4) ;
- Décrire les méthodes de suivi des ATB et des BRA et GRA dans l'environnement (chapitre 5) ;
- Dresser un bilan des données existantes de contamination de l'environnement en France par :
  - Les ATB (chapitre 6),
  - Les BRA et les GRA (chapitre 7) ;
- Caractériser les dynamiques spatiale et/ou temporelle des ATB (chapitre 6) et de l'ABR dans l'environnement (chapitre 7 et 8).

Les définitions des termes spécifiques et récurrents de cette expertise figurent en début de rapport.

2.3 Antibiotiques, bactéries résistantes aux antibiotiques et gènes de résistance aux antibiotiques considérés dans cette expertise

2.3.1 Antibiotiques

Le GT a considéré comme ATB les substances actives possédant la propriété de tuer les bactéries (bactéricides) ou de limiter leur croissance (bactériostatiques), appartenant aux classes pharmacologiques bénéficiant ou ayant bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France pour leurs utilisations en médecine humaine et/ou vétérinaire. Les substances actives

sont nommées par leur dénomination commune internationale. L'existence des AMM a été vérifiée *via* le répertoire des spécialités pharmaceutiques (Ansm 2019) pour les médicaments à usage humain et *via* l'index des médicaments vétérinaires autorisés en France (iRCP - Anses/ANMV 2019) pour les médicaments vétérinaires.

Le GT a choisi de rechercher, pour chaque chapitre du rapport, les données disponibles concernant l'ensemble des ATB, sans appliquer de filtre spécifique. Le GT a ciblé les données de concentrations des ATB dans l'environnement produites ou publiées entre 2008 et 2018. Ce choix relève d'un compromis entre la pertinence analytique des données (les avancées technologiques ont permis d'abaisser très significativement les limites analytiques, voir § 5.2.2), et la prise en compte d'un maximum de données. Le tableau I présente les ATB mentionnés dans le rapport par classe pharmacologique et précise s'ils sont utilisés en médecine humaine et/ou vétérinaire en France. La classification des ATB a été faite en utilisant le système de classification ATC (Anatomique Thérapeutique Chimique), recommandé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour les études sur l'utilisation des médicaments.

Tableau I. Antibiotiques pour lesquels des données de contamination de l'environnement ont été identifiées dans le rapport, par classe pharmacologique.

Classe pharmacologique	ATB	Cible bactérienne	Utilisation en médecine humaine en France	Utilisation en médecine vétérinaire en France
Aminosides	Dihydrostreptomycine	Ribosomes	Non	Oui
Antibactériens stéroïdiens	Acide fusidique	Ribosomes	Oui	Oui (chat ou chien uniquement)
Antimycobactériens	Rifampicine	ARN polymérase	Oui	Oui (cheval uniquement, liste substance essentielle)
C1G et C2G (β-lactamines)	Céfalexine	Paroi	Oui	Oui
	Céfazoline		Oui	Oui
	Céfuroxime		Oui	Non
C3G et C4G (β-lactamines)	Céfotaxime	Paroi	Oui	Non
	Cefpodoxime		Oui	Non
	Cefquinome		Non	Oui
	Ceftiofur		Non	Oui
Carbapénèmes (β-lactamines)	Méropénème	Paroi	Oui	Non
Dérivés de l'imidazole	Métronidazole	ADN	Oui	Oui (chat ou chien uniquement)
	Ornidazole		Oui	Non
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	ADN	Oui	Non
	Danofloxacine		Non	Oui
	Difloxacine		Non	Non (ancienne AMM)
	Enoxacine		Oui	Non
	Enrofloxacine		Non	Oui
	Lomélofloxacine		Oui	Non
	Marbofloxacine		Non	Oui
	Norfloxacine		Oui	Non
	Ofloxacine		Oui	Non
	Sarafloxacine		Non	Non
Glycopeptides	Vancomycine	Paroi	Oui	Non
Lincosamides	Clindamycine	Ribosomes	Oui	Oui (uniquement chat ou chien)
	Lincomycine		Oui	Oui
Macrolides	Azithromycine	Ribosomes	Oui	Oui (cheval uniquement, liste susbtance essentielle)

Classe pharmacologique	ATB	Cible bactérienne	Utilisation en médecine humaine en France	Utilisation en médecine vétérinaire en France
	Clarithromycine		Oui	Non
	Érythromycine		Oui	Oui
	Josamycine		Oui	Non (ancienne AMM)
	Roxithromycine		Oui	Non
	Spiramycine		Oui	Oui
	Tilmicosine		Non	Oui
	Tylosine (dont tylosine B)		Non	Oui
Monobactames (β-lactamines)	Aztréonam	Paroi	Oui	Non
Pénicillines (β-lactamines)	Amoxicilline	Paroi	Oui	Oui
	Ampicilline		Oui	Oui
	Cloxacilline		Oui	Oui
	Dicloxacilline		Non (ancienne AMM)	Non (ancienne AMM)
	Oxacilline		Oui	Non (ancienne AMM)
	Pénicilline G (benzylpénicilline)		Oui	Oui
	Pénicilline V (phénoxyméthylpénicilline)		Oui	Oui
Phénicolés	Chloramphénicol	Ribosomes	Non (ancienne AMM)	Oui (uniquement chat ou chien)
	Florfénicol		Non	Oui
	Thiamphénicol		Oui	Oui
Polypeptides	Bacitracine	Membrane	Non (ancienne AMM)	Oui
Quinolones	Acide nalidixique	ADN	Non (ancienne AMM)	Non
	Acide oxolinique		Non (ancienne AMM)	Oui
	Acide pipémidique		Non (ancienne AMM)	Non
	Fluméquine		Non (ancienne AMM)	Oui
Streptogramines	Virginiamycine	Ribosomes	Non	Non*
Sulfamides	Sulfachloropyridazine	Synthèse de l'acide folique	Non	Non
	Sulfadiazine		Oui	Oui
	Sulfadiméthoxine		Non	Oui
	Sulfadoxine		Non	Oui
	Sulfamérazine		Non	Non
	Sulfaméthazine = Sulfadimidine		Non	Oui
	Sulfaméthizole		Oui	Non
	Sulfaméthoxazole		Oui	Oui
	Sulfaméthoxydiazine		Non	Non
	Sulfanilamide		Non	Oui
	Sulfapyridine		Non	Oui
	Sulfaquinoxaline		Non	Oui
	Sulfathiazole		Non	Non
Tétracyclines	Chlortétracycline	Ribosomes	Oui	Oui
	Doxycycline		Oui	Oui
	Oxytétracycline		Oui	Oui
	Tétracycline		Oui	Oui
Triméthoprime et dérivés	Triméthoprime	Synthèse de l'acide folique	Oui	Oui

[a] ATB anciennement utilisé en tant que facteur de croissance.

En l'absence de donnée sur l'activité « antibiotique » de l'ensemble des produits de transformation des ATB (voir définitions) formés lors de leur utilisation en médecine (métabolites) ou dans l'environnement par des processus de dégradations biotiques ou abiotiques, le GT a fait le choix de les prendre également en compte dans cette expertise. **Ils sont nommés « produits de transformation », quelles que soient leurs modalités de formation.** Certaines substances actives ou certains métabolites sont excrétés sous forme de conjugués qui peuvent être déconjugués lors des traitements de l'eau ou dans l'environnement (Dinh *et al.* 2017). Toutefois, peu de données relatives aux produits de dégradation des ATB ou à leurs formes conjuguées sont disponibles.

Les données de consommation d'ATB et les classifications d'ATB considérés comme « critiques » pour la santé humaine, décrites ci-après, ont été prises en compte pour l'interprétation des résultats.

2.3.1.1 Consommation d'antibiotiques en France

En France, les ATB sont utilisés uniquement en médecine humaine ou vétérinaire pour des traitements curatifs, prophylactiques et métaphylactiques. Ainsi, l'utilisation d'ATB comme facteur de croissance ou pour traiter les cultures est interdite.

En France, la consommation d'ATB fait l'objet d'une surveillance dans le cadre des actions nationales de lutte contre l'ABR en médecines humaine et vétérinaire. Les résultats de cette surveillance sont publiés annuellement par l'Agence nationale de sécurité des médicaments et produits de santé (Ansm), l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV - Anses) et l'Agence Santé publique France. Dans ce cadre, la consommation d'ATB est exprimée :

- En médecine humaine, en nombre de Doses Définies Journalières pour 1 000 habitants et par jour (DDJ pour 1 000 habitant^{-1}.j^{-1}), la DDJ constituant une posologie de référence fixée par l'OMS pour un adulte dans l'indication principale de chaque molécule,
- En médecine vétérinaire, en *Animal Level of Exposure to Antimicrobials* (ALEA), indicateur corrélé au pourcentage d'animaux traités par rapport à la population animale totale.

Ces indicateurs constituent le reflet de l'exposition primaire aux ATB des populations humaine ou animale et donc des pressions de sélection exercées.

Afin de comparer les concentrations en ATB mesurées dans l'environnement (en ng.L^{-1}) avec les consommations en médecine, le GT a privilégié la présentation des données de consommation d'ATB en tonnes par an. Comme ni la pharmacocinétique (métabolisme), ni l'impact des procédés de traitement sur le devenir des ATB n'entrent dans le champ du GT, les comparaisons ne sont qu'indicatives. Par conséquent, le GT a estimé suffisant de disposer des données de ventes d'ATB par classe pharmacologique en distinguant les usages en médecine humaine et en médecine vétérinaire (tableau II). En 2018, il a été vendu en France 863 tonnes d'ATB à usage systémique destinés à la santé humaine et 471 tonnes d'ATB destinés à la santé animale. Le nombre de substances actives autorisées en médecine humaine (79 en 2015 (Ansm 2017)) et en médecine vétérinaire (70 en 2018) sont similaires.

La classe des pénicillines est la plus consommée en médecine humaine avec plus de 500 tonnes par an, suivie par les streptogramines (≈ 50 tonnes.an^{-1}), les macrolides (≈ 35 tonnes.an^{-1}), les céphalosporines de 3^{e} génération (C3G) et de 4^{e} génération (C4G) (≈ 28 tonnes.an^{-1}) et les fluoroquinolones (≈ 25 tonnes.an^{-1}). L'usage des ATB en médecine humaine se répartit entre la médecine communautaire et la médecine hospitalière : en 2018, 85 % des ATB ont été utilisés en médecine de ville et 15 % en établissements de santé (en tonnes - tableau II). Bien que la plupart des ATB soit utilisée aussi bien en ville qu'à l'hôpital, certains sont réservés à l'usage hospitalier (tigécycline, glycopeptides, linézolide, daptomycine).

Tableau II. Tonnes d'antibiotiques à usage systémique vendus par an en France par classe pharmacologique, en médecine humaine et en médecine vétérinaire, en 2017 et 2018.

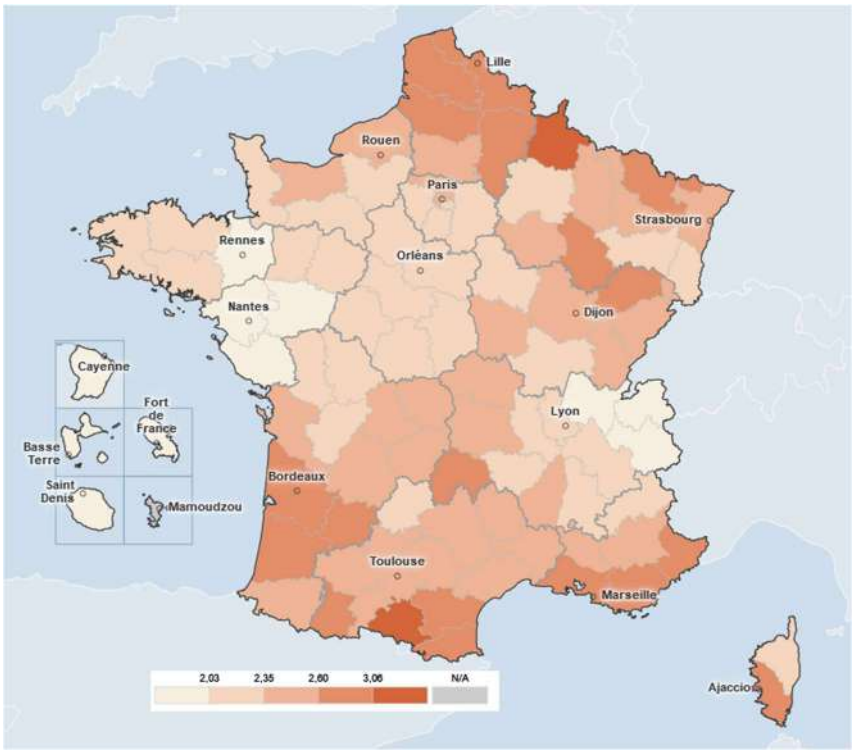
Classes pharmacologiques	Tonnes d'ATB vendus par an en France							
	2017				2018			
	Médecine humaine			Médecine vétérinaire	Médecine humaine			Médecine vétérinaire
	Ville	Hôpital	Total		Ville	Hôpital	Total	
Aminosides	0,25	0,8	1,05	54,83	0,17	0,74	0,91	52,03
Antibactériens stéroïdiens	1,95	0,06	2,01	N.U.	1,8	0,04	1,85	N.U.
Association spiramycine et métronidazole	75,41	0,29	75,7	-[c]	71,49	0,29	71,77	-[c]
Association sulfamides et triméthoprime	22,44	2,2	24,63	-[c]	23,46	2,27	25,73	-[c]
Autres céphalosporines	N.U.	0,01	0,01	N.U.	N.U.	0,01	0,01	N.U.
C1G et C2G	5,77	7,81	13,58	5,44	5,07	8,17	13,24	5,51
C3G et C4G[b]	16,77	12,03	28,79	0,11	14,94	12,81	27,75	0,12
Carbapénèmes	0,28	3,76	4,04	N.U.	0,22	3,55	3,78	N.U.
Dérivés de l'imidazole	0,03	1,83	1,86	-[c]	0,0004	1,93	1,93	-[c]
Dérivés du nitrofurane	1,17	0,003	1,17	N.U.	0,74	0,00003	0,74	N.U.
Fluoroquinolones	21,53	4,42	25,95	1,18	19,8	4,28	24,08	1
Glycopeptides	N.U.	1,61	1,61	N.U.	N.U.	1,56	1,56	
Lincosamides	2,79	1,65	4,45	3,01	3,07	1,39	4,46	3,04
Macrolides	34,81	1,43	36,23	33,99	32,2	1,46	33,66	32,09
Monobactames	0,05	0,09	0,15	N.U.	0,07	0,11	0,18	N.U.
Pénicillines[b]	471,37	80,57	551,94	72,68	489,24	84,23	573,48	70,63
Phénicolés	0,01	0,001	0,01	5,41	0,01	0,003	0,01	5,76
Pleuromutilines	N.U.	N.U.	N.U.	4,16	N.U.	N.U.	N.U.	3,54
Polypeptides	0,1	0,03	0,14	16,4	0,12	0,03	0,15	13,72
Quinolones	0,16	N.U.	0,16	3,33	0,1	N.U.	0,1	2,75
Streptogramines	49,17	1,47	50,64	N.U.	47,17	1,37	48,54	N.U.
Sulfamides	0,4	0,001	0,41	91,8	0,51	0,003	0,51	84,23
Tétracyclines	10,4	0,09	10,49	188,99	10,39	0,08	10,46	180,44
Triméthoprime et dérivés	0,003	N.U.	0,003	16,09	0,01	0,0001	0,01	15,15
Autres ATB	15,28	1,91	17,18[d]	1,32	15,77	2,15	17,91	1,39[d]
Total	**730,15**	**122,04**	**852,19**	**498,74**	**736,35**	**126,46**	**862,81**	**471,49**

N.U. = non utilisé ; [a] toutes espèces confondues ; [b] y compris association avec des inhibiteurs de β-lactamases ; [c] présentés dans d'autres classes ; [d] correspond à dimétridazole, métronidazole, pyriméthamine, rifaxime.

Source : pour la médecine humaine : Ansm 2020 ; pour la médecine vétérinaire : Anses/ANMV 2020

En médecine vétérinaire, les ATB les plus vendus sont les tétracyclines (> 180 tonnes.an^{-1}), les sulfamides (≈ 90 tonnes.an^{-1}), les pénicillines (≈ 71 tonnes.an^{-1}), les aminosides (≈ 53 tonnes.an^{-1}) et les macrolides (≈ 33 tonnes.an^{-1}). Certains ATB ne sont pas autorisés en médecine vétérinaire (tableau II).

Comme l'illustre la figure 2 pour la médecine humaine de ville, la consommation d'ATB n'est pas homogène sur l'ensemble du territoire français.



Source : Santé publique France - GÉODES, 2020.

Figure 2. Nombre de prescriptions en ville (médecine humaine) de tous les antibiotiques à usage systémique en 2018 (prescriptions.1 000 hab.$^{-1}$.j^{-1}).

2.3.1.2 Antibiotiques classés comme critiques en lien avec la problématique de l'antibiorésistance

Afin de guider les actions de lutte contre l'ABR, l'OMS (2019) a établi une liste des ATB d'importance critique pour la médecine humaine et l'OIE (2015) une liste des agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire. Ces listes ont été déclinées localement. Compte tenu de l'orientation de ce rapport, seuls les travaux concernant la santé humaine ont été explorés (annexe 2).

L'OMS (2019) estime que les céphalosporines de troisième, quatrième et cinquième générations, les glycopeptides, les macrolides et kétolides, les polymyxines et les quinolones sont des ATB d'importance critique pour la médecine humaine et sont associés à une priorité majeure.

Au niveau français, l'Ansm (2016) a listé deux catégories d'ATB critiques :

- Les ATB particulièrement générateurs de résistances : l'association amoxicilline-acide clavulanique, les céphalosporines, les fluoroquinolones et la témocilline ;
- Les ATB de dernier recours : parmi ceux-ci, les glycopeptides et les pénèmes sont également considérés comme particulièrement générateurs de résistances bactériennes.

La réglementation française relative à la médecine vétérinaire soumet l'usage des ATB critiques à restriction, car leur efficacité doit être prioritairement préservée dans l'intérêt de la santé humaine et animale. Les ATB vétérinaires définis comme critiques en France sont les C3G, C4G et les fluoroquinolones. Dans le même esprit, le plan Écoantibio 2 (Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt 2017) a fixé un objectif de réduction de 50 % de l'exposition des animaux à la colistine, même si cet antibiotique n'est pas classé comme critique en France.

2.3.2 Bactéries résistantes et supports génétiques de la résistance

Comme indiqué dans le cadrage de la saisine (§ 2.1.2), le GT a choisi d'axer son travail du point de vue de la santé humaine en considérant en priorité les **espèces bactériennes résistantes pathogènes, dont pathogènes opportunistes, pour l'Homme**.

Le GT a établi une liste des bactéries d'intérêt pour le suivi environnemental (tableau III), à partir de la liste des espèces ou genres pathogènes prioritaires résistants aux ATB définie par l'OMS (2017a). Elle contient des bactéries particulièrement préoccupantes pour la santé humaine, réparties en trois catégories selon l'urgence du besoin de nouveaux ATB : critique, élevée ou moyenne (voir annexe 2). Il s'agit pour la plupart de bacilles à Gram négatif.

- Bien que figurant dans la liste de l'OMS (2017a), les espèces *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ont été écartées des espèces bactériennes étudiées dans cette expertise puisqu'aucune donnée bibliographique ne renseigne leur présence dans l'environnement.
- Certaines bactéries ont été proposées dans plusieurs études pour suivre la résistance aux ATB dans les populations humaines et animales, ainsi que dans l'environnement : *Salmonella* non typhiques résistantes aux C3G, *Salmonella* Kentucky multirésistantes, *Escherichia coli* résistant aux C3G, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.
- *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* et *Campylobacter* spp. sont peu détectées dans l'environnement, sauf à rechercher les formes coccoïdes (dans le cas de Helicobacter pylori), l'état de viable mais non cultivable (VBNC : « Viable But Non Cultivable ») ou leur présence dans les amibes libres en milieu aquatique (Thompson et al. 2013 ; Bronowski, James et Winstanley 2014 ; Bai, Xi et Wu 2016).

Le GT a ajouté à cette liste les espèces bactériennes pathogènes potentiellement résistantes souvent retrouvées dans l'environnement, en tant que sources potentielles de GRA.

Toutefois, pour l'ensemble des espèces bactériennes présentées dans le tableau III, peu de données sont disponibles (bibliographie, rapports de recherche, bases de données). La faible contamination de l'environnements par la plupart de ces espèces bactériennes, explique que la majorité des études concernent *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux : espèces bactériennes indicatrices de contamination fécale, ou de l'efficacité de traitement des effluents.

Tableau III. Espèces, groupes ou genres bactériens d'intérêt pour un suivi environnemental.

Espèce, groupe ou genre bactérien	ATB ou classe d'ATB concernés par la résistance	Critères de prise en compte				Habitat réservoir principal* (Niche écologique)
		OMS (2017a)			Ajout du GT	
		Priorité 1	Priorité 2	Priorité 3		
Acinetobacter baumannii	Carbapénèmes	■				Animaux et Homme
Pseudomonas aeruginosa	Carbapénèmes	■				Homme, poissons et eaux
Klebsiella pneumoniae	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Escherichia coli	Carbapénèmes, C3G (indicateur)	■				Homme et animaux
Enterobacter spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Serratia spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Proteus spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Providencia spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Morganella spp.	Carbapénèmes, C3G	■				Homme et animaux
Enterococcus faecium	Vancomycine		■			Homme et animaux
(*Staphylococcus aureus*)	Méticilline (indicateur)		■			Mammifères et oiseaux
(*Helicobacter pylori*)	Clarithromycine		■			Primates
(*Campylobacter* spp.)	Fluoroquinolones		■			Animaux
Salmonella non typhiques	Fluoroquinolones		■			Animaux
Salmonella non typhiques	C3G (indicateur)				■	Animaux
Salmonella Kentucky	Multi-R (indicateur)				■	Animaux
Shigella spp.	Fluoroquinolones			■		Homme
Aeromonas spp.					■	Eaux douces et animaux associés
Stenotrophomonas maltophilia					■	Sols (dont rhizosphère)
Vibrio spp.					■	Eaux littorale et marine et animaux marins
Flavobacterium spp.					■	Eaux et sols
Clostridium perfringens					■	Homme et animaux Sols et eaux
Clostridioides difficile					■	Homme et animaux
Burkholderia cepacia sensu lato					■	Plantes et sols

* Informations données à titre indicatif ; C3G=céphalosporines de 3e génération.

Les espèces ou genres bactériens entre parenthèses (tableau III) sont peu détectés dans l'environnement, sauf à rechercher les formes coccoïdes (dans le cas de *Helicobacter pylori*), l'état « viable mais non cultivable » (VBNC : « *Viable But Non Cultivable* ») ou leur présence dans les amibes libres en milieu aquatique.

Pour mener cette expertise, l'ensemble des études concernant les supports génétiques de la résistance a été retenu, auquel s'ajoutent les études de métagénomique les plus informatives.

Les principaux gènes de résistance évoqués dans ce rapport sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV. Principaux gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés évoqués dans ce rapport (plus d'informations sur les GRA sont disponibles sur https://card.mcmaster.ca/).

GRA	Protéines codées	ATB affectés
intI1, intI2, intI3	Intégrase des intégrons de classe 1, 2 ou 3	-
sul1, *sul2, sul3*	Dihydroptéroate synthétase qui confère une résistance aux sulfamides	sulfonamides
bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, bla_{SHV}	β-lactamases fréquentes chez les *Enterobacteriaceae*	β-lactamines
bla_{NDM-1}	New Delhi metallo-β-lactamase	carbapénèmes
bla_{VIM}	Verona Integron-encoded metallo-β-lactamase	carbapénèmes
bla_{KPC}	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase	carbapénèmes
bla_{IMP}	Imipénémase	carbapénèmes
qnrA, qnrS, qnrB, qnrD	Protéines à motifs pentapeptidiques répétés	fluoroquinolones
aac-(6')-*Ib-cr*	Acétyltransférase bifonctionnelle qui peut agir sur deux classes de molécules antibiotiques	aminosides, fluoroquinolones
vanA, vanB	Ligases générant des précurseurs de paroi modifiés	glycopeptides
mecA	Transpeptidase additionnelle de *S. aureus*	β-lactamines
erm(B), *erm*(F)	Enzymes de méthylation de l'ARNr 23S qui empêchent la fixation de plusieurs antibiotiques	macrolides, lincosamides
tet(M), *tet*(W), *tet*(Q)	Protéines de protection ribosomale agissant avec le GTP	tétracyclines
tet(B), *tet*(L), *tet*(G), *tet*(H)	Protéines d'export (efflux) utilisant la force protomotrice	tétracyclines
aphA	Aminoglycoside phosphotransférase	aminosides
mph	Macrolide 2'-phosphotransférase	macrolides
msr(E)	Protéine de protection du ribosome	macrolides
ere(A)	Estérase inactivant les macrolides	macrolides
mcr-1	Phosphoéthanolamine transférase	colistine
ccrA (=cciA, cfiA)	β-lactamase	β-lactamines

3 Généralités sur l'antibiorésistance

3.1 Origine(s) naturelle(s) des antibiotiques et de l'antibiorésistance

Le parvome définit la sphère bioactive du métabolisme cellulaire des organismes vivants (Davies et Ryan 2012). Les ATB, parties intégrantes du parvome des micro-organismes de l'environnement, ont de façon naturelle un rôle majeur dans la compétition pour les nutriments et l'habitat. Ils confèrent d'évidence un avantage sélectif de croissance aux producteurs face aux concurrents qui n'auraient pas moyen d'échapper à leur action délétère. Grâce à la (méta)génomique et aux nouveaux outils développés en chimie analytique, les recherches actuelles visent à mieux cerner toutes les facettes de l'action de ces molécules dans les interactions microbiennes au sein des écosystèmes ; elles permettent d'appréhender les facteurs intra- et intercellulaires régulant leur production, les doses synthétisées et effectives lors des temps d'interactions ou les modalités d'impact sur la structure des populations microbiennes et leurs activités.

L'analyse d'ADN microbien ancien, extrait d'un permafrost datant du Pléistocène (30 000 ans), a permis d'isoler une collection de gènes de résistance à 14 ATB commercialisés aujourd'hui, certains de ces gènes étant homologues à ceux qui confèrent une résistance aux β-lactamines actuelles (D'Costa *et al.* 2011). Des résultats analogues ont été obtenus dans des environnements dénués de pression anthropique (Bhullar *et al.* 2012). Les voies de biosynthèse de l'érythromycine et de la streptomycine dateraient de 600 millions d'années (Gillings 2013). Les GRA sont donc assurément aussi vieux que les gènes de biosynthèse puisqu'ils ont la nécessité de coexister sur les mêmes régions du génome chez les micro-organismes producteurs car la régulation de leur expression s'exerce conjointement. Quand l'ATB est produit, il faut activer le ou les mécanismes de protection/résistance. Des approches de métagénomique ont démontré que le microbiote du sol, source de nombreux micro-organismes producteurs d'ATB, est un réservoir de GRA, avec des séquences proches phylogénétiquement de celles retrouvées chez les espèces bactériennes pathogènes d'importance clinique. Ces GRA aux séquences similaires sont souvent portés par des EGM, tels que les plasmides, transposons ou les intégrons (Forsberg *et al.* 2012 ; Nesme et Simonet 2015 ; Jiang *et al.* 2017).

Dans l'environnement, la production d'ATB par les micro-organismes permettrait la régulation de la transcription de nombreux gènes et la mutagénèse. L'action mutagène des ATB repose sur une activation de la réponse SOS (voir § 4.1.1.4), avec augmentation de la fréquence des transferts de gènes et de la transposition ; elle induit l'apparition de phénotypes hyper-mutateurs (Goh *et al.* 2002 ; Davies, Spiegelman et Yim 2006 ; Kohanski, DePristo et Collins 2010 ; Gullberg *et al.* 2011 ; Blázquez *et al.* 2012 ; Gillings 2013). Ainsi, avant l'usage des ATB en médecine humaine ou vétérinaire, la production de ces molécules aurait été un facteur essentiel de variabilité génétique des communautés microbiennes dans l'environnement, facilitant ainsi leur adaptation à des niches écologiques souvent hostiles (Fajardo et Martínez 2008 ; Aminov 2009 ; Bhullar *et al.* 2012 ; Blázquez *et al.* 2012 ; Cordero *et al.* 2012).

Cordero *et al.* (2012) illustrent ce phénomène en montrant qu'en milieu océanique, les *Vibrionaceae* sont structurées selon les habitats en clusters génotypiques, au sein desquels un large panel d'ATB est produit par quelques génotypes, alors que tous les autres portent les GRA assurant leur survie. Au sein d'une même niche écologique, la production d'ATB et l'acquisition des GRA permettraient une coopération entre bactéries de même espèce pour une compétition entre populations. La capacité à produire des ATB ou à interagir avec ces molécules (*via* des GRA) serait donc un paramètre de contrôle de la dynamique des communautés microbiennes dans l'environnement.

Ainsi, il convient de replacer l'utilisation thérapeutique actuelle des ATB dans un contexte évolutif ancien et permanent du monde microbien (Aminov 2009 ; Blázquez *et al.* 2012 ; Gillings 2013). La base structurale de la plupart des classes d'ATB utilisées au XXI^{e} siècle trouve son origine dans les sols. L'industrie pharmaceutique a puisé abondamment dans ce gisement naturel offert par les micro-organismes des sols pour développer de nouvelles molécules (Fischbach et Walsh 2009). Le cycle β-lactame de la pénicilline est devenu en près d'un siècle le noyau chimique actif commun à plusieurs générations de composés antibiotiques naturels ou modifiés : les céphalosporines et les

carbapénèmes répondent à ce besoin de rendre les ß-lactamines de plus en plus actives, soit pour élargir le spectre d'activité, soit pour contourner une résistance, soit pour améliorer les paramètres pharmacocinétiques. Les macrolides, et plus récemment les quinolones et les tétracyclines, ont suivi le même chemin d'évolution chimique mais les variantes d'une même structure ont leurs limites d'efficacité antibactérienne. C'est pourquoi les écosystèmes marins, en particulier ceux des grands fonds, commencent à être explorés et étudiés pour diversifier l'espace chimique destiné à combattre les espèces bactériennes pathogènes (Tortorella *et al.* 2018).

3.2 Définition et caractérisation d'un phénotype de résistance

Les ATB sont des molécules naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques capables de tuer les bactéries (ATB bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (ATB bactériostatique). Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle se multiplie en présence d'un ATB donné. Cette capacité à résister peut être intrinsèque à toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien (résistance naturelle). Les gènes conférant ce type de résistance sont localisés sur le chromosome : ils sont très peu ou pas transférables horizontalement entre bactéries. À l'inverse, les résistances acquises ne s'observent qu'au sein d'une sous-population d'une espèce décrite comme sensible à l'ATB. Ce type de résistance s'explique soit par une mutation de gènes chromosomiques (modification du capital génétique), soit par l'acquisition de gènes allochtones par transfert horizontal de gènes (THG) qui s'effectue sur des supports mobiles tels que plasmides, phages transducteurs ou transposons.

Le profil phénotypique de résistance d'une bactérie aux ATB peut être mesuré de différentes manières. La méthode par diffusion, ou antibiogramme standard, est une méthode semi-quantitative très utilisée par les laboratoires car bien adaptée en termes de vitesse d'exécution et de coût. Elle utilise des disques d'ATB de concentration définie déposés sur une boîte de gélose nutritive ensemencée avec une espèce bactérienne dont la sensibilité est étudiée. L'interprétation des diamètres de sensibilité s'effectue selon les recommandations du Comité d'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et de l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptility Testing*) (voir ci-dessous). Une variante quantitative de cette méthode consiste à utiliser non pas des disques mais des bandelettes contenant chacune un gradient prédéfini et continu d'ATB. Cette variante donne accès à un paramètre déterminé normalement avec les méthodes de dilution effectuées en milieu liquide (microplaques) ou solide (boîtes de Pétri) : la valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI - voir définitions).

Les résistances épidémiologique et clinique comportent leurs propres seuils, respectivement « *breakpoints* » épidémiologiques ou cliniques qui sont souvent officiellement référencés. Le comité européen EUCAST établit ces valeurs critiques pour les espèces bactériennes d'intérêt médical. Les notions de résistance épidémiologique ou clinique sont distinctes.

- La résistance épidémiologique se définit sur des critères bactériologiques ; elle est centrée sur l'espèce bactérienne et la compilation d'un grand nombre de données de CMI pour visualiser leur distribution modale à l'intérieur de la population sauvage (de l'anglais « *wild-type* »). Selon les critères épidémiologiques, une souche devient « non sauvage » dès qu'elle acquiert un mécanisme de résistance aux ATB, quel que soit le niveau de résistance. La valeur seuil de CMI d'un ATB pour une espèce analysée sous cet angle est le ECOFF (de l'anglais « *Epidemiological Cut-OFF »*). Une résistance naturelle, puisqu'elle est intrinsèque et concerne toutes les souches d'une même espèce, peut ainsi être considérée comme un phénotype sauvage. La définition épidémiologique permet une détection précoce des acquisitions de résistances au sein d'une espèce : c'est un outil prédictif de l'émergence d'un phénotype de résistance non naturel.
- La notion de résistance clinique se définit *a contrario* sur des critères thérapeutiques ; elle est centrée sur le patient et la probabilité de le traiter efficacement. Selon les critères cliniques, une souche est résistante (R) si elle est associée à une haute probabilité d'échec thérapeutique et sensible (S) si elle est associée à une forte probabilité de succès aux doses recommandées du traitement ATB. Les souches classées intermédiaires (I) sont celles pour lesquelles le succès du traitement est incertain (zone tampon liée aux incertitudes techniques

et biologiques). Cette définition clinique de l'ABR est donc basée exclusivement sur le résultat thérapeutique, indépendamment des mécanismes sous-tendant les possibles écarts avec la population sauvage.

■ Autres formes de résistance : tolérance, dormance et persistance

En parallèle des phénotypes de résistance mettant en jeu la modification du capital génétique, les mécanismes épigénétiques de persistance, de tolérance et de dormance, améliorent la survie des bactéries aux ATB bactéricides sans modifier leur CMI (figure 3a). Ces phénomènes, dont les mécanismes sont encore peu élucidés, font l'objet actuellement de nombreux travaux (Fisher, Gollan et Helaine 2017).

La définition même des termes persistance et tolérance a fait récemment l'objet d'un consensus lors d'un atelier rassemblant les chercheurs travaillant sur la persistance aux ATB en juin 2018[3].

- La **tolérance aux ATB** est un phénomène qui permet à une population bactérienne clonale de survivre à des concentrations d'ATB supérieures aux CMI des bactéries sensibles, et cela sans posséder un facteur/gène de résistance. La courbe de bactéricidie indique qu'il faut plus de temps pour éliminer les bactéries tolérantes que les sensibles (figure 3b).
- La **persistance aux ATB** fait référence à une population bactérienne hétérogène où une partie de la population va être éliminée rapidement lors du traitement ATB alors qu'une sous-partie de la population sera éliminée plus lentement. La courbe de bactéricidie a une allure diphasique (figure 3c).
- Dans le contexte environnemental, ces phénomènes sont à rapprocher du **stade de dormance** dans lequel peuvent se trouver des bactéries rencontrant des conditions défavorables à leur croissance. Ces bactéries (appelées « *persister* » en anglais) sont dans un état VBNC (Kim *et al.* 2018). Elles sont souvent tolérantes à de nombreux ATB en raison d'une activité métabolique réduite et du fait qu'elles ne se multiplient pas.

[3] European Molecular Biology Organization (EMBO) : Workshop Bacterial Persistence and Antimicrobial Therapy, 10 au 14 juin 2018 à Ascona, Suisse

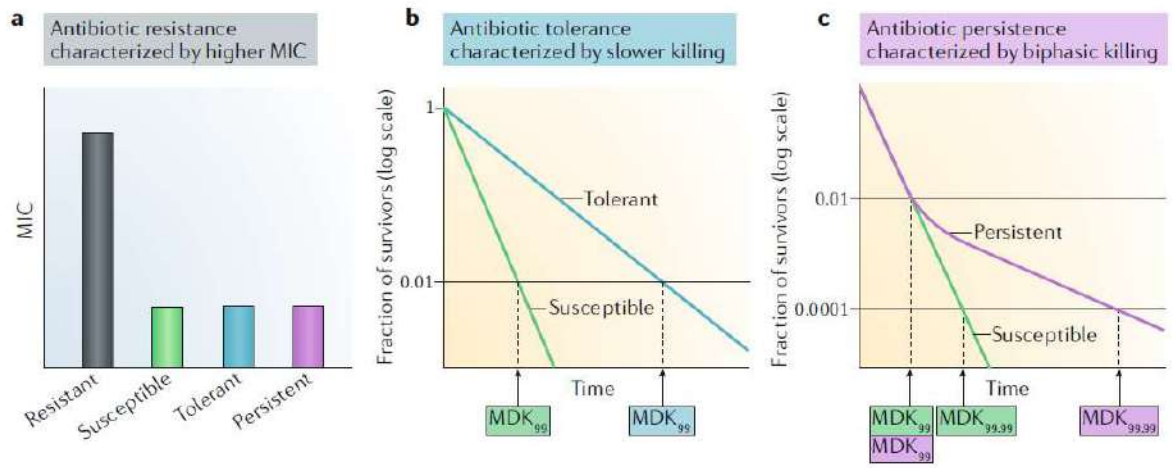


Figure 3. Résistance, tolérance et persistance face aux antibiotiques (Balaban *et al.* 2019).
La résistance, la tolérance et la persistance sont des réponses distinctes au traitement antibiotique qui entraînent une survie accrue par rapport aux cellules sensibles. (a) Pour inhiber la croissance des bactéries résistantes, il faut une concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ATB plus élevée que pour les bactéries sensibles. En particulier, la persistance et la tolérance n'entraînent pas une augmentation de la CMI par rapport aux bactéries sensibles. (b) En revanche, la tolérance augmente la durée minimale de lyse cellulaire (minimum duration for killing - MDK ; par exemple, pour 99 % des cellules bactériennes de la population - MDK 99 - par rapport aux bactéries sensibles. (c) La persistance conduit à une CMI et à une mort initiale de la population bactérienne similaires à celles des bactéries sensibles ; cependant, la MDK pour 99,99 % des cellules bactériennes de la population - MDK 99,99 - peut être sensiblement plus élevée en raison de la survie des cellules persistantes. Il faut noter qu'une cinétique exponentielle de lyse de la souche sensible est rarement observée car la plupart des cultures bactériennes présentent un certain niveau de persistance. Les données présentées ne sont que des illustrations et non des mesures réelles.

3.3 Mécanismes et génétique de la résistance aux antibiotiques

Pour les cas de résistance acquise (voir § 3.2), il existe trois mécanismes principaux permettant aux bactéries de résister aux ATB (figure 4).

- Le premier mécanisme est la production d'une enzyme modifiant ou hydrolysant l'ATB. Ce mécanisme est notamment celui qui permet aux entérobactéries de résister aux β-lactamines. Il existe un grand nombre de β-lactamases, ayant toutes un spectre d'activité différent. Ces enzymes confèrent diverses résistances, allant des premières générations (pénicillinases) aux dernières générations (carbapénémases) de β-lactamines. L'inactivation de l'ATB est également le principal mécanisme en jeu dans la résistance aux aminosides (par les enzymes de type aminoglycoside acétyltransférase (AAC), aminoglycoside phosphotransférase (APH) et aminoglycoside nucléotidyl transférase (ANT)) et au chloramphénicol (enzymes de type chloramphénicol acétyltransférase (CAT)). Les gènes codant ces différentes enzymes sont le plus souvent portés par des déterminants génétiques mobiles, notamment des plasmides. Ce mécanisme confère généralement une résistance de haut niveau aux ATB.
- Le deuxième mécanisme est la modification ou le remplacement de la cible de l'ATB. L'exemple emblématique du remplacement de cible est le mécanisme de résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM). Cette résistance est due à l'acquisition du gène *mecA* codant la protéine liant la pénicilline 2A (PLP2A), qui remplace les autres PLP ciblées par les β-lactamines. La PLP2A permet donc la poursuite de la synthèse de la paroi bactérienne même en présence de β-lactamines. Chez toutes les bactéries, la résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramines B (phénotype MLS_B) est due à la modification de la cible de ces ATB, l'ARNr 23S, par les gènes *erm*. La résistance aux fluoroquinolones est également le plus souvent médiée par une modification de cible, avec

une accumulation de mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA* et *parC*. Ce mécanisme confère généralement une résistance de haut niveau aux ATB.

- Le troisième mécanisme regroupe les phénomènes concourant à diminuer la concentration intracellulaire de l'ATB, à savoir l'imperméabilité et l'efflux actif. L'imperméabilité est due à la modification ou à l'inactivation de porines, qui sont des canaux permettant le transport passif de substances à travers la membrane bactérienne. La mutation/inactivation de ces porines est impliquée dans la résistance aux carbapénèmes, notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* par l'altération de la porine OprD, et chez *Enterobacter* spp. par une perte de porine couplée à une dé-répression du gène chromosomique codant la céphalosporinase AmpC. Le mécanisme d'efflux repose quant à lui, sur des pompes transmembranaires, qui expulsent plus ou moins spécifiquement des ATB vers l'extérieur de la bactérie. Les systèmes d'efflux ont un rôle majeur dans les phénomènes de résistance naturelle. Ils sont également impliqués dans un grand nombre de résistances acquises, notamment celles à la tétracycline (gènes *tet*), aux macrolides ou aux lincosamides (résistances isolées dues aux gènes *msr*(A) ou *mefA*). La résistance aux ATB n'est qu'une des nombreuses fonctions des systèmes d'efflux dans le monde bactérien. Les gènes à l'origine des systèmes d'efflux existaient bien avant l'utilisation des ATB par l'Homme. Il est d'ailleurs avéré que les ATB peuvent en être des substrats de façon « fortuite » en raison du large spectre de certains systèmes d'efflux (Neyfakh 1997). C'est ce qu'illustre l'exemple des fluoroquinolones, ATB de synthèse et pourtant substrats de nombreux systèmes d'efflux (Alvarez-Ortega, Olivares et Martínez 2013). Il a été montré que les systèmes d'efflux permettent une adaptation des bactéries à une exposition à des agents antimicrobiens dans différents environnements, par exportation de substances toxiques comme les ammoniums quaternaires (Tennent *et al.* 1989), les éléments traces métalliques (ETM) (Nies 2003 ; Perron *et al.* 2004) ou encore les isoflavones (Palumbo, Kado et Phillips 1998). Ce mécanisme confère généralement une résistance de bas niveau aux ATB.

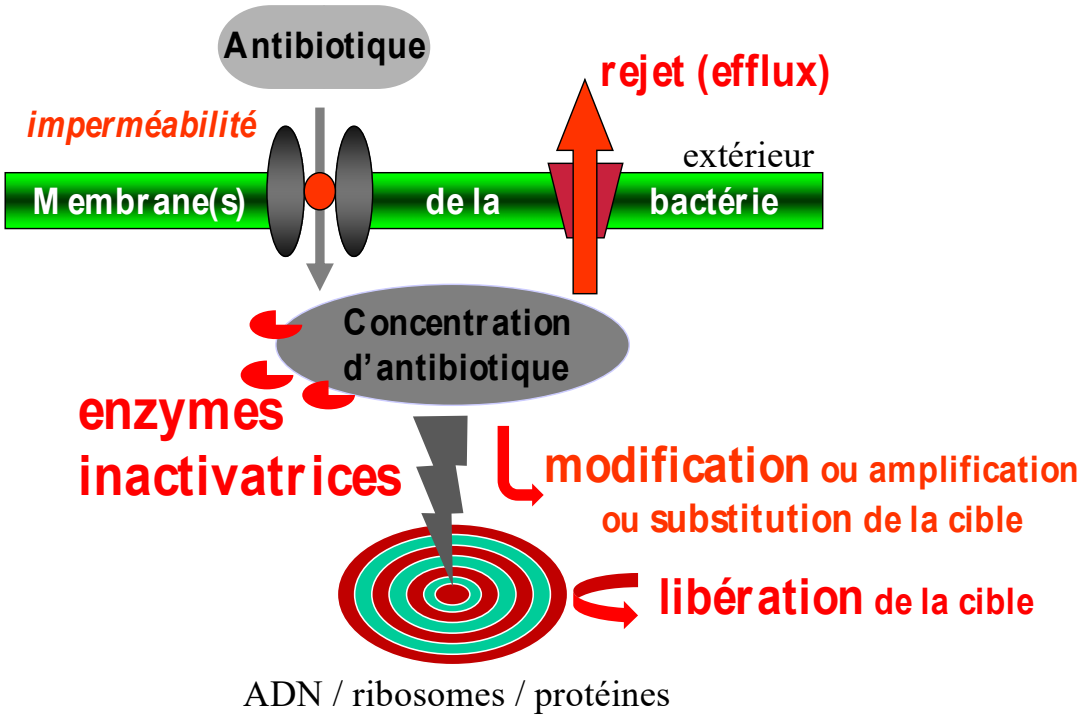


Figure 4. Principaux mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.
La taille des polices de caractères utilisée pour chaque mécanisme est fonction de sa prévalence dans les THG. L'imperméabilité est en italique car ce n'est pas un mécanisme sujet au THG.

3.4 Modes de dissémination de la résistance aux antibiotiques

Les mutations ponctuelles surviennent de façon aléatoire sur le génome bactérien, et celles conférant un avantage adaptatif à la bactérie sont fixées par la pression de sélection antibiotique. La résistance aux fluoroquinolones est une des résistances majeures faisant appel à ce mécanisme de sélection. Ce type de résistance est transmis verticalement d'une bactérie mère à ses bactéries filles. C'est un mode de dissémination clonal lié à la vitesse de multiplication d'une bactérie.

La grande majorité des phénotypes de résistance observés dans l'environnement et en clinique sont dus à l'acquisition de gènes de résistance externes à la bactérie. Les THG peuvent avoir lieu par conjugaison, transformation et/ou transduction (figure 5). La conjugaison est considérée comme étant le mécanisme le plus efficace pour échanger du matériel génétique entre bactéries. La transformation, restreinte au laboratoire à certaines espèces bactériennes dites naturellement transformables, pourrait être plus répandue qu'on ne le croit dans la nature, notamment dans les sols. La transduction dépend de l'infection par un bactériophage véhiculant des éléments autres que son propre génome dans sa capside phagique, parfois des gènes de résistance. Les bactériophages sont des virus qui s'attaquent exclusivement aux bactéries. Ils sont trouvés dans tous les environnements comportant des bactéries (flores commensales digestives de l'Homme et des animaux, eaux, sols, végétaux, *etc*…) et ils représentent le plus grand réservoir de biodiversité non caractérisée. Ils sont considérés comme les « entités biologiques » les plus abondantes de la biosphère, avec un nombre estimé à plus de 10^{30} (Chibani-Chennoufi *et al.* 2004). Ils jouent notamment un rôle important dans la régulation des communautés bactériennes au sein des écosystèmes, comme en attestent les études démontrant que les phages peuvent réduire une population bactérienne de près de 50 % en 48 heures (Gilmore 2012).

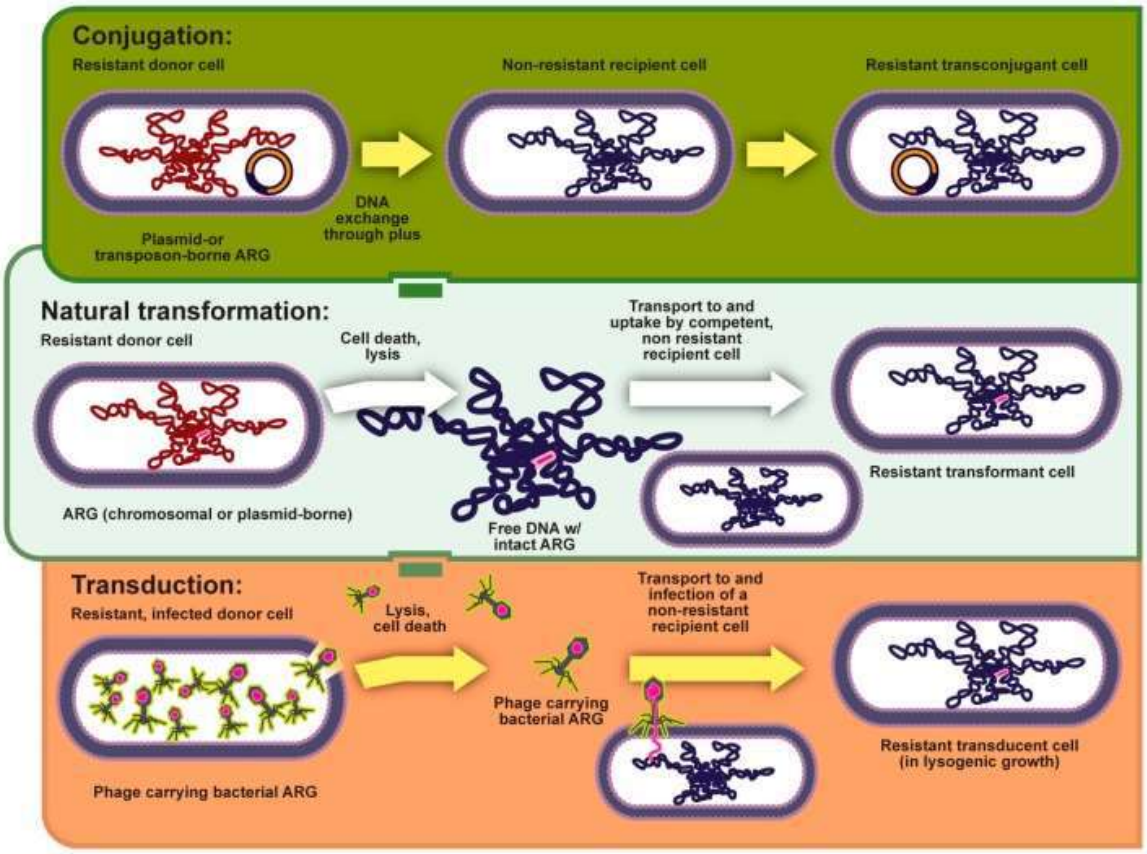


Figure 5. Transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques : conjugaison plasmidique, transposition et/ou transduction (Schroeder, Brooks et Brooks 2017).

L'acquisition de GRA par transposition peut accompagner les trois voies de transfert de gènes. Le transfert de GRA par transduction n'est possible que s'il s'accompagne d'un phénomène de lysogénie.

Les gènes de résistance observés en clinique chez les espèces bactériennes pathogènes sont pour la plupart portés par des éléments génétiques mobiles (mobilome). Ces transferts de gènes structurent les communautés microbiennes. Ils peuvent se faire entre bactéries de phyla même éloignés, et franchir occasionnellement les barrières de règne entre procaryotes et eucaryotes quand ceux-ci sont intimement liés (Frey-Klett *et al.* 2011 ; Dimitriu *et al.* 2014).

Parmi les éléments mobiles, se distinguent principalement :

- **Les plasmides** : ce sont des molécules d'ADN bicaténaire, extrachromosomiques, circulaires et capables d'autoréplication, d'environ 1 à 400 kilobases. Un plasmide renferme au moins l'information requise pour se répliquer mais peut également porter plusieurs gènes conférant un avantage à la bactérie, notamment des gènes de résistance aux ATB. Les plasmides ont une capacité de transfert horizontal intra- ou inter-espèce, ce qui peut rendre leur dissémination très dynamique. Le transfert plasmidique d'une cellule bactérienne à une autre résulte principalement du phénomène de conjugaison (transfert par contact physique entre deux bactéries de la même espèce ou d'espèces éloignées permettant le transfert de plasmides de la cellule donneuse à la cellule receveuse *via* les pilis). Les plasmides de conjugaison possèdent des régions de transfert *oriT* (origine du transfert) et codantes *tra* (génération de pilis). Les petits plasmides appelés « mobilisables » ont seulement l'origine de transfert et sont dépourvus des gènes nécessaires à l'édification du tube de conjugaison.
- **Les éléments transposables** : ce sont des éléments génétiques linéaires constitués de séquences d'ADN bicaténaire capables de promouvoir leur propre transfert d'un réplicon (chromosome ou plasmide) à un autre. Ils ne sont donc pas autonomes et sont répliqués avec le réplicon qui les portent, pouvant ainsi servir de véhicule aux gènes de résistance. Les transposons sont classés en plusieurs catégories fonctionnelles qui reflètent des différences structurales. De manière globale, sont distingués :
  - Les séquences d'insertion (SI) : éléments transposables les plus simples, de petite taille, cryptiques, contenant uniquement les éléments de transposition. Plus de 500 SI ont été identifiées. Elles jouent un grand rôle dans la plasticité génomique.
  - Les transposons composites : formés par deux SI encadrant et pouvant mobiliser un segment d'ADN. Les transposons liés à la transmission de la résistance aux ATB sont souvent des transposons composites : les exemples du transposon Tn*10* véhiculant la résistance à la tétracycline, du transposon Tn*5* véhiculant la résistance à la kanamycine ou du transposon Tn*9* véhiculant la résistance au chloramphénicol, illustrent cette situation chez les bactéries à Gram négatif.
  - Les transposons non composites : sans SI à leurs extrémités qui peuvent également contenir des gènes de résistance aux ATB (Tn*3,* Tn*1721*, Tn*554*) et parfois un intégron porteur de gènes de résistance dans ses cassettes.
  - Les transposons conjugatifs (TnC) : ils combinent les propriétés d'intégration des bactériophages et de transfert des plasmides conjugatifs. Les TnC disséminent les gènes de résistance aux ATB, notamment chez les bactéries à Gram positif. Ces structures sont également appelées « éléments intégratifs et conjugatifs » (*Integrative and Conjugative Element*, ICE).

  De nombreux transposons plasmidiques porteurs de gènes de résistance à la quasi-totalité des ATB utilisés ont été décrits.
- **Les intégrons** : ils constituent un système de capture et d'expression des gènes, sous forme de cassettes qu'ils sont susceptibles d'acquérir ou de perdre par un mécanisme de recombinaison spécifique de site catalysé par une intégrase. Les intégrons peuvent être portés par des plasmides, des transposons, ou plus rarement être localisés sur le chromosome des bactéries, et ainsi peuvent être mobilisés. À ce titre, ils sont considérés comme jouant un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance car ils sont capables d'incorporer des gènes (de résistance) et de les convertir en gènes fonctionnels en leur fournissant un système d'expression adapté et modulable *via* de nombreuses combinaisons de cassettes.

La plateforme fonctionnelle d'un intégron est constituée d'un gène *intI*, codant une intégrase, du site *attI*, site spécifique de recombinaison et d'un promoteur Pc (figure 6). Trois classes principales d'intégrons ont été associées à la résistance aux ATB selon la nature de leur intégrase : les intégrons de classe 1, 2 et 3. Plus de 130 gènes de résistance ont été décrits parmi ces cassettes; ils confèrent des résistances aux ATB, tels que les β-lactamines (*bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{OXA}$), les aminosides (*aad*, *aac*, *aph*) ou les quinolones (*qnr*), mais également à des éléments traces métalliques (ETM) ou des antiseptiques (ammoniums quaternaires et biguanides : QAC).

La plasticité du génome bactérien complexifie le descriptif ci-dessus. En effet, les plasmides peuvent s'intégrer dans le chromosome, les transposons peuvent sauter du chromosome à un plasmide ou inversement, et les intégrons peuvent être localisés sur le chromosome mais également sur des plasmides ou des transposons. Apparaissent ainsi des structures modulaires plus ou moins complexes (un intégron localisé sur un transposon lui-même inséré dans un plasmide, par exemple) capables de disséminer efficacement. Des mutations ponctuelles peuvent modifier ces gènes acquis et élargir le spectre des enzymes produites (ex : β-lactamases TEM 1/ 2 qui ont donné naissance à plus de 150 β-lactamase à spectre étendu (BLSE)).

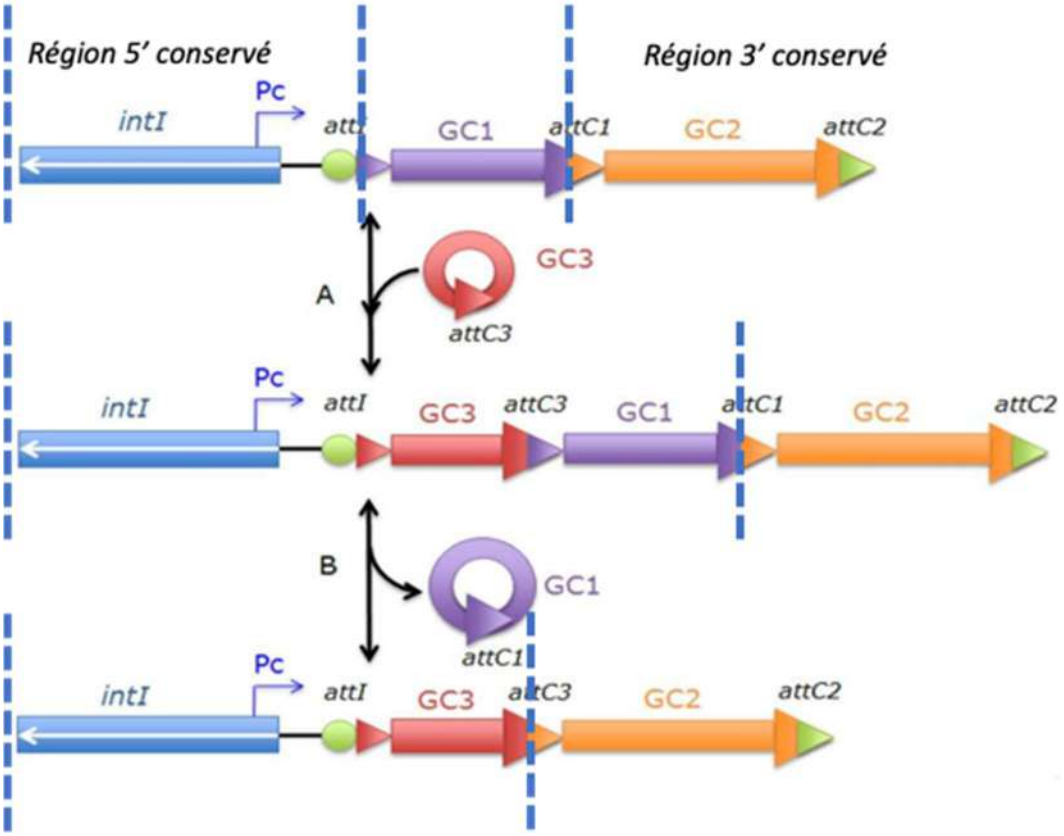


Figure 6. Organisation générale d'un mécanisme de recombinaison des intégrons et des cassettes de gènes (Barraud et Ploy 2011 ; Stalder *et al.* 2012).

Pc=promoteur des cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2*, *attC3*=sites spécifiques de recombinaison ; *intI*=gène de l'intégrase ; GC1, GC2, GC3=cassettes de gènes.
IntI assure l'insertion et l'excision des cassettes dans l'intégron (GC). L'intégration d'une cassette se fait préférentiellement au site *attI*. Dans cet exemple (A), une cassette circulaire GC3 est intégrée sous forme linéaire par recombinaison spécifique de site entre le site *attI* et son site *attC3*. L'excision d'une cassette se fait préférentiellement par recombinaison entre deux sites *attC*. Dans cet exemple (B), la cassette GC1 est excisée après recombinaison entre les sites *attC1* et *attC3*.

Le rôle des bactériophages dans la dissémination de gènes de résistance a été peu étudié. Les bactériophages sont très fréquents dans les environnements anthropisés (effluents de stations de traitement des eaux usées (STEU)) et naturels (océans, lacs, sols). Ils sont par ailleurs relativement

persistants dans l'environnement. Ces éléments concourent à s'interroger sur le rôle des bactériophages dans la dissémination de l'ABR, notamment dans la sphère environnementale (Muniesa, Colomer-Lluch et Jofre 2013 ; Colavecchio *et al.* 2017 ; Balcázar 2018).

Les bactériophages isolés dans l'environnement peuvent contenir des GRA (Calero-Cáceres et Balcázar 2019). Notamment, des études récentes ont montré que les viromes (*i.e.*, ensemble des génomes d'une population virale) isolés d'environnements aquatiques, d'effluents de STEU, de fèces animales contenaient un large réservoir de GRA (Colombo *et al.* 2017 ; Lekunberri *et al.* 2017). Les phages porteurs de GRA peuvent conférer à leur bactérie hôte un avantage pour survivre dans un environnement exposé à une pression de sélection exercée par des résidus d'ATB.

D'autres études ont également mis en évidence la transduction de GRA par l'intermédiaire de bactériophages isolés de l'environnement. Battaglioli *et al.* (2011) ont montré que quatre phages isolés d'eaux usées permettaient de transférer un marqueur génétique conférant la résistance à la kanamycine à des souches d'*E. coli* uropathogènes. Ross et Topp (2015) ont mis en évidence que des bactériophages purifiés à partir de sols augmentaient la proportion de coliformes résistants lorsqu'une pression de sélection est appliquée (céfoxitine et sulfaméthazine).

Keen *et al.* (2017) ont décrit que certains phages d'*E. coli* lytiques étaient à l'origine, durant la phase de lyse bactérienne, de la libération d'ADN plasmidique intact et apte à la transformation. Les auteurs ont, par ailleurs, montré que l'ajout de ces phages à des co-cultures d'*E. coli* résistantes à la kanamycine et de *Bacillus sp.* sensibles à la kanamycine conduisait à une augmentation de *Bacillus sp*. résistants à la kanamycine par rapport aux co-cultures sans ajout de phages.

Néanmoins, il reste à préciser l'importance de ces mécanismes dans la dissémination et la persistance des GRA en conditions naturelles.

3.5 Autres éléments de résistance associés aux gènes de résistance aux antibiotiques

Outre les ATB, d'autres substances ont des propriétés antimicrobiennes contre lesquelles les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance, dont certains sont similaires à ceux impliqués dans la résistance aux ATB. Ainsi, les éléments traces métalliques (ETM, tels que notamment le plomb, le mercure, le cadmium ou le zinc) et les biocides antimicrobiens ont la capacité de co-sélectionner des résistances aux ATB (SCENIHR 2009). Les gènes de résistance aux ETM et aux biocides sont retrouvés dans 86 % des génomes bactériens, et coexistent avec des GRA dans 17 % des cas (Pal *et al.* 2015). Les plasmides, les transposons et les intégrons portent souvent des gènes conférant une résistance aux biocides (ex : les désinfectants et les antiseptiques) et aux ETM, offrant un avantage évolutif aux bactéries résistantes, même en l'absence de pression antibiotique (Baquero, Alvarez-Ortega et Martinez 2009 ; Acar et Moulin 2012).

La co-sélection de la résistance aux ATB par ces autres éléments repose sur :

- La résistance croisée, qui est un processus dans lequel un micro-organisme résiste à une substance active (ETM ou biocide antimicrobien) et à un (ou plusieurs) autre(s) ATB(s) par un même mécanisme. Les systèmes d'imperméabilité ou d'efflux actif sont les exemples les plus répandus d'un mécanisme unique de résistance permettant de contrecarrer à lui seul l'action de divers agents antibactériens (voir § 3.3) ;
- La co-résistance, qui est un processus dans lequel au moins deux mécanismes de résistance sont codés par des gènes dont les localisations sont proches (sur un même réplicon ou EGM), et dont le transfert et l'expression interviennent de manière coordonnée (gènes liés génétiquement). La co-résistance est régulièrement décrite pour l'association de certaines résistances, comme celle unissant les gènes *bla* de résistance aux pénicillines aux gènes *qac*, *ars*, *cad* ou *mer* codant la résistance aux antiseptiques (chlorhexidine) ou aux ETM (arsenic, cadmium, mercure, etc.).

3.5.1 Résistance bactérienne aux éléments traces métalliques

Les ETM (tels que le cuivre, l'argent, l'arsenic, l'antimoine, le cobalt, le nickel, le cadmium, le zinc ou le mercure) sont utilisés comme antimicrobiens par l'Homme depuis plus de 2 000 ans (Nriagu 1996). Bien que les gènes de résistance aux ETM soient le plus souvent chromosomiques et les GRA majoritairement plasmidiques, des liens existent entre ces résistances (Pal *et al.* 2015). Les gènes de résistance aux ETM sont portés par des structures génétiques très anciennes, de type transposons, fixées dans les génomes microbiens bien avant l'ère des ATB. Ces transposons peuvent devenir des supports et des véhicules de GRA (Liebert, Hall et Summers 1999 ; Pal *et al.* 2015). Les plasmides également peuvent porter à la fois des GRA et des gènes de résistance aux ETM, à l'exemple de l'opéron de résistance au mercure qui est particulièrement associé aux GRA et aux gènes des résistances aux ammoniums quaternaires (*qacEΔ1*). Les espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme sont particulièrement enclines à porter à la fois des gènes de résistance aux ATB, aux biocides et aux ETM (principalement le zinc, le mercure, le cuivre et l'argent). Ainsi, 5 % des plasmides isolés de bactéries d'origine humaine portent des gènes de résistance aux ETM, biocides et ATB contre moins de 0,7 % des plasmides d'origine environnementale (Pal *et al.* 2015).

3.5.2 Résistance bactérienne aux biocides

Selon la définition du Règlement (UE) n° 528/2012[4], dit règlement biocide, un produit biocide est défini comme : « *toute substance ou tout mélange, sous la forme dans laquelle il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant, qui est destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique* ». Ainsi, les biocides se réfèrent à un grand nombre de produits chimiques (désinfectants, antiseptiques, fongicides, algicides, rodenticides, insecticides, produits de protection) et d'agents biologiques (bactériophages et bactéries).

Les biocides antimicrobiens à action antibactérienne sont utilisés pour l'hygiène humaine, vétérinaire, industrielle, ou le traitement de l'eau destinée à la consommation humaine.

Parmi les substances actives biocides, on retrouve principalement des composés d'ammoniums quaternaires (ex : chlorure de benzalkonium, chlorure de didécyldiméthyl ammonium), des dérivés halogénés (ex : hypochlorite de sodium, dioxyde de chlore, iode), des peroxydes (ex : acide peracétique, acide peroctanoïque, peroxyde d'hydrogène), des alcools (ex : éthanol, propan-1-ol), des métaux lourds (ex : argent, zinc), des acides carboxyliques (ex : acide formique, lactique, propionique), des amines (ex : aminopropyldodécylpropane diamine), des guanidines (ex : chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide, chlorexhidine), des dérivés phénols (ex : crésols, triclosan), des isothiazolones (ex : MIT, CMIT), des aldéhydes (ex : glyoxal, glutaraldéhyde), des bases fortes (soude, potasse), des acides forts (ex : acide chlorhydrique).

La résistance aux biocides est médiée par des mécanismes similaires à ceux reportés pour les résistances à large spectre qui s'exercent vis-à-vis des ETM ou des ATB précédemment décrits. L'inactivation du biocide ou la modification de la cible bactérienne sont responsables de la résistance aux biocides. Par ailleurs, une augmentation de l'expression des pompes d'efflux non spécifiques de type AcrAB-TolC chez *E. coli* ou *Salmonella* et MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* permet l'adaptation bactérienne à certains biocides tels que les QAC et entraîne une résistance croisée à des ATB comme les fluoroquinolones (Buffet-Bataillon *et al.* 2016 ; Wesgate, Grasha et Maillard 2016). Enfin, l'activation de systèmes de réponse au stress pour assurer le maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne ou la co-régulation de gènes du métabolisme central sont d'autres

[4] Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

mécanismes explicatifs de l'augmentation de résistance aux ATB après une exposition à des biocides en laboratoire (Gantzhorn, Olsen et Thomsen 2015).

Des études ont montré que l'exposition à certaines substances actives ou produits biocides peut accroître la tolérance des micro-organismes à ce principe actif ainsi qu'à d'autres agents antimicrobiens. Les exemples incluent l'utilisation de la chlorhexidine entraînant une résistance à la colistine (Wand *et al.* 2017). Les travaux de Reichel *et al.* (2014) ont montré une tolérance élevée d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de la carbapénèmase VIM-1 à un désinfectant de surface composé de diméthylol glycol, de glutaraldéhyde et de chlorure de didécyldiméthylammonium. L'étude de Liu *et al.* (2017b) rapportait que des isolats d'*Acinetobacter baumannii* résistants aux carbapénèmes montraient une sensibilité réduite au chlorure de benzalkonium et à la chlorhexidine en comparaison à des souches de référence. Les mêmes résultats ont également été démontrés pour des souches d'*Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine comparées à des souches sensibles (Alotaibi *et al.* 2017). Par ailleurs, Pidot *et al.* (2018) ont mis en évidence un phénomène de tolérance accrue à l'isopropanol d'une souche hospitalière d'*Enterococcus faecium*. Ainsi, sur une période de 18 ans, 139 souches d'*Enterococcus faecium* ont été collectées dans deux grands hôpitaux australiens. Les isolats qui ont été exposés le plus longtemps à la désinfection toléraient mieux l'isopropanol que les isolats du début de l'épidémie (figure 7).

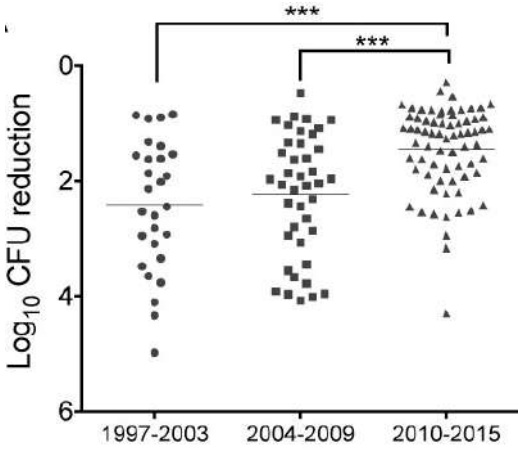


Figure 7. Évolution du phénotype de tolérance à l'isopropanol pour 139 isolats d'*Enterococcus faecium* collectés de 1998 à 2015 dans deux grands hôpitaux australiens (Pidot *et al.* 2018).

Chaque point correspond à un isolat dont la moyenne de la réduction en log d'unités formant colonies (UFC) a été obtenue après exposition pendant 5 minutes à 23 % d'isopropanol (v/v). Les isolats sont regroupés en fonction de la date de prélèvement, montrant une augmentation significative de la tolérance de la population au fil du temps ; *** : les résultats sont hautement significatifs.

3.6 Dynamique de la résistance dans le temps et l'espace

La résistance bactérienne aux ATB résulte de mécanismes biochimiques et d'une combinatoire génétique où les EGM jouent un grand rôle dans la diffusion et le succès d'implantation. Les GRA s'ajoutent (co-résistance), sont parfois stabilisés par intégration dans le chromosome mais ils ont très souvent un coût biologique pour la bactérie, affectant sa compétitivité, son « fitness » en anglais, comparativement à tous les congénères/concurrents dans un environnement donné. L'installation durable d'une résistance est rarement prédictible. Il y a toujours apparition, diffusion et/ou disparition de clones bactériens résistants aux ATB. Ces phénomènes reposent sur la pression de sélection ATB imposée aux bactéries mais également sur l'émergence de nouveaux clones résistants. La distribution des espèces pathogènes résistantes aux ATB en médecines humaine et vétérinaire dépend de la période et de la zone géographique considérée. Ainsi, les clones résistants qui préoccupaient les infectiologues français en 1990 sont différents de ceux de 2019. Également, la situation de la résistance peut différer d'une région française à l'autre. La diffusion de la résistance aux ATB est globalisée, avec des transferts permanents de clones bactériens ou de GRA entre pays.

En 2020, les quatre BRA les plus problématiques en santé humaine sont *E. coli* et *K. pneumoniae* producteurs de BLSE, *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes et *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Cassini *et al.* 2019). Les souches productrices de BLSE ont émergé dans les années 1990 et sont en constante augmentation. Au sein de ces producteurs de BLSE, la nature des enzymes et les clones porteurs ont également évolué. Les SARM restent des pathogènes résistants majeurs, même si leur incidence a été réduite de 2/3 depuis 2003 en France grâce notamment à l'implémentation des mesures d'hygiène et l'utilisation des solutions hydro-alcooliques (Arnaud et Jarlier 2018). Parallèlement, la proportion des souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes augmente depuis 2000 sur le territoire (Slekovec *et al.* 2014). Enfin, chaque clone résistant semble avoir une durée de vie limitée dans la domination qu'il exerce vis-à-vis de ses congénères, et l'épidémiologie clinique globale est souvent le résultat de l'émergence et la diffusion de nouveaux clones venant remplacer d'autres plus anciens (Holden *et al.* 2013). Un bon exemple est le remplacement du clone de SARM ST239 par le clone ST22 en Europe et en Asie (Holden *et al.* 2013).

En conclusion, la résistance aux ATB étant un phénomène dynamique, elle nécessite une surveillance continue. Cette dynamique fait intervenir des clones bactériens qui émergent ou disparaissent, et des GRA dont l'évolution génétique et la diffusion dépendent de la nature et la quantité d'ATB consommés.

4 Mécanismes sous-jacents à l'émergence et à la persistance de l'antibiorésistance dans l'environnement

Le présent chapitre vise à décrire les mécanismes bactériens favorisant l'émergence ou le maintien de la résistance dans l'environnement et, quand les données existent, à identifier les concentrations en ATB induisant directement cette réponse bactérienne.

Les données retenues proviennent majoritairement d'études *in vitro* sur les effets d'un ATB sur une espèce bactérienne. Ces publications sont rares car les conditions expérimentales sont difficiles à paramétrer, et ce d'autant plus pour les expériences menées à l'échelle des communautés bactériennes. Si on peut fortement suspecter une accumulation des effets biologiques sur les bactéries des ATB présents dans l'environnement, il existe très peu de données publiées sur l'effet cumulatif de l'exposition simultanée à plusieurs molécules (effet « cocktail »).

4.1 Résistance à l'échelle cellulaire

4.1.1 Réponses bactériennes à la présence d'antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices

La réponse bactérienne dépend de la concentration en ATB et de l'espèce bactérienne considérée. On considère traditionnellement que la sélection de mutants résistants requiert des concentrations d'ATB égales ou supérieures à la CMI d'un ATB donné, puisqu'une population sensible verra sa croissance inhibée alors que les bactéries ayant acquis un mécanisme de résistance pourront survivre et croître. Néanmoins, il est aujourd'hui avéré que la présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques joue un rôle important dans la sélection et la dissémination de la résistance.

4.1.1.1 Sélection de mutants bactériens résistants préexistants

Le maintien et l'expression des GRA peuvent s'accompagner d'un coût biologique traduit par la réduction de la vitesse de multiplication de la population résistante. Ainsi, en absence de pression de sélection exercée par l'ATB, la croissance de la population résistante peut être défavorisée par rapport à son homologue sensible aux ATB, entraînant à terme la disparition de la population résistante. Cependant, cet effet peut être contrebalancé par (i) la survenue de mutations compensatoires dans la population résistante, lui permettant de retrouver la vitesse de multiplication de la population sensible, et/ou (ii) le fait que des concentrations sub-inhibitrices d'ATB (CMS) peuvent freiner la croissance des populations sensibles et ainsi rétablir l'équilibre de croissance entre les deux populations (Andersson et Hughes 2014).

Par exemple, pour des souches de laboratoire d'*E. coli* et *Salmonella enterica* var. Typhimurium, la CMS de la ciprofloxacine a été mesurée à 0,1 ng.mL^{-1} (soit 1/230^{e} de la CMI), celle de la tétracycline à 0,015 ng.mL^{-1} (soit 1/100^{e} de la CMI), et celle de la streptomycine à 1 000 ng.mL^{-1} (soit 1/4 de la CMI) (Gullberg *et al.* 2011 ; Liu *et al.* 2011a).

4.1.1.2 Sélection *de novo* de mutants bactériens résistants

Les CMS d'ATB sont particulièrement propices à l'accumulation de mutations permettant à la bactérie une résistance progressive à différents ATB (Andersson et Hughes 2014).

Par exemple, la ciprofloxacine, à des concentrations de l'ordre de 2,3 ng.mL^{-1}, peut sélectionner *de novo* des populations résistantes. Les mutations sélectionnées ont un coût biologique faible et confèrent généralement à la bactérie des résistances de bas niveau aux ATB (Gullberg *et al.* 2011). Ce sont souvent des remaniements ou des mutations chromosomiques non spécifiques affectant, par exemple, l'expression de pompes d'efflux.

Il a été montré *in vitro* que certains ATB (céfoxitine, sulfaméthazine) utilisés à des CMS, peuvent favoriser le transfert horizontal des GRA portés par des bactériophages dans les microbiomes des sols agricoles (Ross et Topp 2015). De même, l'exposition au sulfaméthoxazole à 1 000 ng.mL^{-1} (soit 1/16 de la CMI) augmente de manière significative le transfert *in vitro* de GRA d'une communauté bactérienne vers une souche *E. coli* receveuse (Jutkina *et al.* 2018).

4.1.1.3 Modification de la physiologie de la bactérie et phénotypes « hypermutateurs »

De faibles concentrations d'ATB peuvent moduler la production de facteurs de virulence chez l'hôte humain contaminé. Cependant, cette observation ne présente pas d'intérêt dans la compréhension du comportement des bactéries dans l'environnement.

La physiologie des bactéries a été montrée sensible à l'action des ATB. Ainsi, l'azithromycine (macrolide) inhibe la synchronisation des comportements bactériens (*quorum sensing*) chez *P. aeruginosa* à 2 000 ng.mL^{-1} (Nalca *et al.* 2006) et la tobramycine (aminoside) favorise la formation de biofilm chez *E. coli* et *P. aeruginosa* à 300 ng.mL^{-1} (Hoffman *et al.* 2005).

Chez des patients souffrant d'infections chroniques, des mutations dans les gènes bactériens de réparation des mésappariements d'ADN entraînent une augmentation modérée à forte de la fréquence des mutations. Toutefois, ces phénotypes, appelés « hypermutateurs » n'ont pas encore été identifiés dans l'environnement, possiblement en raison du coût biologique important conféré par ces mutations dans des gènes essentiels au développement cellulaire (Montanari *et al.* 2007).

4.1.1.4 Réponse SOS et émergence de mutants résistants

La réponse SOS bactérienne est un mécanisme de régulation induit à la suite de stress causant des dommages à l'ADN, notamment ceux induits par certains ATB. Elle est essentielle à la réparation de ces dommages et à la reprise de la réplication. Elle accélère l'induction, l'acquisition et le transfert de GRA et augmente ainsi la fréquence d'émergence de mutants résistants aux ATB (Baharoglu et Mazel 2014).

L'émergence de la résistance aux ATB peut alors s'exercer *via* plusieurs mécanismes (Da Re et Ploy 2012) :

- Une augmentation de la fréquence de mutations dans certains gènes-clés (imperméabilité, modification de cible, *etc.*) (Dickens *et al.* 2005 ; Baharoglu et Mazel 2011) ;
- L'expression de GRA normalement réprimés (Da Re *et al.* 2009) ;
- L'accélération des remaniements des GRA portés par les intégrons (Guerin *et al.* 2009) ;
- L'augmentation des transferts des transposons conjugatifs pouvant héberger des GRA (Beaber, Hochhut et Waldor 2003).

L'induction de la réponse SOS après contact des bactéries avec les ATB à des CMS, de l'ordre de 5 à 200 ng.mL^{-1} selon l'ATB utilisé, a été particulièrement étudiée. Des études montrent que l'induction, ou le niveau d'induction, de la réponse SOS par les ATB dépend de la bactérie et de l'ATB considérés : les aminosides, la tétracycline et le chloramphénicol induisent la réponse SOS chez *Vibrio cholerae* mais pas chez *E. coli* alors que d'autres molécules comme la ciprofloxacine, l'ampicilline ou le triméthoprime sont inductrices dans les deux espèces (Baharoglu et Mazel 2011 ; Da Re et Ploy 2012).

À ce titre, les effets biologiques des faibles concentrations de ciprofloxacine sur des souches de laboratoire d'*E. coli* et de *Vibrio cholerae* sont illustrés dans la figure 8.

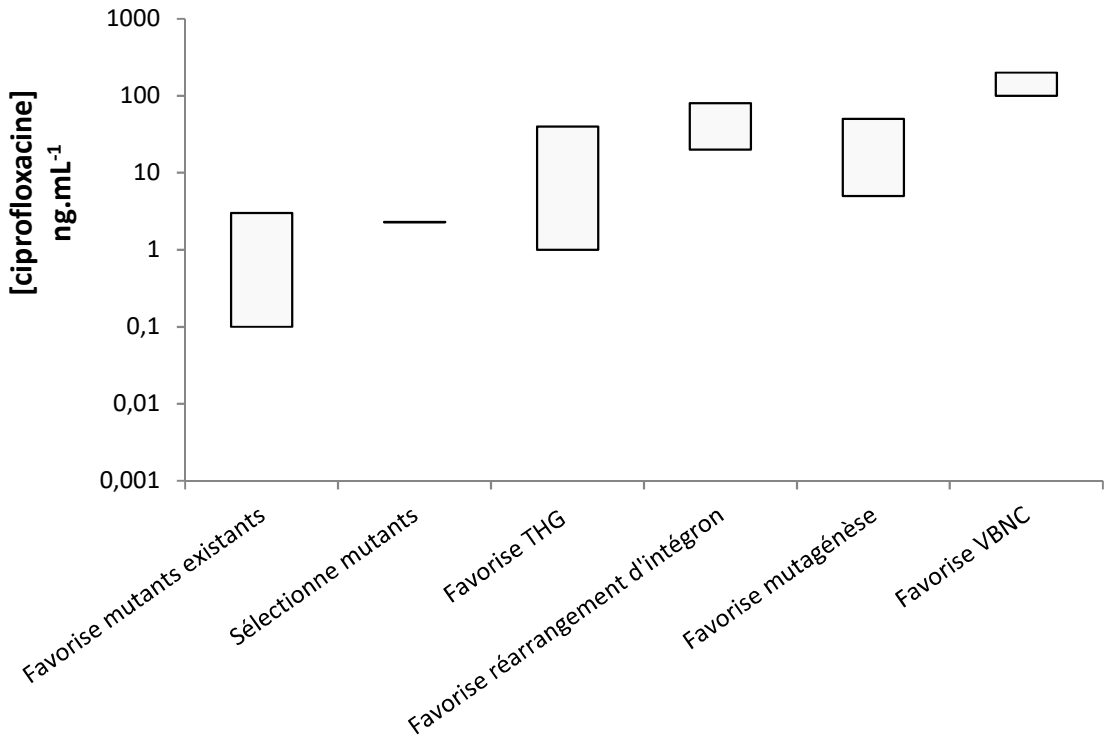


Figure 8. Effets biologiques des faibles concentrations de ciprofloxacine.
Données compilées observées sur des souches de laboratoire d'*E. coli* et de *Vibrio cholerae*, d'après (Beaber, Hochhut et Waldor 2003 ; Lopez *et al.* 2007 ; Dörr, Lewis et Vulić 2009 ; Guerin *et al.* 2009 ; Baharoglu et Mazel 2011). Les termes THG et VBNC sont définis chapitres 3.1 et 3.2, respectivement.

Chez *E. coli* et/ou *V. cholerae*, la réponse SOS est induite et la mutagénèse accélérée par 15 ng.mL^{-1} de tétracycline, 5 ng.mL^{-1} de chloramphénicol, 10 ng.mL^{-1} de rifampicine, 50 à 200 ng.mL^{-1} de spectinomycine ou 10 ng.mL^{-1} de tobramycine ou de néomycine (Baharoglu et Mazel 2011).

4.1.2 Mécanismes de co-sélection

La co-sélection d'un clone bactérien résistant à des ATB de classes différentes (y compris par des mécanismes indépendants et présents sur des éléments génétiques différents) est possible par chacun des ATB auquel le clone est résistant. La co-sélection peut également concerner une structure génétique, qui sera sélectionnée par les molécules (ATB, ETM, biocides) ciblées par les GRA qu'elle porte. Par ailleurs, certains mécanismes de résistance confèrent une résistance croisée à plusieurs classes d'ATB (ex : pompes d'efflux, enzyme bifonctionnelle AAC(6')-Ib-cr). Les bactéries possédant ces mécanismes non spécifiques sont ainsi sélectionnées par toutes les classes ATB affectées.

Au-delà de la sélection de bactéries porteuses de co-résistances ou de résistances croisées, des composés antibactériens (ATB, ETM et biocides) peuvent co-sélectionner des bactéries résistantes aux ATB par co-régulation. Ainsi, l'induction de la pompe CzcCBA par le zinc et le cadmium, *via* le régulateur CzcR, réprime la production de la porine OprD, entraînant une résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* (Perron *et al.* 2004). Chez *Salmonella*, la transcription des pompes d'efflux *acrD* et *mdtABC* est activée par le cuivre et le zinc *via* le régulateur BaeR, induisant la résistance aux deux ETM et aux β-lactamines (Nishino, Nikaido et Yamaguchi 2007). Chez *P. aeruginosa*, la pompe d'efflux MexXY, induite par les macrolides, les tétracyclines, les aminosides et le chloramphénicol, augmente la résistance à tous ces composés mais également aux fluoroquinolones et à certaines céphalosporines (Jeannot *et al.* 2005).

Enfin, d'autres mécanismes de résistance non spécifiques associés à certains états physiologiques bactériens (voir § 3.2) peuvent conférer à la bactérie une résistance à plusieurs classes d'ATB.

4.2 Résistance à l'échelle des communautés bactériennes

Au sein d'une population ou d'une communauté, des cellules individuelles peuvent coopérer pour résister à l'action d'ATB. Elles emploient à cette fin la formation de structures protectrices telles que les biofilms qui limitent physiquement l'exposition aux ATB, la coordination de la réponse d'une population à l'ATB par le *quorum sensing* ou la production d'une enzyme qui désactive l'ATB (Wright 2005 ; Vega et Gore 2014 ; Meredith *et al.* 2015).

Le THG entre bactéries impose de considérer la résistance aux ATB à l'échelle d'une population ou d'une communauté bactérienne plutôt qu'à l'échelle d'une souche (Gogarten et Townsend 2005). D'une part, le *core genome* (ensemble des gènes communs à tous les individus d'une même espèce) peut, chez certaines espèces comme *E. coli*, constituer une faible part du génome total. Ainsi, le génome accessoire de cette espèce, qui comprend tous les gènes permettant aux clones de se développer dans différentes conditions (ex : les GRA) est beaucoup plus important en taille que le *core genome* (McInerney, McNally et O'Connell 2017). D'autre part, une faible concentration d'ATB peut favoriser le transfert de gènes par conjugaison intra-spécifique mais également interspécifique (§ 3.4). Par conséquent si, au sein d'une communauté bactérienne, une seule bactérie d'une population possède un plasmide portant un GRA, l'exposition à l'ATB peut conduire à la diffusion du plasmide au sein de l'espèce bactérienne dont elle est issue ainsi qu'à d'autres espèces proches de la communauté, entraînant la sélection rapide de sous-populations ayant acquis le plasmide d'intérêt par THG. Ainsi, lorsqu'une population bactérienne ajoute à son patrimoine un GRA dont le maintien et l'expression représentent un coût biologique, il est peu probable qu'il soit entièrement éliminé de la communauté même en absence de la pression de sélection ATB (Lopatkin *et al.* 2017 ; San Millan et MacLean 2017).

4.2.1 Survie des bactéries allochtones dans l'environnement

4.2.1.1 Notions générales sur la compétition de niches microbiennes

De nombreuses études montrent que, par des phénomènes adaptatifs, les communautés microbiennes autochtones sont capables de résister à différents stress biotiques et abiotiques. Ainsi, en raison de cette résilience, les communautés microbiennes protègent leurs niches écologiques des invasions microbiologiques. En effet, les nombreux essais d'inoculation microbienne menés en agriculture montrent que l'inoculât microbien disparait assez rapidement après son application en raison de la compétition qu'il rencontre avec les communautés microbiennes indigènes (Ambrosini, de Souza et Passaglia 2016).

L'implantation de populations allochtones telles que des *Rhizobia* au sein des communautés microbiennes indigènes est toutefois documentée sur le long terme dans des expériences où des pressions de sélection favorables (culture de légumineuses) permettent leur implantation et leur persistance (Ambrosini, de Souza et Passaglia 2016). D'autres expériences montrent que, dans ces mêmes conditions, une bactérie exogène donneuse peut transmettre des gènes par THG à des populations receveuses indigènes (Morrissey *et al.* 2002). Le prérequis à ce THG est la rencontre entre la donneuse et la receveuse, ce qui en limite la probabilité dans des environnements oligotrophes complexes. Toutefois, il a été montré que l'apport d'amendements organiques (fumier ou lisier) contaminés par des ATB, des BRA et des bactéries pathogènes pouvait conduire à la persistance plusieurs années dans les sols de GRA (Marti *et al.* 2014) et de pathogènes tels que *Clostridium* spp. (Scott *et al.* 2018) (voir § 7.2.2).

4.2.1.2 Mécanismes généraux, facteurs d'implantation

Les mécanismes qui causent le déclin ou la survie d'une population bactérienne dans l'environnement (sol, eau, sédiment) et leurs transferts entre compartiments d'un écosystème (sol/plante, sol/eau) combinent un ensemble de facteurs abiotiques et biotiques. Ils semblent

indépendants de la source/habitat d'origine de cette population et fortement liés à la physiologie de la bactérie (vie libre ou en biofilm, état stationnaire ou en phase de multiplication) (van Veen, van Overbeek et van Elsas 1997). On peut citer pour les facteurs abiotiques : la nature et la disponibilité des nutriments utilisables par cette population, la température, le pH, la charge particulaire en matière organique pour les milieux aquatiques et l'humidité, la texture et la structure pour les sols. Les interactions biotiques, compétition, prédation, soit entre bactéries soit entre des bactéries et d'autres organismes ou micro-organismes (protistes, virus) participent à la survie ou au déclin d'une population exogène (Habte et Alexander 1975 ; Mallory *et al.* 1983 ; Stubbendieck, Vargas-Bautista et Straight 2016). De nombreuses études visant à comparer la survie dans un milieu stérilisé ou non mettent en évidence un déclin rapide et important de ces populations dans le milieu non stérile.

Dans l'environnement, l'occupation de certaines niches et l'internalisation (*i.e.* dans les cellules végétales ou dans les protozoaires) peuvent cependant assurer la survie à long terme et la dispersion de ces populations. De multiples études ont ainsi été réalisées sur des espèces bactériennes susceptibles d'être utilisées comme inoculum dans un contexte de lutte biologique, de stimulation de la croissance des plantes ou de biodégradation de polluant. D'autres se sont inscrites dans un contexte d'évaluation de la qualité sanitaire d'un milieu (Artz et Killham 2002) en lien avec les activités humaines domestiques, industrielles ou agricoles (Santamaría et Toranzos 2003 ; Nicholson, Groves et Chambers 2005 ; You *et al.* 2006 ; Rogers *et al.* 2011 ; Ongeng *et al.* 2015).

4.2.1.3 Principales données de survie par espèce bactérienne

E. coli, *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* figurent parmi les espèces bactériennes pathogènes fréquemment étudiées pour leur survie dans les milieux aquatiques, dans les végétaux destinés à la consommation humaine et dans les sols agricoles après fertilisation avec des amendements dérivés de déchets animaux ou urbains, ou après irrigation avec des eaux usées traitées (Vivant *et al.* 2015 ; Korajkic *et al.* 2019).

Parmi les travaux récents, ceux menés aux États-Unis par Sharma *et al.* (2019) visent à hiérarchiser l'influence de différents facteurs globaux sur la survie de pathogènes introduits dans les sols *via* une fertilisation organique, afin de proposer des intervalles entre amendement et récolte de produits destinés à la consommation humaine. La plupart de ces résultats sont issus de modèles simples, dans lesquels une seule espèce (ou souche modèle) est artificiellement introduite dans un dispositif. Ils indiquent que les facteurs spatio-temporels (climat, saison, site d'étude) ont plus d'influence sur la durée de survie d'*E. coli* que le type d'amendement, la quantité totale d'*E. coli* présente, la gestion en filière biologique ou conventionnelle du sol, et la profondeur d'enfouissement de l'amendement. La plupart de ces études sont descriptives et mériteraient d'être confirmées par des approches expérimentales plus proches de la réalité.

Récemment, des approches mécanistiques se sont intéressées au protéome ou aux processus de régulation *via* les facteurs sigma (*i.e.* RpoS) pour comprendre le lien entre physiologie et impact des différents stress biotiques et abiotiques dans le devenir de bactéries non « indigènes » des sols. Ainsi, par l'étude de la survie, de la croissance et du protéome de la souche d'*E. coli* O157:H7 dans des solutions de sol, du milieu nutritif supplémenté avec de la matière organique soluble extrait du sol et du milieu nutritif, NandaKafle *et al.* (2018) ont montré que les cellules entrées en phase stationnaire étaient les plus aptes à survivre et à se développer dans des solutions de sol. Des souches d'*E. coli* sélectionnées pour leur aptitude à persister dans les sols sont également plus « résistantes » à la prédation amibienne que des souches d'*E. coli* de laboratoire ou commensales (Somorin *et al.* 2017). Leur aptitude à se développer en biofilm, sous contrôle du facteur RpoS, favoriserait cette résistance. Cependant, ces mêmes auteurs ont constaté que l'incapacité à se développer en biofilm liée à l'absence de *fimbriae* (pili) n'affecte pas la persistance à long terme de ces souches, suggérant que certaines niches peuvent permettre la survie indépendamment de la formation de biofilm (Somorin *et al.* 2018). Ce facteur contrôlerait également la résistance à la dessiccation et au pH acide dans les sols.

L'environnement ne constitue pas un milieu favorable à la croissance des bactéries d'origine intestinale qui, sous l'effet du stress, peuvent être sous une forme VBNC. Les formes VBNC ont été essentiellement mises en évidence dans différents types d'eaux (eaux usées, eaux récréatives) par

des méthodes utilisant des agents fluorescents ou des agents intercalants à l'exemple du propidium monoazide (PMA). La détection des VBNC (distinction par rapport aux bactéries mortes) est rendue possible par l'usage conjoint de l'agent intercalant et d'une qPCR (Lin *et al.* 2016 ; Golpayegani *et al.* 2019). Cette méthodologie de PMA-qPCR permet également d'estimer la présence de VBNC dans des matrices complexes telles que les sols et les produits résiduaires organiques (PRO), comme cela a été montré pour *L. monocytogenes* (Desneux, Chemaly et Pourcher 2015). Des précautions méthodologiques doivent cependant être prises systématiquement, afin notamment d'éviter des interférences dues à la matière organique. Dans les eaux de surface, il a été montré que la fraction cultivable d'*E. coli* ne représentait que 1 à 10 % des *E. coli* viables totaux (Garcia-Armisen et Servais 2004). La restauration de la vitalité de cette fraction VBNC a été démontrée (Pinto *et al.* 2011). Cependant, les formes VBNC des BRA dans l'environnement ont été très peu étudiées (Garcia-Armisen *et al.* 2013).

4.2.1.4 Cas spécifique de la survie des bactéries résistantes aux antibiotiques

Peu d'études se sont intéressées à la survie des BRA dans l'environnement (voir § 7.2). Si l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques préalablement cités sont susceptibles de jouer un rôle sur la survie des BRA, il convient de s'interroger sur les conséquences des propriétés de résistance (présence de GRA et expression du phénotype de résistance) sur la modulation de la physiologie bactérienne et donc de la survie.

Les expériences de sélection de mutants résistants aux ATB ou de mesure de CMS sont très majoritairement faites en incubant une seule espèce bactérienne avec un ATB. Or, l'environnement renferme systématiquement une communauté microbienne complexe constituée de très nombreuses espèces, dont l'effet sur l'émergence de la résistance est inconnu. Récemment, il a été montré que la CMS des aminosides augmentait de plus d'un log en présence d'une communauté bactérienne provenant de fèces de porcs. Les auteurs ont identifié deux mécanismes limitant la sélection de résistance : (i) la perte de compétitivité des mutants résistants face au reste de la communauté, et (ii) l'effet protecteur du phénotype sensible par la communauté (Klümper *et al.* 2019).

4.2.2 Conditions environnementales favorisant l'émergence d'espèces bactériennes pathogènes résistantes

4.2.2.1 L'environnement comme réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques

Le microbiome de l'Homme et des autres mammifères est vaste. Il est le reflet de l'hétérogénéité des flores commensales que l'on commence à appréhender par les études encore récentes de métagénomique (Almeida *et al.* 2019). Toutefois, l'ensemble des autres environnements, qui offrent des conditions de croissance très différentes, hébergent une immense diversité bactérienne. Ainsi, le nombre d'espèces bactériennes totales (*i.e.* espèces génomiques) est évalué de 10^{11} à 10^{12}, à comparer avec la centaine d'espèces d'intérêt médical (Locey et Lennon 2016). Cette richesse taxonomique reflète une diversité de gènes, GRA compris (Nesme *et al.* 2014).

Si l'origine des GRA reste souvent inconnue, il est démontré que beaucoup de ceux ayant une importance en médecine humaine proviennent de bactéries environnementales, qu'elles soient productrices ou non d'ATB commercialisés. Par exemple, les gènes $bla_{CTX\text{-}M}$ sont, à l'origine, des gènes chromosomiques conférant une résistance naturelle à des bactéries environnementales appartenant aux espèces *Kluyvera* spp. (Bonnet 2004 ; Cantón, González-Alba et Galán 2012). Le gène *mecA* provient probablement du groupe *Staphylococcus sciuri* dont les niches écologiques les plus importantes sont le sol, la peau et les muqueuses des animaux sauvages et de rente (Rolo *et al.* 2017). De la même manière, il semble très probable que les gènes de type *mcr-1* et *mcr-2* aient été mobilisés à partir de bactéries apparentant aux espèces *Moraxella* spp. et que les gènes *qnrA et qnrS* l'aient été à partir des bactéries de l'environnement aquatique appartenant respectivement aux genres *Shewanella* et *Vibrio* (Poirel, Cattoir et Nordmann 2012).

Il est donc clair que l'environnement est une source de GRA pour les bactéries pathogènes (Kieffer, Nordmann et Poirel 2017). Par conséquent, quel que soit le nouvel ATB potentiellement identifié

dans les prochaines années, il existe probablement un gène qui permet d'ores et déjà de lui résister, porté par un micro-organisme environnemental. Cette probabilité est d'autant plus forte que l'ATB est naturel puisque tout producteur comporte au moins un mécanisme de résistance vis-à-vis de la molécule qu'il sécrète. La « réserve » des GRA environnementaux est ainsi considérablement plus grande que l'ensemble des GRA responsables des problèmes cliniques actuels.

4.2.2.2 Conditions de transfert d'un gène de résistance aux antibiotiques vers des espèces pathogènes

Les conditions permettant le transfert d'un GRA depuis une espèce bactérienne environnementale vers une espèce pathogène sont multiples (Bengtsson-Palme, Kristiansson et Larsson 2018). Le nombre total de THG dépend non seulement du taux de transfert, mais aussi de la taille des populations des donneurs et des receveurs, qui varie selon le contexte du compartiment de l'écosystème. La grande majorité des THG sont délétères et ne persistent pas. Le taux de THG augmente en réponse à différentes pressions de sélection, y compris l'exposition aux ATB (voir ci-dessus). Le coût biologique (*fitness cost*) et la présence d'un facteur sélectif permettant de contourner ce coût biologique et de mobiliser le GRA sont des prérequis nécessaires. Pour être transférés, les GRA ont également besoin d'être capturés par une plateforme génétique efficace (ex : intégron de classe 1, transposon composite) (Kieffer, Nordmann et Poirel 2017). Les plasmides et les autres EGM ont grandement contribué à la propagation des GRA chez l'Homme et chez les animaux (Johnson et Nolan 2009 ; Carattoli 2013 ; de Been *et al.* 2014). Ce THG, qui fait intervenir des mécanismes de conjugaison, de transduction ou de transformation (voir § 3.4), est plus fréquent entre les espèces apparentées et diminue à mesure que la distance évolutive entre le donneur et le receveur augmente.

Les transferts « réussis » sont probablement rares, eu égard au faible nombre de GRA d'intérêts cliniques par rapport à celui des GRA présents dans le réservoir environnemental. Ces évènements semblent également se produire indépendamment les uns des autres. Ainsi, les gènes de la famille *bla*$_{CTX-M}$, qui dérivent de cinq progéniteurs ont été probablement transférés de manière indépendante à partir d'espèces différentes du même genre bactérien *Kluyvera* (Zhao et Hu 2013). Ils sont tous apparus dans les années 1980 et ont connu un succès épidémique majeur.

4.2.2.3 Dissémination horizontale des gènes de résistance aux antibiotiques après acquisition par une bactérie pathogène

La capacité des GRA à transférer horizontalement est ensuite capitale pour leur maintien et leur dissémination. Par conséquent, une fois le GRA transféré à une bactérie pathogène, sa dissémination doit être assurée au sein des bactéries pathogènes ou commensales, puisqu'une nouvelle mobilisation à partir de bactéries environnementales est très improbable. Cette dissémination du GRA entre bactéries pathogènes ou commensales peut alors se produire dans tous les compartiments au sein desquels ces bactéries sont présentes simultanément. Ils comprennent tous ceux de l'écosystème environnemental, ainsi que les microbiomes des Hommes et des animaux (microbiote digestif notamment). Là encore, les plasmides et autres EGM jouent un rôle déterminant dans la propagation des GRA au sein des bactéries pathogènes et commensales.

4.2.2.4 Évolution d'un gène de résistance aux antibiotiques au sein d'une bactérie résistante aux antibiotiques

Une fois le GRA situé dans un nouveau fond génétique, d'autres adaptations sont nécessaires pour améliorer sa fonctionnalité, par exemple pour répondre aux signaux externes ou augmenter son expression. Ainsi, l'évolution génétique des GRA continue après son transfert depuis l'environnement et la sélection de la BRA. L'adaptation des GRA au sein des bactéries pathogènes est permanente, le plus souvent sous pression ATB. Par exemple, à partir des cinq progéniteurs provenant d'espèces du genre *Kluyvera*, la famille des gènes *bla*$_{CTX-M}$ compte actuellement plus de 170 gènes (Zhao et Hu 2013).

4.3 Synthèse

Les mécanismes impliqués dans l'émergence ou la persistance de l'ABR dans l'environnement sont considérés à l'échelle de la cellule ou de la communauté bactérienne. L'essentiel des données existantes est issu d'études menées *in vitro* en conditions contrôlées, et concerne les effets d'un ATB sur une espèce bactérienne spécifique. Ces études expérimentales sont rares car les conditions expérimentales sont difficiles à paramétrer, et ce d'autant plus pour les expériences menées à l'échelle des communautés bactériennes.

4.3.1 À l'échelle cellulaire

La réponse bactérienne induite par l'exposition à un ATB dépend de la concentration en ATB et de l'espèce bactérienne étudiée. Toutefois, de manière générale, on observe que :

- Le maintien des GRA peut s'accompagner d'un coût biologique ;
- En l'absence de pression de sélection exercée par l'ATB, la croissance de la population résistante est défavorisée, sauf si des mutations compensatoires permettent de contrebalancer le coût biologique des GRA.

L'exposition bactérienne à des concentrations sub-inhibitrices d'ATB peut favoriser l'émergence et la persistance de l'ABR dans l'environnement, puisque ces faibles concentrations :

- Peuvent freiner la croissance des populations sensibles et donc favoriser le maintien des populations résistantes ;
- Sont particulièrement propices à l'accumulation de mutations de faible coût biologique permettant à la bactérie de présenter des résistances de bas niveau à différentes classes d'ATB ;
- Peuvent favoriser le transfert horizontal des GRA au sein de microbiotes environnementaux par des mécanismes de transduction ou de conjugaison ;
- Peuvent modifier la physiologie des espèces bactériennes (*i.e.* formation de biofilms et expression du *quorum sensing*) et indirectement leur résistance aux ATB.

Il existe très peu de données publiées sur l'effet cumulatif de l'exposition simultanée à plusieurs molécules ATB. Cependant, une combinaison des effets biologiques des sélecteurs (ATB ou autres contaminants) présents simultanément dans l'environnement peut être fortement suspectée. En effet,

- La co-sélection d'un clone bactérien résistant à plusieurs classes d'ATB est possible par chacun des ATB auquel le clone est résistant ;
- Les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance aux ETM et aux biocides, dont certains sont similaires à ceux impliqués dans la résistance aux ATB ;
- Les ETM et les biocides peuvent co-sélectionner une résistance aux ATB par résistance croisée ou co-résistance.

4.3.2 À l'échelle de la communauté bactérienne

Au sein d'une population ou d'une communauté, des bactéries peuvent coopérer pour résister à l'action d'ATB, par exemple :

- Par la formation de structures protectrices telles que les biofilms qui permet alors la coordination de la réponse d'une population à l'ATB par le *quorum sensing* ;
- Par la production, par une ou plusieurs bactéries de la communauté, d'une enzyme qui désactive l'ATB permettant alors la croissance des espèces sensibles.

De plus, si, au sein d'une population bactérienne, une seule bactérie possède un plasmide portant un GRA, alors, l'exposition à l'ATB peut conduire à la diffusion du plasmide. Ainsi, lorsqu'une population bactérienne enrichit son patrimoine génétique d'un GRA, il est admis qu'une faible proportion de BRA persiste au sein de cette population, voire de la communauté, et ce même en absence de pression de sélection par les ATB.

Il existe peu de données relatives à la survie des BRA dans l'environnement. Toutefois, il est généralement admis que :

- Les niches écologiques sont très diverses :
  - De par leur composante abiotique qui exerce une pression de sélection sur les communautés microbiennes allochtones ;
  - De par leur composante biotique (communautés autochtones) spécifique d'une niche donnée.
- Ces composantes et leurs interactions constituent une barrière aux invasions biologiques par les bactéries allochtones apportées par les eaux usées traitées ou les PRO. Celles-ci sont généralement éliminées par des mécanismes de prédation, de lyse virale et/ou de compétition pour les ressources.
- La pression de sélection par des ATB ou d'autres antimicrobiens co-sélecteurs de résistance peut favoriser la persistance de BRA allochtones.

Les communautés microbiennes environnementales constituent un réservoir de GRA, dont on ignore la nature et l'importance, qui sont susceptibles d'être transférés à une bactérie pathogène (y compris pathogène opportuniste), *via* un EGM.

- La sélection d'une nouvelle BRA pourrait être favorisée dans un environnement contaminé par un ou plusieurs agents antimicrobiens.
- Les experts estiment que les environnements où se côtoient les bactéries autochtones, les bactéries pathogènes et les agents antimicrobiens sélecteurs, dont les ATB, seraient potentiellement des niches écologiques favorables (« hotspots ») à l'émergence de souches pathogènes pour l'Homme, ayant acquis de nouveaux GRA.
- Le transfert d'un GRA à une bactérie pathogène est un évènement ponctuel rare. Différentes étapes sont ensuite nécessaires à la distribution des GRA au sein des populations humaines et/ou animales, étapes qui ne surviennent probablement qu'à une faible occurrence dans les milieux naturels.

5 Caractéristiques des milieux et des méthodes considérés pour définir l'état de la contamination

La contamination de l'environnement par les ATB, les BRA et les GRA est principalement liée au rejet d'excréments humains ou animaux *via* les eaux usées traitées dans l'eau, et à l'apport de boues de STEU, d'effluents d'élevage et de déjections animales sur les sols agricoles.

La première partie (5.1) de ce chapitre expose :

- Des éléments réglementaires relatifs à la définition des eaux usées, à leur traitement et aux compartiments récepteurs,
- Les types d'eaux usées considérées dans ce rapport, à savoir les eaux usées domestiques, d'établissements de soins et d'abattoirs, ainsi que les types de produits résiduaires organiques (PRO) considérés dans ce rapport, à savoir les effluents d'élevage bruts ou traités, les boues issues de STEU et les digestats de méthaniseurs (5.1.1),
- Les milieux potentiellement contaminés par les BRA et les GRA, qu'ils soient aquatiques ou terrestres (5.1.2).

La seconde partie (5.2) de ce chapitre présente le principe des méthodes de détection et/ou de quantification des ATB, BRA et GRA dans l'environnement. Y sont abordées :

- Les méthodes d'échantillonnage (5.2.1), qui ne font l'objet d'aucune norme,
- La quantification des ATB (5.2.2), effectuée principalement par chromatographie,
- La quantification des BRA et des GRA (5.2.3), comprenant les deux approches dépendante ou indépendante de la culture bactérienne.

5.1 Milieux considérés

5.1.1 Sources de contamination de l'environnement

Les humains et les animaux sains hébergent de nombreuses bactéries qui constituent leurs flores commensales. Parmi elles, la flore digestive est la plus abondante. Sa composition dépend de l'espèce et du segment du tractus digestif. La flore colique comprend 10^{11}-10^{12} bactéries.g^{-1}, dont certaines peuvent être résistantes aux ATB. Les bactéries de la flore intestinale vont être disséminées dans l'environnement *via* les fèces. Lors d'un traitement ATB, ceux-ci peuvent être retrouvés dans le tube digestif. En effet, dans la plupart des cas, les ATB sont excrétés sous forme inchangée ou de métabolites, conjugués ou non, *via* les urines ou les fèces. La proportion d'ATB excrétés sous forme inchangée dépend de l'ATB et de l'espèce considérés. Au contact de la flore digestive, les ATB et/ou leurs métabolites exercent une pression favorisant la sélection et/ou l'émergence de BRA. Les fèces des humains ou animaux traités par ATB contiennent alors plus de BRA.

Ainsi, la principale source d'émission d'ATB, de BRA et de GRA sont les déjections humaines et animales (urines et fèces pour les ATB et fèces pour les BRA et GRA). La figure 9 illustre les principales sources de contamination des milieux aquatiques et terrestres par les ATB, BRA et GRA identifiés par le GT. Les caractéristiques des sources sont détaillées ci-après.

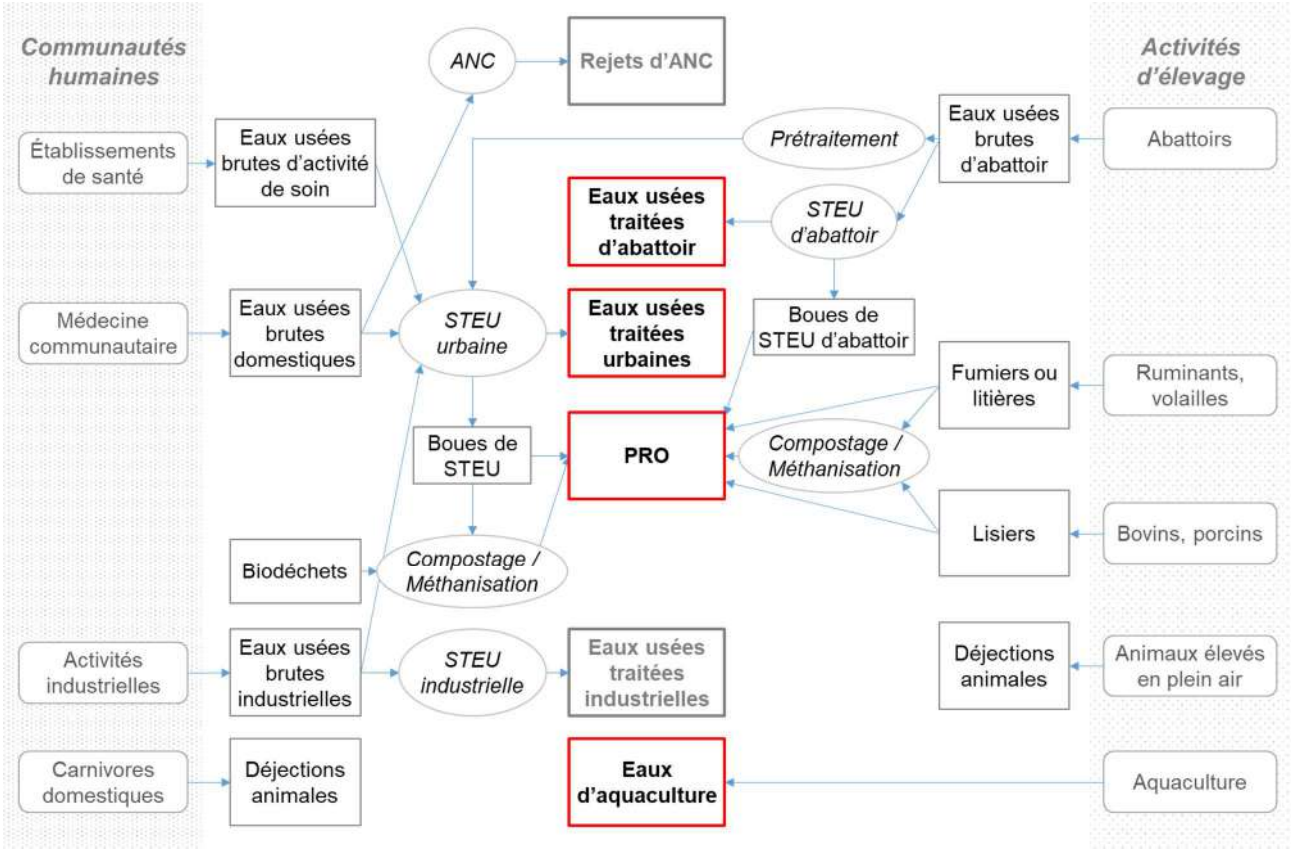


Figure 9. Sources globales d'antibiotiques, de bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés vers les milieux aquatiques et terrestres.

PRO=produit résiduaire organique ; STEU=station de traitement des eaux usées ; ANC=assainissement non collectif

Les sources potentielles de contamination par les ATB, BRA et GRA des milieux aquatique et terrestres, identifiées par le GT, apparaissent en gras dans les cases rectangulaires au centre de la figure. Les cases dont le contour est rouge, indiquent les sources de contamination qui seront étudiées plus en détails dans la suite du rapport. Les cases ovales indiquent des processus de traitement

5.1.1.1 Eaux usées et eaux usées traitées

Les eaux usées sont identifiées comme la principale source de contamination des milieux aquatiques par les ATB, les BRA et les GRA. Leur niveau de contamination dépend du type d'eaux usées et des traitements qui leur sont appliqués. En France, comme dans tous les pays disposant d'un système d'assainissement des eaux usées, les eaux usées brutes sont traitées soit *via* l'assainissement collectif au niveau d'une STEU, soit par assainissement non collectif (ANC, voir § 5.1.1.4.1), avant d'être rejetées dans l'environnement.

5.1.1.1.1 Classification des eaux usées

L'assainissement correspond à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées. Il a pour objectif de protéger la santé et la salubrité publique ainsi que l'environnement contre les risques liés aux rejets des eaux usées, notamment domestiques, et pluviales.

L'arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif[5] définit les eaux usées. Il s'agit des eaux usées domestiques définies comme « *les eaux usées d'un immeuble ou d'un établissement produites essentiellement par le métabolisme humain et les activités ménagères tels que décrits au premier alinéa de l'article R. 214-5 du code de l'environnement* » ou le mélange des eaux usées domestiques avec les autres types suivant :

- Eaux claires parasites : « les eaux claires, présentes en permanence ou par intermittence dans les systèmes de collecte. Ces eaux sont d'origine naturelle (captage de sources, drainage de nappes, fossés, inondations de réseaux ou de postes de refoulement…) ou artificielle (fontaines, drainage de bâtiments, eaux de refroidissement, rejet de pompe à chaleur, de climatisation…) » ;
- Eaux pluviales : « les eaux de ruissellement résultant des précipitations atmosphériques » ;
- Eaux usées assimilées domestiques : « les eaux usées d'un immeuble ou d'un établissement résultant d'utilisations de l'eau assimilables aux utilisations de l'eau à des fins domestiques telles que définies à l'article R. 213-48-1 du code de l'environnement et à l'annexe 1 de l'arrêté du 21 décembre 2007 relatif aux modalités d'établissement des redevances pour pollution de l'eau et pour modernisation des réseaux de collecte, en application de l'article L. 213-10-2 du code de l'environnement » ;
- Eaux usées non domestiques : « les eaux usées d'un immeuble ou d'un établissement n'entrant pas dans les catégories « eaux usées domestiques » ou « eaux usées assimilées domestiques » ».

5.1.1.1.2 Types d'eaux usées brutes d'intérêt dans la présente saisine

La figure 10 illustre les termes utilisés dans le rapport pour désigner les différents types d'eaux usées. Les eaux usées issues des industries pharmaceutiques produisant des ATB, très peu présentes en France, n'ont pas été intégrées à la figure.

[5] Arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg.j^{-1} de DBO5.

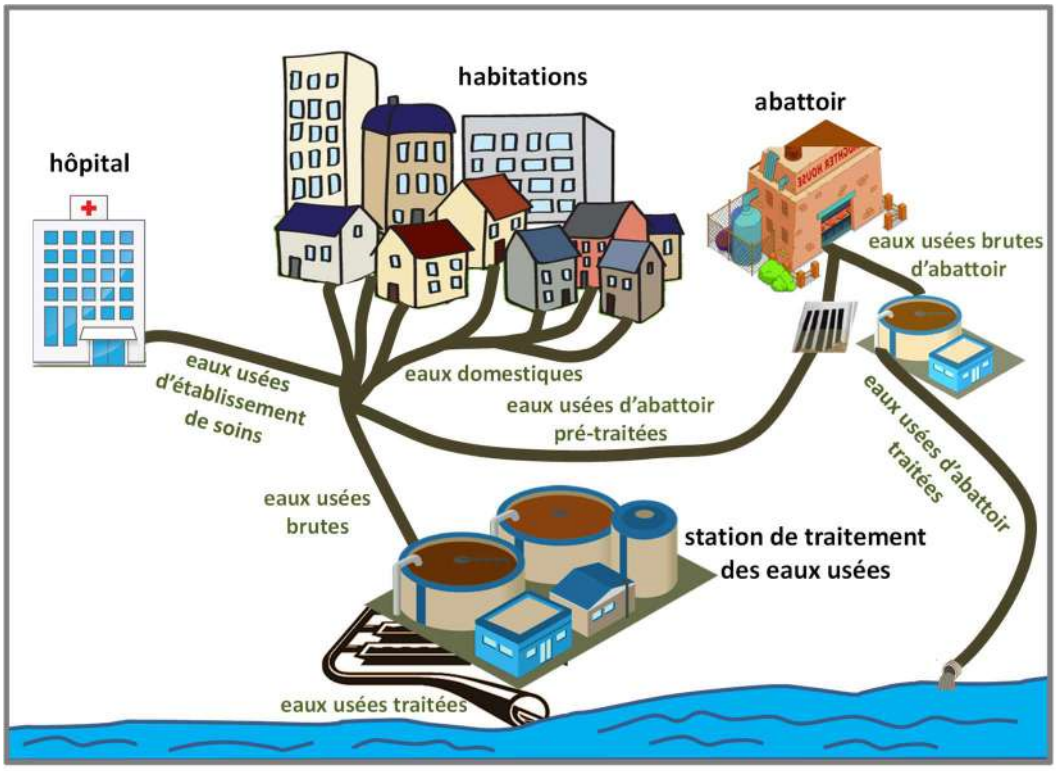


Figure 10. Termes utilisés dans le rapport pour décrire les eaux usées.

5.1.1.1.2.1 Eaux usées domestiques

Ces eaux peuvent être contaminées par des BRA (principalement excrétées par les populations humaines), des ATB (principalement excrétés par les personnes sous antibiothérapie, sous forme de substances actives ou de métabolites), et par d'autres contaminants domestiques potentiellement co-sélecteurs d'ABR (comme des biocides, des ETM, ou d'autres médicaments).

5.1.1.1.2.2 Eaux usées d'activités de soins

Les eaux usées d'activités de soins telles que considérées dans ce rapport correspondent aux eaux usées issues des établissements collectifs de soins, à savoir les eaux usées hospitalières (hôpitaux et cliniques) et les eaux usées d'établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD).

La plus forte proportion de patients traités par ATB, et la plus grande prévalence de BRA dans les hôpitaux en comparaison à la communauté, font des eaux usées hospitalières une source de contamination de l'environnement par des BRA et des ATB ou leurs dérivés.

Dans une moindre mesure, les EHPAD, qui accueillent une population de personnes âgées plus sujettes aux infections que la population générale, produisent des eaux usées potentiellement contaminées par des BRA et des ATB.

En France, les eaux usées d'activités de soins sont majoritairement collectées sans traitement préalable *via* les systèmes de collecte des eaux usées et traitées dans les STEU, généralement urbaines, où elles sont mélangées aux autres eaux usées, dont domestiques.

5.1.1.1.2.3 Eaux usées d'abattoirs

Un abattoir est un établissement utilisé pour la préparation des animaux dont la viande est destinée à la consommation humaine. La préparation est la succession des étapes permettant de transformer l'animal en carcasse. Il existe des abattoirs d'ongulés domestiques, de volailles et de lagomorphes.

En France, les abattoirs sont soumis à la réglementation applicable aux installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) (Arrêté du 30 avril 2004 modifié). Ceux abattant plus de

5 $t.j^{-1}$ sont soumis à autorisation préfectorale. Les exigences réglementaires concernant le traitement et le rejet de leurs eaux usées sont spécifiées dans l'arrêté du 30 avril 2004.

Les eaux usées brutes d'abattoirs comprennent les rejets liquides issus de l'activité d'abattage, voire de découpe de viande si un atelier de découpe est attenant. Au sein de l'abattoir, l'eau est utilisée au cours de la préparation des animaux, pour le nettoyage des locaux de préparation et de stockage des carcasses et pour le nettoyage des locaux de stabulation des animaux. Des mesures sont mises en place afin d'éviter la contamination des eaux usées par du sang et des sous-produits d'origine animale. Ces eaux usées contiennent également les eaux usées domestiques du personnel travaillant dans l'établissement et utilisant sanitaires et lavabos. Ces eaux usées domestiques ne contribuent que de manière minime au volume total d'eaux usées produites.

Les abattoirs français doivent posséder des installations de prétraitement des eaux usées comportant au minimum un dégrillage et le cas échéant, un tamisage, un dessablage et un dégraissage. S'ils ne disposent pas d'installation permettant un traitement plus complet, après prétraitement, les eaux usées doivent être envoyés vers une STEU extérieure. La plupart des abattoirs français ont une capacité d'abattage moyenne et n'ont pas à s'équiper d'une propre STEU. Seuls certains abattoirs de grande capacité d'abattage possèdent leur propre STEU qui leur permet de rejeter leurs eaux usées traitées directement dans les eaux de surface. Le programme de surveillance des eaux usées est défini dans l'arrêté du 30 avril 2004. Il n'inclut ni la surveillance microbiologique, ni la quantification d'ATB.

La flore digestive des animaux abattus représente la source principale de bactéries retrouvées dans les eaux usées d'abattoirs.

Après administration d'ATB, les éleveurs doivent respecter un délai d'attente avant l'abattage afin que les concentrations en ATB dans les viandes destinées à la consommation humaine soient inférieures aux limites maximales de résidus (LMR) (Règlement UE n° 37/2010). Annuellement, les résultats des plans de contrôle, pilotés par le ministère en charge de l'agriculture, révèlent un niveau de non-conformité très faible (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation 2020). Par ailleurs, les animaux malades ne doivent pas être introduits dans un abattoir pour y être préparés en vue de la consommation humaine (Arrêté du 9 juin 2000 relatif à l'abattage des animaux de boucherie accidentés). Ainsi, même s'il n'existe pas de donnée de quantification d'ATB dans ces eaux usées, au vu des informations disponibles, celles-ci constituent une source négligeable de contamination par les ATB par rapport aux autres types d'eaux usées.

5.1.1.1.3 Collecte et traitement des eaux usées

« *L'ensemble des ouvrages constituant le système de collecte et la station de traitement des eaux usées et assurant l'évacuation des eaux usées traitées vers le milieu récepteur* » correspond au système d'assainissement. Il peut s'agir :

- D'un système d'assainissement collectif : « tout système d'assainissement constitué d'un système de collecte sous la compétence d'un service public d'assainissement visé au II de l'article L. 2224-7 du code général des collectivités territoriales et d'une station de traitement des eaux usées d'une agglomération d'assainissement et assurant l'évacuation des eaux usées traitées vers le milieu récepteur » ;
- D'une installation d'assainissement non collectif (ANC) : « toute installation d'assainissement assurant la collecte, le transport, le traitement et l'évacuation des eaux usées domestiques ou assimilées telles que définies aux points 12 et 13 de cet article des immeubles ou parties d'immeubles non raccordés à un réseau public de collecte des eaux usées ».

Les eaux usées sont acheminées *via* un système de collecte correspondant à « *un réseau de canalisations (et ouvrages associés) qui recueille et achemine les eaux usées depuis la partie publique des branchements particuliers, ceux-ci compris, ou depuis les immeubles à assainir dans le cas d'une installation d'assainissement non collectif, jusqu'au point de rejet dans le milieu récepteur ou dans la station de traitement des eaux usées*. » Les réseaux de collecte peuvent être de trois types :

- Unitaire : « réseau de canalisations assurant la collecte et le transport des eaux usées et de tout ou partie des eaux pluviales d'une agglomération d'assainissement » ;
- Séparatif : « réseau de canalisations assurant la collecte et le transport des eaux usées à l'exclusion des eaux pluviales d'une agglomération d'assainissement. Le cas échéant, un second réseau de canalisations distinct et déconnecté du premier peut collecter et transporter des eaux pluviales » ;
- Une combinaison des deux types précédents.

Dans les réseaux unitaires, à la contamination provenant des différents types d'eaux usées s'ajoute, dans une très faible mesure, la contamination provenant des excréments d'animaux domestiques, évacués *via* les eaux pluviales dans les caniveaux.

5.1.1.1.4 Assainissement collectif : stations de traitement des eaux usées urbaines

La STEU est *« une installation assurant le traitement des eaux usées. Elle se compose des ouvrages de traitement des eaux usées et des boues, du déversoir en tête de station et d'éventuels ouvrages de dérivation en cours de traitement* ». La majorité des eaux usées domestiques est traitée par les STEU « urbaines » : « *Les STEU de nature « urbaine » traitent uniquement les effluents domestiques et industriels provenant d'une agglomération d'assainissement « urbaine », c'est à dire les effluents collectés par un réseau public de collecte des eaux usées (id. système de collecte)* » (MEDDE 2013).

L'élimination des matières volumineuses, des graisses, des graviers ou des sables et des matières en suspension (MES) présentes dans les eaux usées nécessite des opérations de prétraitement (traitement primaire). Celles-ci comportent notamment un dégrillage, un dégraissage, souvent associé au dessablage, ainsi qu'une décantation primaire. Dans une deuxième étape (traitement secondaire), les substances dissoutes biodégradables sont transformées par des micro-organismes, essentiellement des bactéries. L'eau traitée est ensuite séparée de la biomasse dans un décanteur secondaire. Les STEU produisent un effluent traité qui est rejeté dans le milieu naturel et des boues constituées de matières organiques et de matières minérales. Les boues subissent différents traitements allant du simple épaississement (pour réduire leur volume) à des traitements plus complexes (pour les stabiliser ou les déshydrater).

Il est important de noter que les STEU ont été conçues et optimisées pour réduire la charge organique et particulaire, et non pour abattre les BRA, les GRA ou les résidus d'ATB, entraînant une efficacité partielle sur ces éléments.

En 2008, 81 % des logements en France étaient raccordés à un réseau d'assainissement collectif (OIEau 2018a). En 2017, 21 702 STEU collectives étaient recensées. Ces STEU recevaient une charge maximale entrante de 79 millions d'équivalents-habitants (EH) pour une capacité épuratoire de 104 millions d'EH par jour (OIEau 2019). En 2015, 98,7 % des STEU étaient conformes pour l'équipement (OIEau 2018b) et 95,1 % pour les performances (OIEau 2018c). La grande majorité (83 %) des STEU traite les eaux usées de moins de 3 500 habitants. Parmi elles, les STEU traitant les eaux usées de moins de 1 000 habitants sont prépondérantes (EauFrance 2019c).

L'arrêté du 21 juillet 2015 modifié fixe les performances minimales de rejet dans l'environnement pour les STEU en fonction de leur capacité et du milieu récepteur. Ces performances sont limitées à des paramètres globaux : MES, DBO_5[6], DCO[7], et l'azote et le phosphore pour les zones sensibles[8]. L'arrêté du 21 juillet 2015 a introduit des prescriptions relatives au suivi des micropolluants selon les « *principes de prévention et de réduction des pollutions à la source,*

[6] Demande biochimique en oxygène pendant cinq jours

[7] Demande chimique en oxygène

[8] Zone où la nécessité de préserver le milieu aquatique et les usages qui s'y attachent justifie la mise en œuvre d'un traitement plus rigoureux des eaux résiduaires urbaines avant leur rejet (DREAL).

notamment en ce qui concerne les micropolluants, y compris dans le cas où le système de collecte est raccordé à un système de traitement soumis à la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement ». Sauf exception, les normes de rejet d'une STEU ne spécifient pas de valeurs pour la qualité microbiologique. En France, les eaux usées traitées subissent un traitement tertiaire (désinfection) essentiellement lorsque la zone de rejet se situe à proximité d'une zone de baignade, d'une zone ostréicole et conchylicole, ou dans le cadre d'un schéma d'aménagement et de gestion des eaux ou de réutilisation des eaux traitées. Les exigences de qualité sanitaire sont alors fixées en termes d'abattements globaux et d'indicateurs fécaux ; les ATB, les BRA et les GRA ne sont pas spécifiés.

L'arrêté du 21 juillet 2015 modifié recommande de privilégier le rejet des eaux usées traitées dans les eaux superficielles ou de les réutiliser conformément à la réglementation en vigueur. Toutefois, « *dans le cas où une impossibilité technique ou des coûts excessifs ou disproportionnés ne permettent pas le rejet des eaux usées traitées dans les eaux superficielles, ou leur réutilisation, ou encore que la pratique présente un intérêt environnemental avéré, ces dernières peuvent être évacuées par infiltration dans le sol, après étude pédologique, hydrogéologique et environnementale, montrant la possibilité et l'acceptabilité de l'infiltration.* »

Depuis 2010, en France, la réutilisation des eaux usées traitées provenant de STEU ou d'installations d'assainissement non collectif de plus de 20 équivalents-habitants est autorisée par arrêté[9] pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. Toutefois, l'action 7 du Pacte pour faire face au changement climatique, issu des Assises de l'eau (2019), vise à « *Tripler le volume d'eaux non conventionnelles utilisées d'ici 2025* » en France et préconise une évolution de la réglementation sur la réutilisation des eaux usées traitées pour autoriser certains usages autres qu'agricoles, aujourd'hui non encadrés. La loi n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire introduit le développement de la réutilisation des eaux usées traitées dans l'article L211-1 du code de l'environnement à compter du 1er janvier 2021. Enfin, le règlement (UE) 2020/741 du Parlement européen et du Conseil du 25 mai 2020 relatif aux exigences minimales applicables à la réutilisation de l'eau, dont le domaine d'application vise uniquement la réutilisation d'EUT pour l'irrigation agricole, dresse des exigences applicables à partir du 26 juin 2023.

Dans sa note d'appui scientifique et technique portant sur le projet de règlement relatif à la réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation agricole adopté par la Commission européenne le 28 mai 2018, l'Anses (2018) a souligné que « *La prise en compte de la problématique liée à l'antibiorésistance qui se pose autant pour l'utilisation d'EUT[10] que pour un rejet dans le milieu hydraulique superficiel, implique la définition d'un ou plusieurs indicateurs pertinents.* ».

5.1.1.1.5 Rejets urbains par temps de pluie dans les réseaux unitaires

L'arrêté du 21 juillet 2015 modifié a introduit le principe de gestion des eaux pluviales le plus en amont possible pour limiter les apports d'eaux pluviales dans le système de collecte des eaux usées. En effet, en période de fortes pluies, le rejet des eaux pluviales dans les systèmes d'assainissement unitaires engendre des surcharges hydrauliques préjudiciables au fonctionnement des systèmes de traitement, et des dilutions des eaux usées dans les STEU qui nuisent aux processus d'épuration. Dans ce cas, les surcharges quantitatives peuvent, en particulier, induire des déversements d'eaux usées brutes dans le milieu naturel (surverses de réseaux unitaires). Par conséquent, en cas de

[9] Arrêté du 2 août 2010 modifié relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts.

[10] Eaux usées traitées

forte pluie, des déversoirs d'orage[11] situés sur le réseau et/ou en tête de station et des ouvrages de dérivation (court-circuit ou « by-pass ») en cours de traitement[12] permettent de détourner une partie du flux d'eaux usées (contenant des eaux pluviales) brutes ou partiellement traitées directement vers le milieu récepteur.

Il n'existe pas de données françaises publiées sur l'impact des déversoirs d'orage sur la contamination des eaux de surface. Aux USA en 2002, le volume d'eaux usées déversées directement dans les eaux de surface est estimé à 8 % du volume d'eaux traitées totales, soit 20 % du volume d'eaux usées pris en charge par des réseaux unitaires (US EPA 2004). Dans un bassin versant japonais, 23 % du volume total des eaux usées de réseau unitaire ont été rejetées sans traitement (Honda *et al.* 2020). Dans une ville japonaise de 30 000 habitants située dans une région pluvieuse, Honda *et al.* (2020) estiment qu'en raison de la forte concentration en BRA des eaux usées brutes, le rejet annuel total d'*E. coli* résistants aux ATB par le déversoir d'orage était supérieur de 3,7 log à l'effluent de la STEU. De plus, les dérivations à petit débit (dont le débit horaire était inférieur à cinq fois le débit moyen par temps sec) représentaient 43 % du volume total des dérivations totales, mais 79 % du débit total des *E. coli* résistants aux ATB. Les auteurs recommandent ainsi la réduction des dérivations à faible débit pour réduire efficacement les rejets de BRA par les déversoirs d'orage (Honda *et al.* 2020).

En France, dans les centres-villes où les réseaux unitaires sont les plus répandus, il ne semblerait pas raisonnable d'envisager la transformation en réseau séparatif pour des raisons d'analyse coûts-avantages. En revanche, les réseaux séparatifs sont privilégiés dans les nouvelles urbanisations (Miquel 2003).

Selon les prévisions du Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC), le réchauffement climatique devrait conduire à l'augmentation de la fréquence d'évènements pluvieux extrêmes et à un allongement des périodes de sécheresse en Europe (EASAC 2018). Les projections montrent une augmentation (jusqu'à 35 %) des épisodes journaliers de fortes précipitations dans la plupart des régions européennes en hiver au XXI^{e} siècle, avec ainsi un risque potentiel accru de contamination par les bactéries, BRA incluses (Olds *et al.* 2018). Les sécheresses estivales causent des étiages importants des cours d'eau posant des problèmes significatifs liés à la faible dilution des eaux usées traitées dans les cours d'eau asséchés.

5.1.1.2 Produits résiduaires organiques (PRO)

La fertilisation des sols par des PRO recycle efficacement les déchets organiques biogènes issus de sources urbaines, agricoles et agro-industrielles (*i.e.* résidus de cultures, effluents d'animaux, résidus agro-industriels, fraction organique des déchets solides municipaux et boues d'épuration). Ces déchets contiennent des éléments nutritifs pouvant se substituer aux engrais minéraux, ainsi que des matières organiques dont l'application sur les sols contribue à augmenter leur teneur en matière organique et donc leur fertilité. Ils peuvent être appliqués soit à l'état brut, soit après une transformation permettant entre autres leur stabilisation, leur réduction de volume (augmentant ainsi la concentration en éléments nutritifs) et leur hygiénisation. Tous ces déchets présentent des caractéristiques différentes, en termes de teneur en matière organique, de nutriments et de contaminants tant chimiques (ETM, ATB, biocides, produits pharmaceutiques) que biologiques (pathogènes, BRA et GRA).

Le terme PRO regroupe différentes matières, notamment :

---

[11] « *Tout ouvrage équipant un système de collecte en tout ou partie unitaire et permettant, en cas de fortes pluies, le rejet direct vers le milieu récepteur d'une partie des eaux usées circulant dans le système de collecte* » (Arrêté du 21 juillet 2015 modifié).

[12] « *Tout ouvrage, au sein de la station de traitement des eaux usées, permettant de dériver vers le milieu récepteur des eaux usées qui n'ont suivi qu'une partie de la filière de traitement* » (Arrêté du 21 juillet 2015 modifié).

- Les effluents d'élevage bruts ou traités (fumiers, lisiers),
- Les boues issues du traitement des eaux usées urbaines,
- Les matières, eaux et boues d'épuration issues des industries agro-alimentaires, papetières,
- Les boues issues des opérations de potabilisation de l'eau,
- Les composts de déchets verts, de déchets ménagers, de déchets organiques issus des activités industrielles ou domestiques (biodéchets),
- Les digestats de méthanisation, compostés ou non.

Dans le cadre de la saisine, seuls les PRO susceptibles de contenir des BRA et des ATB sont détaillés. Ils comprennent essentiellement les boues de STEU, les lisiers et les fumiers ayant ou non subi un traitement biologique.

Dans la plupart des cas, si les PRO ne subissent pas de transformation, ils conservent un statut de déchets (Ademe 2016).

5.1.1.2.1 Boues de stations de traitement des eaux usées

Avant d'être épandues, les boues peuvent subir un ou plusieurs traitements (Ademe 2016) :

- Boues liquides produites par les petites STEU (< 2 000 EH) : épaississement ou stockage en silo,
- Boues pâteuses produites par les STEU de taille moyenne (6 500 - 20 000 EH) : déshydratation sur filtre à bande ou centrifugation,
- Boues chaulées (pâteuses ou solides) produites par des STEU de taille moyenne à grande (20 000 - 100 000 EH) : issues d'un chaulage après une déshydratation,
- Boues compostées issues d'un compostage de boues déshydratées,
- Boues de lagunage : correspondent à des boues liquides traitées de façon extensive par des macrophytes.
- Boues solides produites surtout par des grandes STEU : traitement par filtre-presse ou séchage thermique.

5.1.1.2.2 Lisiers et fumiers

Les filières de traitement des effluents d'élevage ont été mises en place afin de respecter les valeurs limites en azote fixées par la réglementation européenne, de limiter l'apport de phosphore dans l'environnement, de stabiliser l'effluent ou de produire de l'énergie.

Elles se répartissent en trois types : le procédé biologique, le compostage et la méthanisation.

- **Procédés biologiques (effluents liquides)**

Le lisier peut subir une séparation de phase (en général par centrifugation) qui produit une fraction liquide ainsi qu'un refus solide riche en phosphore destiné à l'exportation. Le lisier brut ou la fraction liquide du lisier (s'il subit une séparation) est envoyé dans un bassin alternant des phases aérobies et anoxiques afin d'éliminer l'azote sous forme de gaz (N_2). Le produit ainsi traité est ensuite stocké en fosse avant épandage ou séparé à nouveau en deux fractions par décantation ou filtration. La fraction épaissie, stockée en fosse, est destinée à l'épandage. La fraction liquide, stockée dans une lagune, est utilisée pour l'irrigation des cultures.

- **Compostage (effluents solides)**

Le compostage, réalisé sur les fumiers ou sur la fraction solide des lisiers, permet de stabiliser la matière organique, de réduire les odeurs et de diminuer les concentrations en micro-organismes pathogènes. Il conduit à la formation d'un produit solide stabilisé, riche en composés humiques et hygiénisé par la montée en température.

- **Méthanisation (effluents liquides ou solides)**

La méthanisation est un procédé de digestion anaérobie mésophile (35-40°C) ou thermophile (53-56°C) qui transforme la matière organique en biogaz (CH_4, 55 à 60 % et CO_2, 40 à 45 %) et en un sous-produit de dégradation, appelé digestat, valorisable en agriculture pour ses propriétés amendantes et fertilisantes. Les méthaniseurs agricoles sont alimentés avec des effluents d'élevage et des co-substrats d'origine végétale (tonte de gazon, de bordures de routes, résidus de cultures, déchets d'industries agro-alimentaire, *etc.*).

En France, la majorité des installations de méthanisation alimentées par des effluents d'élevages porcins et bovins fonctionnent en mésophilie, ne possèdent pas d'étape de prétraitement thermique et produisent des digestats qui conservent en général un statut de déchet dans la mesure où ils sont rarement transformés.

5.1.1.2.3 Épandage

« *L'épandage est l'action d'épandre au champ des matières présentant un intérêt agronomique. La filière « épandage » concerne avant tout l'épandage direct de déchets organiques non transformés. Il existe des contraintes d'ordre réglementaire, l'épandage ne pouvant avoir lieu en toute saison et en tout lieu, ce qui nécessite un stockage en amont de l'épandage*. » (ADEME 2016).

L'épandage direct est la principale voie de retour au sol des PRO. Il concerne la majorité des effluents d'élevage et une partie des boues de STEU ainsi qu'une partie des digestats et composts. Afin de garantir ces principes, des règles précises encadrent les plans d'épandage agricole des déchets. La réglementation des épandages dépend du statut juridique du PRO, selon qu'il est considéré comme un déchet ou un produit. Elle dépend aussi du régime juridique applicable à l'installation qui le produit (Gaillot et Lavarde 2015).

La réglementation des boues résulte de la 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, de la loi sur l'eau, du décret n°97-1133 du 8 décembre 1997 et de l'arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles.

L'épandage des lisiers et des fumiers est soumis à deux réglementations qui dépendent de la taille de l'élevage : le règlement sanitaire départemental (RSD) et la réglementation sur les installations classées (IC). Le plan d'épandage est un document qui définit à l'échelle de l'exploitation les surfaces aptes à recevoir des épandages et vérifie qu'elles sont suffisantes au regard du cheptel présent. Il est obligatoire pour les installations classées et reste facultatif pour les autres élevages.

Les digestats peuvent obtenir le statut de « produit » lorsqu'ils sont transformés en matières fertilisantes. Ils entrent alors dans le cadre de la réglementation de la mise sur le marché des Matières Fertilisantes et Supports de Culture, ou lorsqu'ils sont compostés, dans le cadre des normes NF U44-051 ou NF U44-095 qui imposent des valeurs limites en bactéries indicatrices de traitement et en micro-organismes pathogènes. Le ministère de l'agriculture a publié en 2017, puis en 2019 des arrêtés approuvant les cahiers des charges de mise sur le marché des digestats de méthanisation agricole en tant que matière fertilisante. Les cahiers des charges fixent notamment des seuils d'innocuité pour les bactéries d'origine entérique pathogènes ou non (*E. coli* ou entérocoques, et *Salmonella*). Les digestats issus des sites répondant aux critères définis dans ce cahier des charges n'ont plus besoin de répondre à une norme ou d'avoir une autorisation de mise sur le marché (homologation) pour sortir du statut de déchet.

Selon le type de PRO, plusieurs réglementations imposent des distances d'épandage à respecter vis-à-vis des points d'eau (tableau V).

Tableau V. Distance d'épandage en fonction du type de produits résiduaires organiques (SATEGE Nord-Pas de Calais 2019).

<table>
<tr><th></th><th>Effluents d'élevage ICPE</th><th>Effluents d'élevage soumis au RSD et produits normalisés</th><th>Boues urbaines, effluents industriels soumis à plan d'épandage, digestats de méthanisation d'unité soumise à enregistrement (traitant des boues urbaines) ou d'unité soumise à autorisation</th><th>Digestats de méthanisation d'unité soumise à déclaration ou enregistrement (ne traitant pas de boues urbaines)</th></tr>
<tr><td>Captages d'eau potable, puits, forages</td><td>50 m
Captage d'eau potable
35 m
Autres points de prélèvement d'eau</td><td>35 m</td><td>35 m
100 m si pente > 7 %</td><td>50 m</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Cours d'eau et plans d'eau</td><td rowspan="2">35 m
50 m si le cours d'eau alimente une pisciculture, sur un linéaire de 1 km en amont
10 m si bande enherbée ou boisée permanente de 10 m</td><td>35 m
200 m pour lisier RSD si pente > 7 %</td><td>35 m
200 m si pente > 7 % et effluents liquides, pâteux ou effluents non stabilisés
100 m si pente > 7 % et effluents solides et stabilisés
5 m si pente < 7 % et effluents stabilisés et enfouis immédiatement</td><td rowspan="2">35 m
10 m si bande enherbée ou boisée permanente de 10 m
Pente > 7 % : interdit pour les digestats liquides en enregistrement sauf s'il est mis en place des dispositifs prévenant tout risque de ruissellement vers les cours d'eau</td></tr>
<tr><td colspan="2">En zones vulnérables, l'épandage est interdit à moins de 35 m. Cette distance peut être ramenée à 10 m si bande enherbée ou boisée permanente de 10 m</td></tr>
<tr><td>Lieux de baignade</td><td>200 m
50 m si composts</td><td>200 m</td><td>200 m (effluents industriels et digestats)</td><td>200 m</td></tr>
<tr><td>Zones piscicoles et conchylicoles</td><td>500 m en amont (uniquement pour zones conchylicoles)</td><td>200 m</td><td>500 m</td><td>500 m en amont</td></tr>
</table>

Les distances minimales d'épandage à respecter varient selon l'origine du PRO (urbaine, industrielle, agricole), son statut (déchet ou produit), sa nature (liquide ou solide), le traitement appliqué (stabilisation, hygiénisation, *etc.*), le régime de l'installation (RSD, déclaration, autorisation), les pratiques d'épandage (enfouissement ou non), la localisation (zone vulnérable ou non) (Gaillot et Lavarde 2015).

Il existe également des textes réglementaires sur les doses d'apport des PRO. Ainsi, pour les PRO ayant un statut déchets ICPE, l'article 39 de l'arrêté du 2 février 1998 précise que la dose d'apport des effluents ou déchets dépend "*des besoins des cultures en éléments fertilisants, des teneurs en éléments fertilisants dans le sol et dans le déchet ou l'effluent et dans les autres apports, des teneurs en éléments ou substances indésirables des déchets ou effluents à épandre, de l'état hydrique du sol, de la fréquence des apports sur une même année ou à l'échelle d'une succession de cultures sur plusieurs années.*" De plus, les apports globaux d'azote ne doivent pas dépasser 350 kg/ha/an sur les prairies et 200 kg/ha/an sur les cultures autres que légumineuses

Le producteur de boues doit établir un programme prévisionnel annuel d'épandage comprenant notamment une caractérisation de leur valeur agronomique ainsi que les doses d'épandage par unité culturale. Pour les effluents d'élevage, toute exploitation agricole en zone vulnérable doit réaliser un plan de fumure prévisionnelle. Pour toute exploitation, l'apport de PRO doit tenir compte de la dose maximale d'azote (170 kg N organique/ha de la surface agricole utile). Le calcul prend en compte l'azote produit par les déjections animales, les exports et les imports d'azote sur la surface agricole utile.

En général, l'épandage est interdit lorsque le sol est gelé ou fortement enneigé et pendant les périodes de forte pluviosité ou de risque d'inondation. Les périodes diffèrent selon le type de fertilisant (fumiers, lisier, fertilisant minéral) et la nature de la culture.

Les déchets solides ou pâteux non stabilisés doivent être enfouis le plus tôt possible, dans un délai maximum de 48 heures. Les effluents d'élevage d'ICPE épandus sur terres nues doivent être enfouis dans les 24 heures pour les fumiers de bovins et porcins non susceptibles d'écoulement (après un stockage d'au minimum deux mois) et dans les 12 heures pour les autres effluents d'élevage ou les sous-produits issus de leur traitement. L'épandage sur des terres labourables de fumiers issus d'élevages non ICPE doit être suivi d'un labour intervenant le plus tôt possible (Gaillot et Lavarde 2015).

5.1.1.3 Eaux en sortie de pisciculture d'eau douce

Les poissons d'ornement ne sont pas considérés dans ce travail.

L'aquaculture regroupe à la fois des entreprises de pisciculture (en France : 360 en eau douce et 35 marine) et de conchyliculture (2 400 entreprises en France). En 2016, l'aquaculture française a produit 233 000 tonnes, dont principalement 119 000 tonnes d'huîtres, 55 000 tonnes de moules, et 28 000 tonnes de salmonidés (FranceAgrimer 2020).

L'aquaculture est une filière d'élevage qui présente la particularité d'être directement connectée à l'environnement aquatique (rivières, étangs ou eaux littorales), avec un temps de résidence des eaux dans les bassins d'environ deux heures. Ainsi, les traitements ATB appliqués ainsi que les BRA et GRA présents dans les bassins peuvent être disséminés rapidement vers le milieu aquatique adjacent.

Les ATB n'étant quasiment pas utilisés en conchyliculture, le GT a ciblé spécifiquement la pisciculture d'eau douce. En France, la filière piscicole peut utiliser cinq ATB disposant d'une autorisation de mise sur le marché (oxytétracycline, florfénicol, association triméthoprime-sulfamide, fluméquine et acide oxolinique). La consommation d'ATB de la filière aquacole représente 0,2 % de la consommation nationale de l'ensemble des filières d'élevages (Anses 2019). En pratique, les pisciculture d'eau douce sont généralement alimentées par une rivière ou moins fréquemment par une source (Le Bouquin *et al.* 2018).

La filière aquacole n'est pas incluse dans les plans de surveillance européens de l'ABR ciblant les denrées alimentaires (Décision 2013/652/EU). De plus, parmi les critères de qualité des eaux de pisciculture, aucun paramètre ne cible les ATB, BRA ou GRA.

5.1.1.4 Sources potentielles de contamination non étudiées dans le rapport par manque de données

Les sources de contamination pour lesquelles aucune donnée de contamination par les BRA, les GRA ou ATB n'a été recensée en France, sont uniquement mentionnées dans ce chapitre mais ne sont pas développées dans le reste du rapport.

5.1.1.4.1 Assainissement non collectif (ANC)

Les habitations raccordées à une installation d'ANC représentent 15 à 20 % de la population française (Ministère de la transition écologique et solidaire et Ministère des solidarités et de la santé 2019). On considère qu'en France, quatre à cinq millions de logements ne sont pas raccordés au réseau public de collecte des eaux usées, soit environ 8 à 10 millions de personnes, principalement dans les zones rurales.

Deux arrêtés, respectivement du 7 mars 2012[13] et du 27 avril 2012[14], entrés en vigueur le 1er juillet 2012, révisent la réglementation applicable aux installations d'ANC :

- Des contrôles de conception et d'exécution sont effectués par les Services publics d'assainissement non collectif (SPANC),
- Les SPANC gèrent également la conformité des installations existantes, pour lesquelles le contrôle périodique de bon fonctionnement, d'entretien et d'évaluation des risques avérés de pollution de l'environnement et des dangers pour la santé des personnes permettent d'identifier les non-conformités éventuelles.

Les installations sont régies par l'arrêté du 21 juillet 2015 modifié relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'ANC. Si une surveillance chimique est préconisée, les concentrations des ATB et des BRA ne sont pas contrôlées dans les eaux usées. Les causes de contamination potentielle de l'environnement sont les défaillances du système de traitement, le faible traitement des ATB et des BRA dans ces systèmes, et donc leur infiltration par les sols dans les eaux souterraines.

5.1.1.4.2 Eaux usées d'industries productrices d'antibiotiques

L'immense majorité des ATB consommés en France sont produits à l'étranger et importés. Par conséquent, la France est peu concernée par la problématique des eaux usées industrielles de site de production d'ATB. L'industrie pharmaceutique reste cependant un secteur de marché stratégique en France avec 92 sites déclarés « producteurs de principes actifs » et 128 sites « producteurs de médicaments » dont quatre ont les deux activités. Treize sites produisent des principes actifs pour leur compte propre (Sanofi, Novartis, Merck, LFB, Pierre Fabre) (données de 2014) (Pipame 2017). Cependant, seules quatre usines fabriquent des ingrédients primaires (pour les substances ATB) en France, et les sites identifiés comme « producteurs » français sont donc plutôt des « formulateurs » ou « importateurs de produits finis » (Changing Markets 2017).

Si les autorisations de déversement ou de rejet prescrivent généralement des valeurs seuils pour les établissements produisant des ATB (indiquées généralement en flux d'ATB mesuré en $kg.j^{-1}$), la résistance aux ATB ne rentre pas actuellement en ligne de compte dans ces autorisations. Cependant, depuis quelques années, et certainement suite aux différents rapports d'alerte et prise de conscience, les industriels producteurs ont mis en place des plans de gestion des déchets et rejets dans l'eau, l'air et de leurs impacts. À titre d'exemple, treize acteurs principaux du monde pharmaceutique ont co-signé une feuille de route (Roadmap AMR 2020) « *visant à co-construire des guides et des méthodologies de référence pour une gestion durable des ATB au sein du secteur pharmaceutique* ». La maîtrise des rejets et la surveillance de l'ABR potentiellement liée aux activités de production font l'objet, pour les signataires, d'un Plan de vigilance spécifique qui intègre des programmes d'évaluation des impacts environnementaux et sanitaires et le suivi de la conformité des rejets au regard des Autorisations et des Conventions applicables (Sanofi 2019).

5.1.1.4.3 Anciens sites d'enfouissement des déchets

Il n'existe pas de données disponibles sur la contribution de ces sites sur la contamination environnementale par les ATB, GRA et BRA.

---

[13] Arrêté du 7 septembre 2009 fixant les prescriptions techniques applicables aux installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO5

[14] Arrêté du 27 avril 2012 relatif aux modalités de l'exécution de la mission de contrôle des installations d'assainissement non collectif

5.1.1.4.4 Biodéchets issus des composteurs de proximité

Les biodéchets sont définis par l'article R. 541-8 du code de l'environnement comme « *Tout déchet non dangereux biodégradable de jardin ou de parc, tout déchet non dangereux alimentaire ou de cuisine, issu notamment des ménages, des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que tout déchet comparable provenant des établissements de production ou de transformation de denrées alimentaires.* » Cette définition exclut les déchets fermentescibles tels que les boues de STEU, les déchets de bacs à graisse, de la transformation du bois, d'animaleries ou d'abattoirs. Elle exclut également les déchets de la production primaire, tels que les déchets de l'agriculture, de la sylviculture ou de la pêche.

Les biodéchets peuvent contenir des denrées alimentaires d'origine animale (comme le lait, les œufs, la viande ou le poisson), à l'exemple des déchets de cuisine et de table. Ils sont alors considérés comme des sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine de classe 3 selon le règlement européen (CE) n°1069/2009 et doivent répondre à des règles strictes d'hygiène pour leur collecte, leur stockage, leur valorisation et leur traçabilité. Depuis 2012, les établissements générant une quantité importante de biodéchets sont considérés comme « gros producteurs ». À ce titre, leurs biodéchets doivent être triés à la source pour être orientés vers une filière de valorisation (habituellement, compostage ou méthanisation), dont les sous-produits ne sont utilisables que par les producteurs de déchets ou par un tiers pour un usage local.

Depuis avril 2018, un arrêté clarifie la réglementation des « composteurs de proximité » recevant jusqu'à 1 tonne par semaine de biodéchets, lesquels sont alors exemptés d'agrément sanitaire au titre du règlement européen relatif aux sous-produits animaux. L'arrêté d'avril 2018 définit deux catégories de « compostage de proximité » concerné par l'exemption précédente : (i) le compostage « partagé », regroupant des particuliers, des associations, des restaurateurs et/ou des collectivités et (ii) le compostage « autonome en établissement », au sein d'un établissement producteur de déchets de cuisine et de table. Aucune valeur seuil en bactéries n'est imposée mais l'exploitant ou une personne désignée par lui doit relever régulièrement la température du tas en cours de compostage et assurer le bon fonctionnement du procédé.

La réglementation ne cesse d'évoluer vers une valorisation de l'ensemble des biodéchets. Ainsi, chaque citoyen disposera en 2025 d'une solution lui permettant de ne plus jeter ses biodéchets dans les ordures ménagères résiduelles. Cependant, les risques sanitaires associés aux biodéchets sont très peu étudiés. Lorsqu'ils existent, les travaux n'abordent que la survie des bactéries dont la recherche est stipulée par les textes réglementaires ou les normes sur les matières fertilisantes à l'exemple d'*E. coli*, des entérocoques et de *Salmonella*. Les analyses effectuées sur des composts de biodéchets ont mis en évidence des concentrations en *E. coli* de l'ordre de 10^2 à 10^5 en nombre le plus probable (NPP) ou en unités formant colonie par gramme ($UFC.g^{-1}$) (Harrison 2004 ; Adhikari, Trémier et Barrington 2012 ; Adhikari *et al.* 2012a, 2012b ; Storino *et al.* 2016). En raison de la teneur élevée en *E. coli* suggérant une contamination fécale des biodéchets, la présence de BRA et de GRA n'est pas à exclure. Toutefois, il n'existe pas de données solides sur la présence de BRA dans des biodéchets.

5.1.2 Compartiments récepteurs de l'environnement

5.1.2.1 Milieux aquatiques

Certaines sources de contamination sont introduites dans les milieux aquatiques par rejets directs dans les eaux de surface (dont eaux usées traitées, eaux de déversoir d'orage et rejets d'aquaculture) ou par infiltration dans les sols (dont eaux usées traitées, eaux pluviales, rejets d'ANC). De plus, les milieux aquatiques sont susceptibles d'être contaminés par entraînement des ATB, BRA et GRA depuis des sols contaminés (dont sols amendés, pâturages, stockage de déchets) lors du ruissellement et/ou de l'infiltration d'eau. Des zones spécifiques peuvent être contaminées par des rejets d'industries pharmaceutiques ou de zones piscicoles.

5.1.2.1.1 Eaux de surface continentales

Les eaux de surface comprennent les cours d'eau (rivières, canaux) et les plans d'eau (lacs, retenues de barrage, étangs).

L'ensemble des rivières françaises représente une longueur totale de 620 000 km dont 430 000 km en France métropolitaine (EauFrance 2019b). La classification de Strahler permet d'ordonner les tronçons des cours d'eau en fonction de la structure et la densité du réseau hydrographique (Strahler 1952). Un niveau d'ordre est attribué à chaque tronçon, suivant les règles suivantes :

- Les affluents en tête de bassin (de la source à la première confluence) sont d'ordre 1 ;
- Si deux cours d'eau du même ordre fusionnent, le cours d'eau résultant reçoit un ordre supérieur de 1 ;
- Si deux rivières avec des ordres différents fusionnent, le cours d'eau résultant reçoit le plus élevé des deux ordres.

Les estuaires ont donc les ordres les plus élevés.

Les plans d'eau sont des étendues d'eau douce plus ou moins profondes, naturelles ou artificielles. Le renouvellement de l'eau dans les écosystèmes lacustres est très lent en comparaison aux milieux aquatiques ouverts. Leur grande diversité s'explique par leur origine (naturelle ou artificielle), leur environnement naturel (en particulier l'hydrogéologie de leur bassin versant), leur profondeur et la forme de leur cuvette.

La France compte plus de 25 000 plans d'eau, répartis sur l'ensemble du territoire, dont quelques-uns sont des grands lacs. Toutefois, les plans d'eau les plus nombreux sont des étangs de petite taille. L'ensemble des plans d'eau français représente une surface totale de 623 000 ha dont 352 000 ha en France métropolitaine (EauFrance 2019a).

5.1.2.1.2 Eaux souterraines

Les deux tiers du territoire métropolitain sont pourvus de nappes ou de réseaux d'eau souterraine, libres ou captifs, contenus dans plusieurs centaines d'aquifères individualisés. On distingue environ 200 aquifères d'importance régionale, d'une superficie supérieure à 100 km^2, dont 175 aquifères à nappe libre, monocouche ou multicouche, souvent limités par les cours d'eau majeurs qui les traversent, dont (MEDDE, ARMINES et BRGM 2012) :

- 15 grands aquifères alluviaux,
- 40 aquifères karstiques,
- 20 aquifères multicouches (au moins en partie),
- 25 aquifères profonds, à nappe captive, reliés pour la plupart à l'un des précédents.

Parallèlement, dans le cadre de la DCE, 645 masses d'eau souterraine ont été délimitées : 598 en métropole et 47 dans les DOM. Ces entités de référence regroupent le plus souvent plusieurs aquifères libres et/ou captifs, et cela, sur différents niveaux de profondeur.

■ Cas particulier des aquifères karstiques

Les aquifères karstiques (figure 11) résultent de la dissolution des roches carbonatées (calcaires et dolomies) consécutive à l'infiltration de l'eau de pluie. L'eau de ces aquifères peut ressortir à l'air libre au niveau de résurgences. L'écoulement de l'eau, et donc le transfert des contaminants, dépend de la porosité du milieu. Différents processus d'infiltration de l'eau coexistent : (*i*) l'infiltration rapide au niveau de larges fractures ou conduits dénommés « pertes », (*ii*) l'infiltration diffuse au travers de fines fractures, ou (*iii*) l'infiltration à travers la matrice. La contamination des aquifères karstiques dépendra donc, d'une part des caractéristiques géologiques (porosité de la zone d'infiltration, présence de voies d'infiltration rapide), et d'autre part de la couverture, de la nature des sols et de leurs usages (Sinreich, Pronk et Kozel 2014 ; Valdes *et al.* 2014).

Dans un contexte où s'observe une contamination croissante de l'environnement par des BRA, les aquifères karstiques et en particulier l'aquifère de la craie, sont des environnements aquatiques

particulièrement sensibles, car ils sont très souvent exploités pour l'alimentation en EDCH au niveau national (55 % de la ressource) (Bakalowicz 2005).

Lors de son transfert dans l'aquifère de la craie, le devenir des BRA dépend de leur capacité à résister aux stress environnementaux (oligotrophie, température), à la lyse et la prédation par les protozoaires, et des modalités de transfert de l'eau. Le transfert des bactéries au travers de la matrice est freiné par la faible porosité mais aussi par un phénomène d'adhérence des bactéries à la roche due à des liaisons électrostatiques ou à un piégeage par des colloïdes du milieu (Engström *et al.* 2015). Au contraire, dans un hydrosystème karstique où l'eau de surface s'infiltre rapidement, le devenir des bactéries d'origine fécale, à l'image des particules d'origine allochtone, est dépendante de la dynamique particulaire spécifique de cet environnement : les bactéries peuvent soit circuler rapidement le long de l'aquifère, soit rester piégées au sein de l'hydrosystème intra-karstique (Dussart-Baptista *et al.* 2003 ; Fournier *et al.* 2007 ; Pronk, Goldscheider et Zopfi 2007).

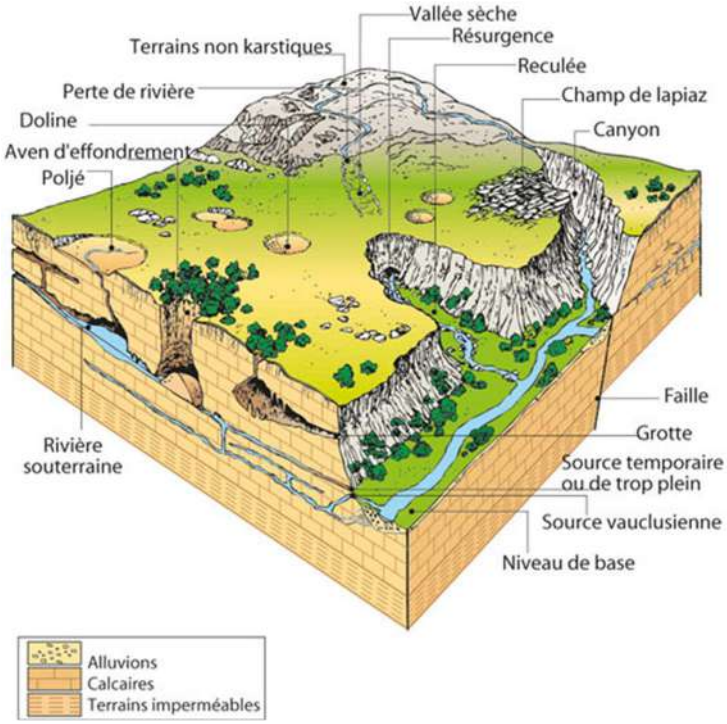


Figure 11. Hydrosystème karstique (Bakalowicz 1999).

5.1.2.1.3 Eau littorale

Retenant les définitions de la directive cadre sur l'eau (DCE), le GT considère que les eaux littorales comprennent les eaux de transition et les eaux côtières, définies comme suit :

- Eaux de transition : « *masses d'eaux de surface à proximité des embouchures de rivières, qui sont partiellement salines en raison de leur proximité d'eaux côtières, mais qui sont fondamentalement influencées par des courants d'eau douce.* »
- Eaux côtières : « *eaux de surface situées en deçà d'une ligne dont tout point est situé à une distance d'un mille marin au-delà du point le plus proche de la ligne de base servant pour la mesure de la largeur des eaux territoriales et qui s'étendent, le cas échéant, jusqu'à la limite extérieure d'une eau de transition.* »

Dans le rapport, les eaux de transition ont été traitées avec les eaux de surface continentales.

5.1.2.1.4 Cadre réglementaire

La directive cadre sur l'eau (DCE) 2000/60/CE[15] modifiée, transposée en droit français, établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (JOCE du 22 décembre 2000). Elle exige que soit établi, dans chaque district hydrographique, un programme de surveillance des eaux et fixe comme objectif de parvenir au bon état des eaux et des milieux aquatiques à l'échéance de 2015 sauf dérogation le reportant en 2021 ou 2027. Elle fixe également les méthodes pour atteindre le bon état écologique des masses d'eaux :

- Le « bon état » d'une masse d'eau de surface est atteint lorsque son état écologique et son état chimique sont bons :
  - L'état chimique des eaux de surface est « bon » si la concentration des « substances prioritaires », dont la liste est fixée au niveau européen, est inférieure aux « normes de qualité environnementales » (NQE). Actuellement, 45 « substances prioritaires » sont à surveiller dans les eaux de surface[16] ;
  - L'état écologique des eaux de surface est évalué à partir de leur qualité biologique (flore et faune), chimique (polluants spécifiques de l'état écologique définis par l'arrêté du 25 janvier 2010 modifié relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R. 212-10, R. 212-11 et R. 212-18 du code de l'environnement) et hydromorphologique (état des berges, continuité du cours d'eau, hydrologie). Pour chaque masse d'eau, cet état est caractérisé par un écart aux « conditions de référence », c'est-à-dire à des conditions pas, ou très peu, influencées par l'activité humaine.
- Le « bon état » d'une eau souterraine est l'état atteint par une masse d'eau souterraine lorsque son état quantitatif et son état chimique sont au moins bons :
  - Le bon état quantitatif d'une eau souterraine est atteint lorsque les prélèvements ne dépassent pas la capacité de renouvellement de la ressource disponible, compte tenu de la nécessaire alimentation des écosystèmes aquatiques ;
  - L'état chimique est bon lorsque les concentrations en polluants dues aux activités humaines ne dépassent pas les normes et valeurs seuils, lorsqu'elles n'entravent pas l'atteinte des objectifs fixés pour les masses d'eaux de surface alimentées par les eaux souterraines considérées et lorsqu'il n'est constaté aucune intrusion d'eau salée due aux activités humaines.

En complément de l'évaluation de l'état des masses d'eau, qui ne fait intervenir ni ATB, ni BRA ou GRA, l'arrêté du 25 janvier 2010 modifié établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement liste des substances à surveiller dans les ESU et/ou les ESO, dont quelques ATB (voir ci-dessous).

Toutefois, les indicateurs de qualité microbiologique (BRA et GRA), ne font pas l'objet d'une surveillance réglementaire.

Surveillance réglementaire des antibiotiques dans les eaux en France

Le système d'information sur l'eau (SIE) organise notamment la bancarisation des données publiques sur les milieux aquatiques. Les données du SIE sont commanditées principalement par

[15] Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil, du 23 novembre 2000, établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (JOCE du 22.12.2000, L 327/1-72 pp.).

[16] Fixées par l'arrêté du 27 juillet 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R. 212-10, R. 212-11 et R. 212-18 du code de l'environnement, transposant la Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau.

l'Office français de la biodiversité (OFB) et les Agences et Offices de l'eau, dans le cadre de la surveillance réglementaire, et parfois de programmes de recherche que ces organismes pilotent.

La règlementation n'impose la surveillance que de quelques ATB dans les eaux. Ainsi, au titre de l'arrêté du 25 janvier 2010 modifié établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement, sont à surveiller :

- L'ofloxacine et le sulfaméthoxazole dans les eaux de surface en métropole et DROM ;
- La sulfaméthazine dans les eaux de surface en DROM (optionnel pour la Réunion) ;
- L'ofloxacine, la ciprofloxacine et le sulfaméthoxazole dans les eaux souterraines en métropole et DROM ;
- L'érythromycine dans les eaux souterraines en France métropolitaine.

Trois banques de données permettent d'accéder aux mesures et aux métadonnées associées, au fur et à mesure de leur production :

- Pour les eaux continentales, les données sont compilées dans chaque organisme puis transférées dans la banque publique de données NAIADES (http://www.naiades.eaufrance.fr/) ;
- Pour les eaux souterraines, la base publique de données est ADES (https://ades.eaufrance.fr/) ;
- Pour les eaux marines et côtières, les données sont compilées dans le système QUADRIGE (https://wwz.ifremer.fr/surval/Donnees/Cartographie-Donnees-par-parametre#/map).

De plus, trois macrolides (érythromycine, clarithromycine et azithromycine) sont inscrits depuis 2015 sur la première liste de vigilance[17] de la directive cadre sur l'eau (DCE – directive 2000/60/CE). Cette liste de vigilance regroupe les molécules dont les concentrations dans les eaux de surface sont suivies dans toute l'Union européenne pour générer une cartographie robuste. L'amoxicilline et la ciprofloxacine ont été ajoutées à cette liste en 2018[18], puis le sulfaméthoxazole et le triméthoprime en 2020[19].

5.1.2.2 Milieux terrestres

Les milieux terrestres sont susceptibles d'être directement contaminés par les ATB, GRA et BRA par des PRO lors de l'épandage ou par des eaux usées traitées lors d'infiltration ou d'irrigation. De plus, les ATB, BRA et GRA peuvent être entraînés *via* le ruissellement à partir de sols et/ou d'eau contaminés.

5.1.2.2.1 Sols

Le sol, couche superficielle des surfaces continentales, est le produit de l'altération de la roche sous-jacente sous l'effet combiné du climat, de la topographie, et des organismes vivants (flore, faune et êtres humains). De la surface de la terre jusqu'à la roche-mère, son épaisseur peut varier de

[17] Décision d'exécution (UE) n° 2015/495 du 20/03/15 établissant une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil (Abrogée)

[18] Décision d'exécution (UE) n° 2018/840 de la Commission du 05/06/18 établissant une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la décision d'exécution (UE) 2015/495 de la Commission.

[19] Décision d'exécution (UE) n° 2020/1161 de la Commission du 4 août 2020 établissant une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil.

quelques centimètres à quelques dizaines de mètres. Il est formé d'une succession de couches (horizons) elles-mêmes constituées d'assemblage de particules minérales (produits issus de la dégradation de la roche-mère) et de particules organiques (produits issus de la décomposition et du métabolisme des organismes vivants). Le mode d'assemblage des particules (ex : structure) détermine la répartition de la matière solide et des pores conditionnant la circulation de l'eau, des nutriments et des gaz. L'homme et ses activités (agricoles, urbaines et industrielles) participent à l'évolution des sols et à la connectivité avec les autres milieux de l'environnement.

En France, en 2018, 59 % de la surface métropolitaine correspond à des terres agricoles (32 millions d'hectares - Mha), 34 % à des forêts et milieux semi-naturels (19 Mha) et 6 % correspond à des territoires artificialisés (3 Mha). Les zones humides et les zones en eau recouvrent environ 1 % du territoire. Ces proportions évoluent peu depuis 1990 (Data.gouv.fr 2019). L'irrigation des terres agricoles concerne 15 % des exploitations et près de 6 % de la surface agricole utile. Elle est majoritairement dédiée aux terres de grandes cultures (maïs, céréales, oléagineux) et assurée par prélèvement dans les cours d'eau, les nappes phréatiques, les retenues d'eau et beaucoup plus rarement par les eaux usées traitées de STEU (Campardon, Loubier et Morardet 2012).

À la surface du globe, il existe de nombreux types de sol variant par leur structure et leurs propriétés physiques et chimiques. À une micro-échelle, ils offrent une grande diversité d'habitats hébergeant ainsi une importante biodiversité microbienne dont une très grande partie est encore inconnue. On estime à plusieurs milliards l'abondance des bactéries par gramme de sol et à plusieurs millions celle des champignons (Horner-Devine, Carney et Bohannan 2004). Le nombre d'espèces bactériennes varierait selon les sols de quelques milliers à plusieurs centaines de milliers (Curtis, Sloan et Scannell 2002). Sur la base des données du RMQS (Réseau de mesures de la qualité des sols), l'Atlas français des bactéries du sol (Karimi *et al.* 2018) fait état de la présence de 114 252 taxons répartis sur tout le territoire avec une richesse bactérienne variant de 870 à 3 074 taxons par site (2 200 sites inventoriés). Cette biodiversité microbienne est connue pour être à l'origine de nombreux ATB (notamment chez les actinobactéries) et de GRA (Riesenfeld, Goodman et Handelsman 2004). Inversement, le sol peut constituer un réservoir de pathogènes, notamment pour les plantes mais aussi pour l'Homme et l'animal.

5.1.2.2.2 Flore

Le sol est le lieu de l'ancrage des systèmes racinaires des végétaux et constitue leur réservoir d'eau et d'éléments nutritifs. À l'interface du sol et des végétaux, on distingue la rhizosphère, où les micro-organismes sont influencés pour leurs apports nutritifs par les sécrétions racinaires, le mucilage et les cellules racinaires éliminées. La rhizosphère comprend ainsi le sol rhizosphérique (sol adhérant aux racines), et le rhizoplan représenté par la surface de la racine. La rhizosphère est décrite comme un site particulièrement actif par l'abondance de sa biomasse microbienne, et l'intensité des activités et des interactions entre micro-organismes, que celles-ci soient bénéfiques ou pathogènes (Whipps 2001).

Il a été démontré que les bactéries qui ont une activité antifongique et/ou antibactérienne sont présentes en plus grand nombre dans la rhizosphère de différentes plantes (Berg *et al.* 2002 ; Berg *et al.* 2005). En termes de diversité selon les techniques utilisées, les données de la littérature vont de moins de 100 à plus de 55 000 unités taxonomiques opérationnelles (OTU, assimilable à la notion d'espèce) (Mendes, Garbeva et Raaijmakers 2013).

Les parties aériennes des plantes, notamment les feuilles, les tiges, les bourgeons, les fleurs et les fruits, constituent un habitat pour les micro-organismes appelé phyllosphère. Ces micro-organismes sont localisés à la surface (épiphyte), ou à l'intérieur (endophyte) des tissus de la plante. Parmi eux, les bactéries sont les plus abondantes avec une moyenne d'environ 10^6-10^7 cellules/cm^2 de surface foliaire (Lindow et Brandl 2003).

Rhizosphère et phyllosphère sont deux compartiments avec leurs propres microbiotes. Bien qu'ils semblent avoir une biodiversité moindre que le sol « nu » de nombreuses études font également état du rôle important des microbiotes de ces deux compartiments dans la productivité végétale et le fonctionnement des écosystèmes (Laforest-Lapointe et Whitaker 2019).

5.1.2.3 Faune sauvage

La macrofaune et la microfaune peuvent résider dans des biotopes contaminés (sols, eaux), et il existe de multiples voies d'échange entre humains, faune sauvage, animaux domestiques ou de rente. La macrofaune sauvage rurale et/ou urbaine (oiseaux, rongeurs et ruminants, poissons et invertébrés) est un vecteur de dissémination de l'ABR, principalement *via* le microbiote intestinal. La microfaune (insectes, protozoaires) participe également à cette dissémination.

Les seules données disponibles relatives à la contamination de la faune par les ATB concernent le biote aquatique (poissons et coquillages) et visent à compléter la description de la contamination du milieu aquatique par les ATB, à l'instar de ce qui est fait pour la surveillance des métaux et/ou de micropolluants organiques bioaccumulables. Toutefois, les ATB n'étant pas ou peu bioaccumulables (voir annexe 3), l'utilisation du biote pour le suivi de la contamination du milieu aquatique par les ATB, n'est que peu informative par rapport à la contamination des autres compartiments. De plus, ces analyses étant menées sur les organismes entiers ou sur des tissus ou organes internes, elles ne peuvent pas être mises en parallèle avec les données relatives au BRA et GRA des microbiotes de la faune sauvage.

5.1.3 Évolutions liées au changement climatique et aux modifications des pratiques liées à l'économie circulaire

La caractérisation de la contamination et du devenir des ATB, des BRA et des GRA dans les milieux récepteurs de l'environnement a été réalisée en l'état actuel des connaissances et des pratiques.

Toutefois, le changement climatique pourrait entraîner des modifications, en particulier sur :

- L'hydrologie en lien avec l'augmentation des températures et des périodes de sécheresse (Ouzeau *et al.* 2014) : une diminution du débit des cours d'eau diminuerait de fait la dilution des rejets et donc augmenterait les concentrations d'ATB, BRA et GRA d'origine anthropique dans le milieu récepteur *a minima* au niveau des points de rejet ;
- L'augmentation probable de la fréquence des précipitations extrêmes (Ouzeau *et al.* 2014), pouvant entraîner un lessivage des sols amendés plus fréquent et plus important et une augmentation des surverses de réseaux unitaires ;
- L'augmentation de la température des masses d'eau et des sols qui pourrait modifier l'abondance et la biodiversité microbienne et donc la prédation des BRA (voir § 4.2.1) et/ou la biodégradation des ATB (voir § 6.2.1.2).

De plus, dans un objectif de rationalisation des ressources en eau, de nouvelles pratiques tendent à modifier le cycle « naturel ». Par exemple, l'utilisation d'eaux usées traitées pour l'irrigation (voir § 5.1.1.1.4), la recharge artificielle de nappes d'eau souterraine (Anses 2016) ou les retenues d'eau collinaires modifient les voies d'introduction de sources de contamination dans les milieux récepteurs et/ou les échanges entre ces compartiments, modifiant ainsi la dynamique spatiale et temporelle des contaminations.

L'impact de ces évolutions climatiques et anthropiques sur la dissémination des ATB, des BRA et des GRA doit être pris en compte dans des programmes de recherche afin d'en mesurer les effets potentiels et de mettre en place les moyens d'y remédier. Actuellement les données disponibles ne permettent pas un examen approfondi dans le cadre de ce travail.

5.2 Méthodes de détection et de quantification des antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement

5.2.1 Méthodes d'échantillonnage

Les stratégies et méthodes d'échantillonnage sont variables et dépendent de l'objectif scientifique de l'étude. Les modalités de prélèvements sont rarement décrites dans les publications. Pourtant, les modalités d'échantillonnage influent sur les résultats et donc leurs interprétations et

extrapolations pour l'environnement. La stratégie d'échantillonnage intègre ou pas, la représentativité des prélèvements au regard de la variabilité temporelle et spatiale de la contamination dans certains milieux.

5.2.1.1 Échantillonnage des matrices liquides

La majorité des mesures sont faites sur un échantillon ponctuel, prélevé sur un site et à un instant donné. L'échantillonnage ponctuel ne permet pas d'appréhender la variabilité temporelle de la contamination à l'échelle de la journée, comme celle observée par exemple pour la concentration de composés pharmaceutiques dans les eaux usées traitées de STEU.

L'utilisation d'un préleveur automatique asservi au débit et/ou au pas de temps, permet de travailler sur un échantillon moyenné de plusieurs sous-échantillons (en général 24 h) et est souvent utilisé pour analyser les rejets de STEU, plus rarement en rivière.

En milieu littoral ou fluvial, les prélèvements ponctuels se font à partir d'un bateau, d'un ponton ou d'un pont, avec une bouteille de prélèvement de type « Niskin », ou un tuyau de prélèvement couplé à une pompe péristaltique. Ces deux méthodes permettent de contrôler la profondeur de prélèvement et donc d'y associer finement les paramètres abiotiques (température, oxygène, matière organique, salinité, MES). Sur cours d'eau, les prélèvements ponctuels peuvent aussi se faire à partir de la berge ou de pontons, avec des cannes de prélèvement soutenant un bécher, une bouteille (stérile pour la microbiologie) ou un seau, mais il est aussi possible d'équiper des sites avec des échantillonneurs automatiques. Le prélèvement est classiquement effectué à quelques centimètres sous la surface pour éviter les flottants. Des guides techniques décrivent les opérations d'échantillonnage dans le cadre de la surveillance réglementaire (Aquaref 2017).

Pour les eaux souterraines, il est possible d'accéder à l'aquifère grâce à des forages (piézomètres également appelés qualitomètres), ou à la surface au niveau de résurgences naturelles. Les échantillonneurs passifs peuvent aussi être installés dans les piézomètres pour le suivi de certains micropolluants organiques ou inorganiques.

Pour intégrer au mieux la variabilité temporelle et/ou détecter des molécules en faibles concentrations dans le milieu, comme les ATB, des dispositifs expérimentaux d'échantillonnage *in situ* peuvent être utilisés pour le suivi de la contamination par les ATB : les POCIS (*Polar Organic Compounds Integrative Sampler*) ou les Chemcatcher. Toutefois, chaque type d'échantillonneur passif couvre une gamme définie de composés et certaines molécules peuvent ne pas être échantillonnées en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques (polarité, structure, *etc.*). Ces dispositifs permettent d'obtenir des concentrations moyennes intégrées sur la période d'exposition, prenant ainsi en compte les variations temporelles. Le calcul permettant de revenir à une concentration moyenne intégrée repose sur des constantes obtenues en milieu expérimental contrôlé. Les spécificités de chaque contexte (teneur en MES, hydrodynamique) ne sont pas prises en compte et les études donnent des résultats le plus souvent qualitatifs (Pinasseau *et al.* 2019), ou semi-quantitatifs. Ces outils permettent de comparer des stations en amont et aval d'un rejet (figure 12) ou d'effectuer des profils longitudinaux. Leur capacité d'accumulation permet, par l'abaissement des limites de quantification, de détecter des composés non mesurables par les approches conventionnelles.

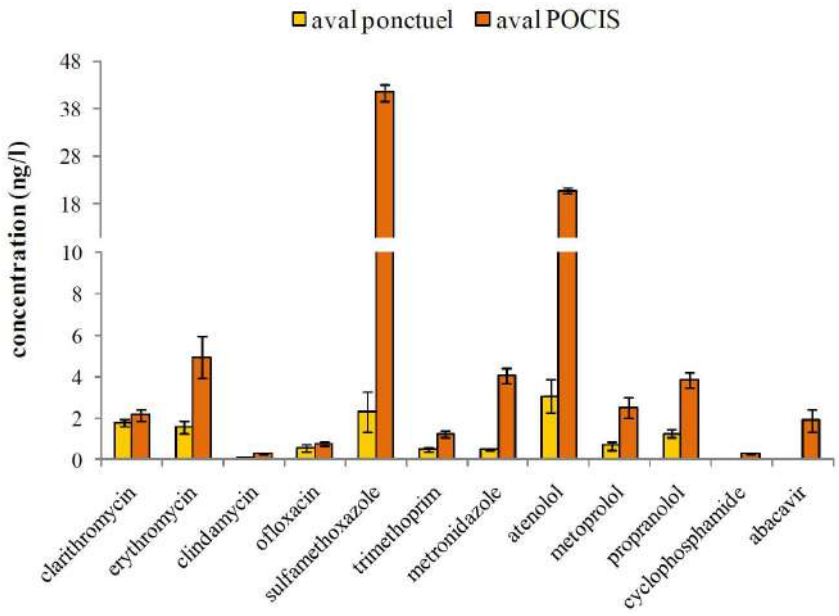


Figure 12. Exemple de comparaison de la quantification d'antibiotiques en aval d'un rejet après échantillonnage ponctuel par rapport à l'utilisation d'intégrateurs passifs de type POCIS (Capdeville 2011).

5.2.1.2 Échantillonnage de sédiments

L'analyse des sédiments (le premier cm), se fait par prélèvement à la spatule stérile dans des zones de dépôts identifiées sur les berges ou des vasières. Il est également possible d'utiliser des pièges à sédiments pour recueillir les matières en suspension dans l'eau, ou qui se déposent sur le fond. Ce dernier procédé offre l'avantage de standardiser la quantité de sédiments déposés en fonction du temps. Le prélèvement de sédiment de fond, pour des hauteurs d'eau importantes, se fait avec des bennes à sédiments de type « Eckman » ou « Van Veen », qu'il convient d'aseptiser avant l'utilisation.

Dans le cas d'études portant sur l'archivage sédimentaire, des carottes de sédiments non remaniés peuvent être collectées à l'aide de carottiers spécifiques (ex : « Beeker », carottier à marteaux ou à percussion). La carotte est remontée et sous-échantillonnée en conditions stériles (microbiologie) ou en prenant les précautions spécifiques pour ne pas impacter les analyses chimiques. Le choix du site de carottage détermine la représentativité et la qualité de l'enregistrement sédimentaire. Une datation doit être faite avec des marqueurs isotopiques pour s'assurer que le dépôt des sédiments n'a pas été perturbé, et proposer un modèle d'âge en fonction de la profondeur (Vrel *et al.* 2013).

5.2.1.3 Échantillonnage des périphytons des cours d'eau

Les échantillonnages sont réalisés soit par prélèvements de périphytons qui se développent sur les végétaux ou les supports naturels (cailloux, support immergés) (Aubertheau *et al.* 2017), soit sur des systèmes artificiels propices au développement de périphytons (projet anses OAK[20], PANDORE[21]). Pour cela, les périphytons sont raclés précautionneusement des surfaces à l'aide de scalpels, de raclettes ou de brosses stériles. Ces procédés offrent la possibilité d'exprimer les résultats en fonction d'une unité de surface.

[20] Projet OAK - Observatoire de l'Antibiorésistance dans les aquifères Karstiques (PNR-EST Anses 2018).

[21] PANDORE - Prédiction de l'antibiorésistance dans des zones anthropisées environnementales (Anses PNR EST 2017).

5.2.1.4 Échantillonnage des produits résiduaires organiques

Les travaux publiés sur la quantification des GRA, des BRA et des ATB dans les PRO ne décrivent que très succinctement les méthodes d'échantillonnage employées. De plus, celles-ci diffèrent en fonction notamment de la teneur en matière sèche du PRO. Pour les PRO liquides, à l'exemple des lisiers et des digestats, les prélèvements sont réalisés après un brassage de la fosse ou du méthaniseur, de quelques minutes à quelques heures. Le volume échantillonné fluctue, selon les études, de 15 mL (Luo *et al.* 2017) à 30 L (Schauss *et al.* 2015 ; Glaeser *et al.* 2016). Pour l'analyse de BRA, quel que soit le volume prélevé, un sous-échantillon de 10 g (ou de 10 mL) à 25 g (ou de 25 mL) est dilué au 1/10^{e} dans une solution tamponnée ou dans un milieu de culture. Les GRA sont en général recherchés dans un sous-échantillon de 200 mg à 1 g après centrifugation de la matrice.

Pour les échantillons solides (fumiers ou litières stockés en tas, composts) la localisation du prélèvement est prise en compte. Ainsi, les échantillons sont prélevés à différentes profondeurs dans les tas ou les andains (tas allongés de forme trapézoïdale). Ils sont analysés directement (Sharma *et al.* 2009 ; Moraru *et al.* 2012) ou après un mélange des échantillons prélevés à différentes hauteurs (Le Devendec *et al.* 2016 ; Xu *et al.* 2016). Les masses prélevées sont très rarement indiquées. Dans l'étude de Moraru *et al.* (2012) réalisée sur de la litière de volailles stockée en tas, la masse des échantillons était de 4 à 6 kg par zone prélevée (à 30 cm et 80 cm de hauteur). Comme pour les PRO liquides, des prélèvements sont sous-échantillonnés avant la quantification des ATB, des GRA et des BRA.

Il est important de noter que les modalités de gestion des PRO diffèrent en fonction de leur taux de matière sèche. Alors que les fosses ou les méthaniseurs sont alimentés quotidiennement en produits organiques, le stockage des fumiers et le compostage fonctionnent en lot. La plupart des études portant sur le comportement des ATB, des BRA et des GRA dans les PRO solides prennent en compte la durée du stockage (et donc l'âge des PRO) ou celle du traitement appliqué et sont donc réalisées sur des échantillons prélevés au cours du temps (plusieurs jours à plusieurs semaines, selon les études). Les abattements observés entre le début et la fin du stockage ou du compostage sont donc représentatifs de la réalité de terrain. En revanche, les échantillons d'entrée et de sortie de méthaniseurs sont prélevés le même jour (sans considération du temps de séjour hydraulique), empêchant une interprétation correcte des données.

La difficulté d'échantillonnage concerne plus particulièrement les PRO solides qui sont plus variés et hétérogènes. Toutefois, il existe une norme européenne (NF EN 12579), non évoquée dans les travaux publiés, qui décrit des méthodes d'échantillonnage des amendements organiques et des supports de culture se présentant sous forme solide. Celle-ci stipule que le nombre de points de prélèvements à réaliser dépend du volume total de la matrice à prélever et que les échantillons doivent être prélevés dans un laps de temps au cours duquel les propriétés de la matrice ne sont pas altérées. Selon la norme, la matrice doit être divisée en parties égales dans lesquelles les échantillons sont prélevés à au moins 50 mm de la surface. Les échantillons sont mélangés afin de constituer un échantillon final.

En conclusion, au regard des données de la littérature scientifique, Il ressort une forte hétérogénéité des modalités d'échantillonnage, lorsque celles-ci sont décrites, qui ne convergent vers aucune règle. De plus, en aucun cas les matériels d'échantillonnage ne sont spécifiés.

5.2.1.5 Échantillonnage des sols

La description des méthodes d'échantillonnage utilisées pour la quantification des ATB, des GRA et des BRA est variable selon les études et ne répond à aucune norme.

Dans un contexte de comparaison de plusieurs sites, telle l'étude de Hartmann *et al.* (2012) sur le RMQS (Réseau de Mesures de la Qualité des Sols[22]) en France, la méthodologie est très

[22] https://www.gissol.fr/le-gis/programmes/rmqs-34

standardisée tant au niveau de la surface et de la profondeur de la zone échantillonnée, que du nombre d'échantillons de sol, de la quantité de sol par échantillon, et des modalités de prélèvement (*i.e.* à la tarière).

Les études recensées dans ce rapport, portant sur la dissémination des ATB, des BRA et/ou des GRA dans les sols suite à l'épandage de PRO sur les transferts entre compartiments, se focalisent sur l'horizon de surface (*i.e.* zone de 0 à 10, 20 ou 30 cm de profondeur) qui correspond à la zone d'incorporation des PRO. Les prélèvements sont faits sur le sol nu, soit avant le semis, soit entre les rangs de plantations.

Avant analyse, le sol est généralement homogénéisé par tamisage, quarté et débarrassé des débris de végétaux. Si ces données ne sont pas renseignées dans les publications, elles font cependant l'objet de procédures habituelles en microbiologie des sols. Tout comme cité précédemment pour les PRO, quelle que soit la quantité de sol prélevé, un à cinq sous-échantillons sont analysés. L'analyse des ATB est généralement réalisée sur 1 g à 10 g d'échantillon homogénéisé (dont certains par cryobroyage). Pour l'isolement des BRA, 5 ou 25 g de sous-échantillon sont broyés puis 100 µL à 1 mL des suspensions sont déposées sur des milieux de culture gélosés. Les GRA sont en général recherchés dans un sous-échantillon de 250 mg à 10 g de matière et l'ADN extrait par des kits commercialisés ou selon des protocoles standardisés ou spécifiques au laboratoire.

Les conditions de tamisage (granulométrie) et les caractéristiques des sols (composition) sont des paramètres importants dans l'interprétation des résultats. Le manque d'homogénéité dans les informations publiées rend difficile la comparaison entre les études.

5.2.1.6 Conservation des échantillons

Quelle que soit la matrice (eau, sol ou PRO), les échantillons sont généralement transportés dans des glacières (4-8°C) jusqu'à la prise en charge au laboratoire. Les BRA doivent être analysées rapidement (dans les 4 à 8 heures qui suivent le prélèvement) en raison de leur possible multiplication ou inhibition au cours du stockage. Les analyses des GRA, qui portent sur le génome, peuvent être différées, les échantillons étant alors conservés à -80°C. Les analyses chimiques sont en général réalisées dans un délai de 24 h à 3 jours après leur prélèvement ou après stabilisation jusqu'à 7 jours à 4°C, voire plusieurs mois à -20°C.

Toutefois, la stabilité des ATB entre le prélèvement de l'échantillon et son analyse est rarement renseignée dans les publications. Des essais montrent une grande variabilité de stabilité entre les molécules ; les conditions optimales (durée/température/agents de stabilisation) étant très variables, des compromis sont indispensables pour considérer simultanément différentes classes d'ATB, ajoutant un facteur d'incertitude dans les résultats analytiques publiés (Mompelat *et al.* 2013).

5.2.2 Quantification des antibiotiques dans l'environnement

5.2.2.1 Méthodes de quantification

La figure 13 présente les principales étapes de traitement d'un échantillon pour la quantification des ATB, depuis l'extraction jusqu'à l'analyse.

5.2.2.1.1 Méthodes d'extraction

Les méthodes de quantification des ATB dans l'environnement sont diverses et s'adaptent en fonction des matrices étudiées (sols, eaux et sédiments), des molécules d'intérêt et des objectifs (notamment en termes de sensibilité analytique). Ces méthodes sont celles employées pour détecter classiquement des micropolluants organiques.

Le principe général repose sur une première étape d'extraction des ATB de la matrice, spécifique de la matrice, suivie d'une concentration de l'extrait.

Des étapes préalables de préparation (séchage, tamisage, broyage) homogénéisent les échantillons solides avant extraction. Les méthodes d'extraction des matrices solides (matières en suspension, sols, sédiments, boues, matrices animales et végétales) requièrent d'extraire les molécules ciblées d'une matrice complexe à l'aide d'un solvant organique permettant ensuite leur analyse par

différentes techniques chromatographiques. Plusieurs méthodes d'extraction existent : extraction assistée par micro-ondes (MAE), extraction accélérée par solvant (ASE) ou plus récemment, l'extraction sur phase solide par sels dispersés de type QuEChERS. Les techniques développées pour les matrices sédiments et sols ont plus récemment été appliquées aux matrices végétales et animales.

Les méthodes d'extraction des matrices liquides ont pour principal objectif de reconcentrer les composés présents dans les phases aqueuses (souvent à de faibles concentrations) pour en faciliter la détection et la quantification. La majorité des techniques reposent sur l'extraction liquide/liquide (Wallace et Aga 2016) ou l'extraction de type solide/liquide : les composés présents dans l'eau sont transférés vers un support solide pour lequel leur affinité est plus forte. Les composés d'intérêt sont ensuite désorbés du support solide avec un solvant organique. L'extraction en phase solide se décline sous plusieurs formes : par exemple sur cartouche ou disque adsorbant (SPE : *solid phase extraction*) ou sur fibre ou barreau (SPME, *solid-phase microextraction* ; SBSE, *stir bar sorptive extraction*).

Ces étapes produisent un extrait en solvant organique contenant les molécules ciblées.

Selon la complexité de la matrice initiale, une étape complémentaire de purification des extraits peut être mise en œuvre afin de réduire la concentration des molécules interférentes. Néanmoins, l'enchaînement des étapes d'extraction et de purification peut s'accompagner de la perte, partielle ou totale, des molécules ciblées. De ce fait, les techniques d'analyses des eaux « propres », ne nécessitant pas d'étape de purification, sont souvent plus sensibles que les méthodes pour les matrices solides beaucoup plus complexes à analyser.

5.2.2.1.2 Méthodes d'analyse

Les techniques d'analyse majeures utilisées à ce jour sont :

- La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) qui permet de rechercher et quantifier simultanément et de manière ciblée un grand nombre de composés considérés comme polaires et peu volatils.
- La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) : cette technique assez généraliste permet de rechercher les composés apolaires, les plus volatils. Elle peut être parfois associée à une étape de pré-dérivation pour améliorer la détection.

Différents types de spectrométrie de masse (SM) existent ; de manière générique, la spectrométrie de masse quadripolaire (SM ou SM/SM) de basse résolution, permet les analyses ciblées, sélectives et sensibles des composés d'intérêt.

Depuis quelques années, les techniques de spectrométrie de masse haute résolution (HRSM) se développent et permettent d'acquérir des empreintes moléculaires des échantillons, sans sélection *a priori* des molécules d'intérêt à rechercher. Ces approches novatrices de screening qualitatif permettent des recherches itératives en fonction de l'évolution des connaissances. Néanmoins, le principe d'empreinte moléculaire (un nombre limité de méthodes d'analyse pour détecter le plus grand nombre possible de molécules) exclut de fait les composés « spécifiques ».

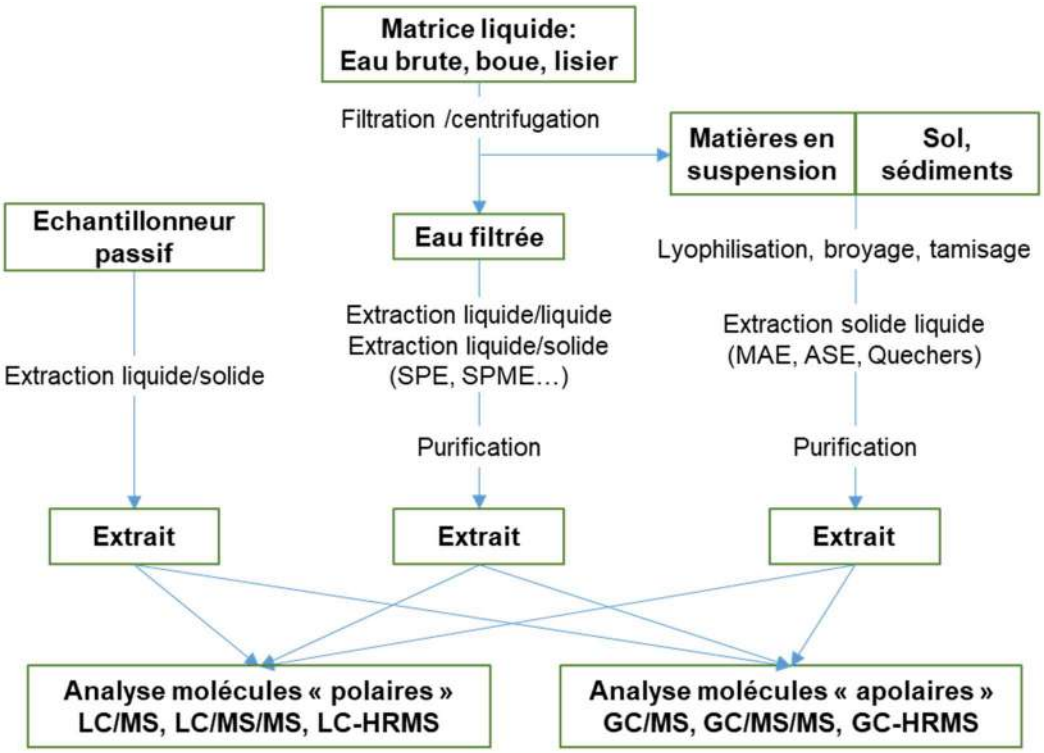


Figure 13. Principales étapes de traitement d'un échantillon depuis l'extraction jusqu'à l'analyse chimique.

5.2.2.2 Verrous méthodologiques

5.2.2.2.1 Complexité analytique

Les différentes techniques d'analyse permettent de détecter et quantifier simultanément un grand nombre de molécules. Toutefois, en raison de leurs propriétés physico-chimiques, certains composés nécessitent le développement de méthodes spécifiques afin de pouvoir les détecter ou d'abaisser les seuils de détection. Cette complexité analytique constitue un verrou à l'acquisition de données pour certains ATB.

Ainsi, certaines molécules sont peu ou ne sont pas recherchées dans les études à large spectre puisqu'elles nécessiteraient des moyens spécifiques et supplémentaires. C'est le cas par exemple des carbapénèmes qui pendant de nombreuses années n'ont pas été recherchés en raison de limites de détection très largement supérieures aux faibles concentrations environnementales. En effet, toutes les techniques de préparation permettant une préconcentration des molécules présentes dans l'échantillon d'eau utilisent des solvants organiques qui altèrent la molécule, et rendent sa détection impossible. Des méthodes d'analyses existent mais ne permettent pas d'atteindre les niveaux requis pour une application environnementale : les limites de quantification sont actuellement de l'ordre du $mg.L^{-1}$, voire au mieux de 50 $\mu g.L^{-1}$, alors que l'analyse des carbapénèmes dans les STEU nécessiterait des limites de quantification de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$ et dans le milieu naturel de l'ordre du $ng.L^{-1}$.

De même, les laboratoires prestataires réalisant les analyses de surveillance réglementaire tendent à privilégier des méthodes multi-résidus (couvrant une large gamme de composés mais moins coûteuses à mettre en œuvre) au détriment de la sensibilité analytique. En effet, les limites de quantification (LQ) obtenues à partir de méthodes multi-résidus sont généralement plus élevées que celles des méthodes spécifiques.

Certaines classes de composés aux propriétés physico-chimiques très spécifiques demandent donc des efforts analytiques conséquents. Ainsi, l'analyse des aminosides ou de la colistine nécessite des techniques chromatographiques particulières (colonne chromatographique de type HILIC ou

chromatographie par appariement d'ions) (Mokh 2013). Ces molécules ne pourront donc pas être analysées simultanément avec d'autres composés.

Ainsi, des différences méthodologiques liées à l'analyse conduisent à des variations importantes de LQ pour une même molécule ou à des panels différents de molécules recherchées, rendant parfois difficile les comparaisons entre les études.

5.2.2.2.2 Disponibilité des standards analytiques

Le développement de méthodes d'analyse pertinentes nécessite l'acquisition par le laboratoire de composés de référence pour valider l'analyse. Cependant, les standards analytiques commerciaux n'ont pas toujours la pureté nécessaire aux prérequis analytiques, notamment pour les ATB d'origine naturelle (produits par des bactéries ou des champignons). De plus, compte tenu de l'intérêt très récent pour certains composés, à ce jour, il n'existe pas encore d'étalon commercial, ce qui est un frein majeur à leur recherche dans l'environnement. C'est le cas principalement des produits de dégradation des ATB d'intérêt.

5.2.2.3 Méthodes alternatives

Des essais immunologiques selon la méthode ELISA, mis au point à l'origine pour les échantillons d'aliments, ont été utilisés sur le terrain pour surveiller les eaux usées et des échantillons de sol prélevés sur des parcelles expérimentales traitées avec des PRO (Parthasarathy *et al.* 2018). En raison de la réactivité croisée des anticorps, les essais ELISA peuvent surestimer les concentrations (Aga *et al.* 2005).

Une technique plus récente de détection des ATB utilise des biopuces à aptamères, qui sont des oligonucléotides d'ADN ou d'ARN se liant à des cibles spécifiques avec une grande affinité (Yang *et al.* 2017). Ils sont adaptés pour détecter des concentrations d'ATB de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$ dans des matrices complexes, dont l'eau (Parthasarathy *et al.* 2018).

Une autre méthode utilise le métabolisme interne des bactéries pour déterminer des concentrations d'ATB. Les génomes bactériens sont alors modifiés pour émettre un signal proportionnel à la concentration d'ATB. Pour ce faire, des constructions génétiques sont insérées (*i.e.* fusion d'un promoteur, dont l'expression est dépendante de la concentration d'ATB, et un gène rapporteur, dont l'expression est facilement mesurable) dans une cellule bactérienne qui devient alors un biocapteur. Ces biocapteurs bactériens informent sur la biodisponibilité des ATB qui, dans le cadre du suivi de l'évolution de l'activité bactérienne offre une mesure plus pertinente qu'une mesure directe (Parthasarathy *et al.* 2018). Toutefois, le seuil de détection est un défi, de même que la spécificité de ces outils. Un autre obstacle est la mise en œuvre sur le terrain des biocapteurs bactériens.

5.2.3 Détection et quantification des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement

La recherche des BRA ou GRA dans les échantillons environnementaux ne fait pas l'objet de norme spécifique.

Il existe deux approches permettant de mettre en évidence l'ABR dans l'environnement : (i) l'approche culturale qui recherche ou quantifie des BRA (l'expression de la résistance se traduit par le développement de la BRA sur un milieu de culture contenant l'ATB ciblé) et (ii) l'approche génomique qui recherche ou quantifie les GRA.

Les disparités observées entre ces deux approches peuvent être dues à un échantillonnage non optimal ou à une faible sensibilité d'une des techniques mais peuvent également être dues au fait qu'un GRA peut être présent dans un échantillon (détecté par PCR et qPCR), et non exprimé (RT-qPCR négative avec un profil sensible à l'antibiogramme).

5.2.3.1 Méthodes dépendantes de la culture

La quantification des BRA dans l'environnement par culture est maîtrisée et accessible à la plupart des laboratoires de microbiologie. Elle n'en demeure pas moins fastidieuse lors du traitement d'un grand nombre d'échantillons et fait intervenir plusieurs étapes. Deux approches sont retenues. La

première consiste à isoler une population d'une espèce bactérienne (ex : *E. coli*, *Klebsiella* spp.), qui pourra être isolée sur milieux spécifiques. La seconde (approche « culturomique »), consiste à isoler une communauté présente dans un environnement donné sans cibler spécifiquement une espèce ou un genre.

Les résultats de dénombrement ne sont accessibles qu'à partir de 24 h, mais plusieurs jours voire semaines peuvent être nécessaires pour générer des résultats sur le profil phénotypique ou génotypique de la résistance aux ATB à l'échelle d'une population bactérienne isolée d'un environnement donné.

Le dénombrement des BRA appartenant à une espèce spécifique, à partir d'échantillons d'eau, repose sur des méthodologies classiquement utilisées pour l'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau, notamment la méthode de filtration sur membrane (47 mm de diamètre, seuil de coupure 0,45 µm) préconisée par la norme ISO EN 9308. Le volume déposé est fonction de la contamination du milieu, et doit permettre de ne jamais dépasser un effectif de 100 UFC par filtre déposé sur la gélose (pour les boîtes de Petri de 55 mm de diamètre). Des milieux sélectifs avec ou sans ATB tels qu'utilisés en microbiologie hospitalière ou alimentaire orientent l'isolement d'espèces pathogènes à partir d'échantillons environnementaux.

En revanche, l'étude des BRA au sein des communautés microbiennes sans approche ciblée sur une ou des espèces spécifiques, est confrontée à l'importance de la biomasse bactérienne et à la grande diversité d'espèces présentes dans des échantillons environnementaux tels que les sols, les PRO et les sédiments. La nécessité de coupler l'isolement de BRA à l'identification des isolats (ex : par des approches biochimiques, génétiques, ou protéomiques) avant l'évaluation des profils d'ABR rend cette approche fastidieuse. Les avantages et limites de la méthode sont détaillés sur la figure 14. Trois écueils majeurs doivent être surmontés :

- Le premier est lié au temps et aux conditions de transport entre le prélèvement et l'analyse : la présence de protozoaires et la perte de cultivabilité peut conduire à une sous-estimation du nombre de bactéries, alors que des températures élevées peuvent favoriser la croissance. Le BRGM (2008) préconise un transport à température identique à celle du prélèvement d'origine dans une enceinte isotherme, ou par défaut à 4°C. De même, il est recommandé de procéder à une analyse au plus tard dans les 4 heures suivant le prélèvement. Dans les publications, ce temps est en général de 8 heures.
- Le second concerne plus particulièrement l'analyse de sédiments ou d'eau turbide. Il est lié à la correspondance entre le nombre de bactéries et le nombre d'UFC, qui ne dépendra pas des caractéristiques d'association intrinsèque de l'espèce bactérienne, mais correspondra le plus souvent au nombre de bactéries associées à un agrégat organo-minéral. Certains auteurs proposent donc un traitement préalable qui vise à déstructurer ces agrégats, tels qu'un traitement au pyrophosphate de sodium (Na_2PP_i) (100 mM) ou aux ultrasons (Petit *et al.* 2017).
- Le troisième écueil est lié à la dérive génétique au sein du laboratoire, lors des étapes d'isolements successifs sur milieu sans ATB pour s'assurer de la pureté de l'isolat, et qui peuvent par exemple induire une perte de plasmide consécutif au coût génétique de la résistance.

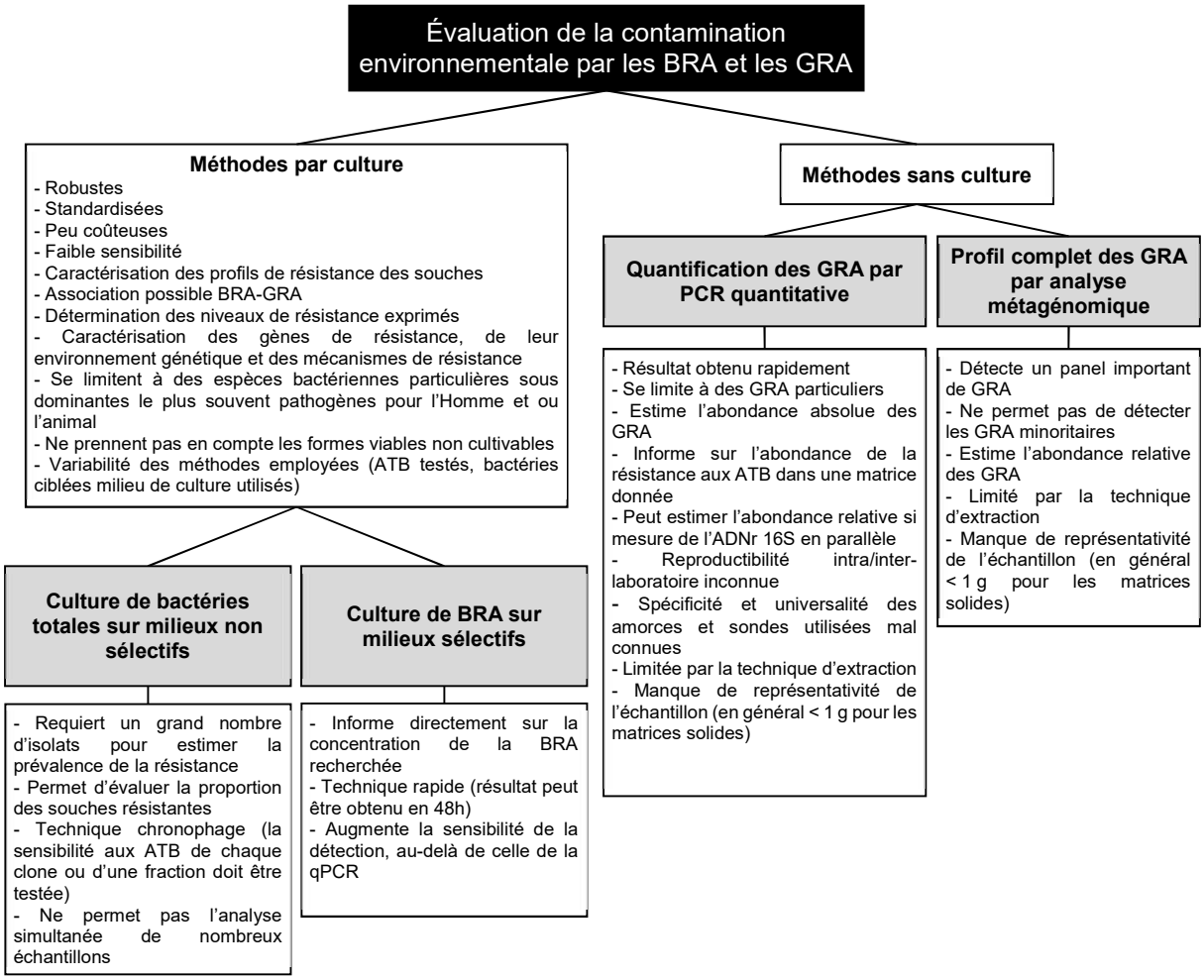


Figure 14. Principales méthodes de détection ou de quantification de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement, d'après Manaia *et al.* (2016).

5.2.3.2 Méthodes indépendantes de la culture

Ces approches sont basées sur l'extraction directe des acides nucléiques (ADN et/ou ARN) d'échantillons complexes (eau, sol, sédiment, lisier, fèces, *etc.*). Les acides nucléiques extraits, purifiés, quantifiés et dilués à une solution de travail sont ensuite analysés avec deux types de protocoles : (i) une approche ciblée qui détecte, quantifie l'abondance, ou quantifie l'expression de(s) gène(s) ciblé(s) et (ii) une approche non ciblée qui caractérise le résistome par une approche de métagénomique basée sur le séquençage à haut débit des acides nucléiques (technologies « Illumina », « Nanopore » ou « IonTorrent » par exemple) (figure 15).

5.2.3.2.1 Approche ciblée de la détection des supports génétiques de la résistance

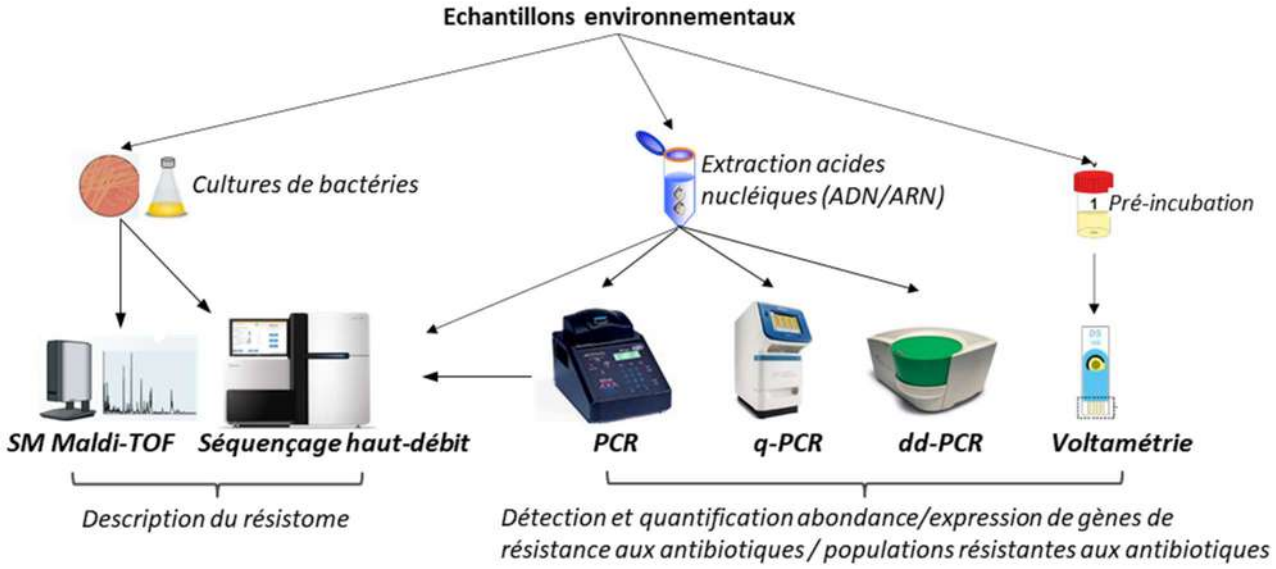


Figure 15. Approches de détection et de quantification des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance, et de quantification de l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques.

Une première approche repose sur l'amplification par PCR d'un GRA à l'aide d'un couple d'amorces oligonucléotiques le ciblant spécifiquement à partir d'un extrait d'ADN. Il existe de nombreux couples d'amorces oligonucléotidiques publiés et ciblant de très nombreux GRA. Les essais de PCR quantitative permettent de détecter le nombre de séquences d'un GRA contenu dans un échantillon d'ADN environnemental, simplifié par le nombre de GRA dans la suite du rapport.

La PCR en point final et la PCR semi-quantitative détectent la présence d'un GRA dans un échantillon donné tandis que la PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet de quantifier le nombre de copies d'un GRA contenu dans un échantillon. Il est à noter que pour cette dernière, deux systèmes de détection sont généralement employés, faisant intervenir soit (i) un intercalant fluorescent de type SybrGreen® ou (ii) une sonde spécifique de type TaqMan®.

La qPCR mesure l'abondance absolue du GRA (quantification directe des copies du gène ciblé) ou l'abondance relative (ratio du nombre de copies du gène ciblé sur le nombre de copies d'ADNr 16S). Les résultats sont généralement exprimés en nombre de copies de GRA par gramme d'échantillon (abondance absolue) ou par copie d'ADNr 16S (abondance relative). La qPCR à haut débit (MF-qPCR, de type Fluidigm) a récemment ouvert de nouvelles perspectives (Sandberg, Ishii et LaPara 2018).

La PCR quantitative absolue ddPCR (*droplet digital PCR*) possède un seuil de détection plus bas que la qPCR permettant de détecter des cibles en très faibles quantités telles que les GRA (Cavé *et al.* 2016), mais également de différencier de faibles variations entre les nombres de copies. Ainsi, si des écarts de 0,5-1 log sont nécessaires pour différencier des abondances mesurées en qPCR, un facteur 2 suffit pour la ddPCR. Par ailleurs, la méthode LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) employée en routine pour détecter des pathogènes humains dans les matrices alimentaires en s'affranchissant de l'étape de la culture microbienne pourrait être adaptée et appliquée pour détecter des BRA à partir d'extraits d'ADN extraits de matrices complexes.

Ces techniques de PCR ne quantifient pas l'expression d'un GRA. La quantification de l'expression des GRA requiert l'extraction des ARN messagers, leur transcription en ADN complémentaire qui sera quantifié par une RT-qPCR. Ainsi, le signal de la RT-qPCR reflète le niveau d'expression du GRA considéré.

Les principaux avantages de la PCR sont la sensibilité, la rapidité et la faible quantité d'échantillon nécessaire. Ses principaux inconvénients sont liés à la présence d'inhibiteurs de la Taq-polymerase

dans l'ADN extrait de matrices environnementales et aux risques de contamination dans les différentes étapes du processus (extraction, purification et dilution des acides nucléiques, préparation des réactions de PCR, qPCR et RT-qPCR). Les plus ou moins grandes spécificité et universalité des amorces et sondes utilisées pour cibler les bactéries/gènes d'intérêts peuvent également représenter un inconvénient. Par ailleurs, il convient de noter que les approches indépendantes de la culture sont fréquemment appliquées à des ADN extraits à partir de faibles volumes/quantités d'échantillons solides notamment pour les sols, les sédiments et les déchets organiques (rarement supérieur à 2 g) alors que les approches cultivables sont généralement appliquées sur des volume/quantités jusqu'à 10 fois supérieurs. Dans tous les cas, le faible volume d'échantillon traité questionne sur la représentativité du résultat à une échelle terrain/écosystème.

5.2.3.2.2 Approche non ciblée de la détection des supports génétiques de la résistance

La seconde approche dite de « métagénomique » est moins fréquemment utilisée (Hendriksen *et al.* 2019). Elle s'affranchit de l'étape de PCR et séquence directement les ADN extraits (DNA-seq) ou produits à partir (RNA-seq) des échantillons environnementaux par des techniques de séquençage à haut débit. Les séquences nucléotidiques obtenues sont soumises à des traitements bio-informatiques pour identifier et quantifier l'abondance des séquences de GRA et des supports génétiques des GRA.

Ces analyses bio-informatiques reposent sur la comparaison des données de séquençage de l'échantillon environnemental à des bases de données alimentées par des séquences de GRA caractérisés (avec ou sans leur environnement génétique). Malgré les avancées spectaculaires des capacités de séquençage à haut débit, cette méthodologie reste pour l'instant limitée par la profondeur de séquençage qui ne permet d'accéder qu'aux GRA dominants. Dans les prochaines années, il est toutefois attendu que cette technologie soit améliorée afin de dépasser cette limite. Si tel était le cas, alors elle pourrait supplanter l'approche ciblée décrite ci-dessus.

La métatranscriptomique analyse l'ensemble des ARN issus de la transcription des génomes de l'ensemble des organismes d'un milieu. Cette technique, qui quantifie l'expression de tous les gènes d'un échantillon, est pour l'instant peu utilisée pour caractériser la résistance aux ATB dans l'environnement en raison de son coût et de sa faible sensibilité.

Cependant, de nombreux facteurs, notamment la méthode d'extraction de l'ADN, les séquences d'amorces et la plateforme de séquençage utilisée, peuvent affecter la précision des résultats obtenus (Fouhy *et al.* 2016). Il y a intérêt de choisir une approche standardisée pour le séquençage dans les situations où une comparaison entre plusieurs cycles de séquençage est nécessaire. L'utilisation de contrôles internes commerciaux (*mock community* : mélange connu de bactéries ou d'ADN microbiens) est encouragée pour faciliter cette standardisation.

Parmi les méthodes récemment développées, la combinaison des approches de culturomique et de métagénomique s'est avérée très puissante pour décrire l'écologie de communautés microbiennes (Ferrario *et al.* 2017) et pourrait être d'intérêt pour comprendre les interactions entre les BRA et les autres bactéries. Par ailleurs, des chercheurs ont récemment exploré une voie alternative consistant à mesurer l'activité enzymatique β-lactamase pour quantifier l'abondance de bactéries résistantes aux β-lactamines (Chantemesse *et al.* 2017). Le système développé repose sur la détection ampérométrique sensible à l'hydrolyse du noyau β-lactame. Ce système permet de quantifier les bactéries résistantes aux β-lactamines dans les eaux usées (Chantemesse *et al.* 2017).

5.2.4 Indicateurs et surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement

L'évaluation de la dissémination de l'ABR dans l'environnement peut être envisagée avec différentes approches selon les objectifs retenus : la surveillance avec la définition de valeurs de seuil d'alerte associées à des valeurs de risque, la gestion par des analyses qualitatives, quantitatives parfois agrégées, la compréhension des phénomènes avec l'identification de paramètres de suivi et de paramètres clés.

Bien souvent, les objectifs retenus sont définis en considérant le maintien de la qualité des soins, que les approches soient sanitaires (avec les problèmes d'infections nosocomiales dues aux BRA dans les établissements hospitaliers) ou environnementales (contaminations anthropiques des

ressources en eau, des sols, des plantes avec retour à l'Homme). Ainsi, le choix d'un indicateur dépend des objectifs à atteindre (risque sanitaire, risque environnemental, dissémination) et aucun indicateur unique ne fait l'objet d'un consensus international.

Dans le domaine de la santé humaine, les indicateurs de suivi sont principalement *E. coli* porteurs de résistance à la colistine (gène *mcr-1*) et aux C3G, les *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (gène bla_{NDM-1}), ou le SARM.

Dans les filières alimentaires (bovines, porcines, volailles), les données sur la résistance aux ATB de bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Campylobacter coli et Campylobacter jejuni* ou de bactéries commensales telles que *Escherichia coli* et *Enterococcus* spp. sont recueillies et une surveillance de la résistance aux ATB de la « fourche à la fourchette » a été mise en place dans l'Union européenne (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*).

Dans le cas des milieux aquatiques, principalement anthropisés, les indicateurs traditionnels de contamination fécale ne prédisent qu'imparfaitement la présence de l'ABR dans l'eau.

- **Indicateurs identifiés dans la bibliographie comme permettant d'évaluer l'antibiorésistance dans l'environnement**

Plusieurs approches sont proposées afin d'évaluer de manière qualitative et/ou quantitative l'ABR dans l'environnement au travers d'indicateurs globaux, chacune ayant des avantages et des inconvénients :

- La recherche par méthode culturale de BRA ou de groupes bactériens résistants spécifiques (principalement *E. coli* producteurs de BLSE, d'entérocoques résistants à la vancomycine, SARM), avec une limitation aux bactéries cultivables.
- La recherche par biologie moléculaire de GRA spécifiques ou l'établissement de profil de résistance (« résistome ») avec la difficulté de la diversité des gènes eux-mêmes et/ou celle des espèces bactériennes hôtes.
- La recherche de gènes de plasticité du génome (type intégrons), mais qui ne permet pas d'identifier les GRA associés.

D'après Pärnänen *et al.* (2019), les résultats de la méthode « qPCR array » et ceux obtenus par des méthodes culturales menées en parallèle ne sont pas corrélés. Toutefois, l'abondance relative de nombreux GRA serait corrélée à la prévalence de phénotypes de résistance d'isolats cliniques d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ou *S. aureus.* Ainsi, l'ubiquité et la sélection (associée à la compétitivité environnementale des BRA) pourraient être les concepts clés de discussion autour de la résistance dans l'environnement.

De manière plus globale, les Agences sanitaires européennes recommandent le rapprochement des indicateurs, intégrant la surveillance de l'ABR (notamment *E. coli* C3G-R/BLSE) et de la consommation d'ATB, entre les secteurs de la santé humaine et de la santé animale ECDC, EFSA et EMA (2017). De son côté, l'OMS teste l'utilisation d'*E. coli* BLSE pour la surveillance de l'ABR en santé humaine, en santé animale et dans l'environnement (protocole Tricycle (OMS 2018)). Dans une approche « One Health », ces indicateurs peuvent être complétés par des données acquises (concentrations d'ATB, d'ETM, de biocides, niveau de contamination fécale) sur des zones de collecte de données sur la résistance dans l'environnement (sites ateliers, observatoires) (Karkman, Pärnänen et Larsson 2019). Ces données doivent permettre des études de tendance, d'impact ou d'intervention sur la présence d'ATB, de BRA et/ou de GRA dans l'environnement.

La revue systématique de Goulas *et al.* (2020), diligentée par le ministère de l'Environnement et portant sur les solutions pour contrôler la dissémination de la résistance aux ATB dans l'environnement, a montré la diversité des indicateurs de résistance utilisés et les différentes options choisies dans les travaux actuellement menés sur l'ABR, qu'il s'agisse de BRA, de GRA, ou d'EGM. À titre d'exemple, parmi 97 publications portant sur les traitements des déchets organiques, les BRA ont été recherchées parmi les bactéries totales cultivables (~ 50 %) ou pour *E. coli* uniquement (13 %). Les GRA liés à la résistance aux tétracyclines (25 %), aux sulfamides (19 %) et aux

macrolides (15 %) sont les plus fréquemment étudiés, tandis que les intégrons sont les gènes de plasticité du génome les plus recherchés (74 %) (Goulas *et al.* 2018a).

La recherche des intégrons de résistance est souvent proposée comme indicateur unique du fait du lien épidémiologique entre la présence d'intégrons et la multirésistance aux ATB. Ils sont facilement détectables et quantifiables par la recherche du gène codant l'intégrase *intI1* (Gillings *et al.* 2014). Cependant, la détection unique d'*intI1* se heurte à un problème de standardisation, notamment sur l'extraction des ADN à partir des différentes matrices environnementales.

Le consortium du programme Européen COST DARE (Berendonk *et al.* 2015) a proposé comme indicateurs pour le suivi de l'ABR dans l'environnement :

- Les groupes bactériens suivants : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* ;
- Le panel de déterminants génétiques : *intI1, sul1, sul2,* bla_{CTX-M}, bla_{TEM}, bla_{NDM-1}, bla_{VIM}, bla_{KPC}, *qnrS*, *aac*-(6')-*Ib-cr*, *vanA*, *mecA*, *erm*(B), *erm*(F), *tet*(M), *aph* (voir annexe 4, tableau XXXI).

Les indicateurs suggérés par le Water JPI SCARE sont soit des gènes amplifiés codant la résistance aux ATB de première génération, soit associés à des EGM, tels que *aadA*, *qac*EΔ1, *erm*(F) et *intI1* (Pärnänen *et al.* 2019). De plus, l'abondance de gènes pourrait être prédite en utilisant un sous-ensemble de gènes. Par exemple, *qac*EΔ1 seul prédit 90 % de la variance de l'abondance totale de GRA.

L'équipe de Bürgman propose de suivre le pourcentage d'incidence de la mobilité (*mobility incidence*, % M) pour quantifier le potentiel de mobilité des GRA. Ce paramètre est le pourcentage de contigs (séquences nucléotidiques issues de l'assemblage de produits de séquençage) portant un GRA associé à au moins un indicateur de mobilité (iEGM) dans tous les contigs portant un GRA (Ju *et al.* 2019).

Martínez, Coque et Baquero (2014) ont proposé que l'évaluation du risque de transfert génétique de GRA des réservoirs environnementaux aux agents pathogènes humains soit associée à la détection de GRA mobiles connus pour être présents dans les agents pathogènes. Ainsi, la détection environnementale de facteurs de résistance déjà mobilisés non encore retrouvés chez les pathogènes refléterait plus directement un risque d'apparition de résistance, avec des conséquences potentiellement beaucoup plus importantes pour la santé animale et humaine que le transfert d'un gène déjà largement diffusé chez les pathogènes et le microbiote humain.

Le profil de sensibilité des *E. coli* cultivables, pour un panel d'ATB déterminé, est actuellement retenu comme un des indicateurs de dissémination de l'ABR dans les différents compartiments (Homme, animal, environnement). Un des avantages majeurs de cette méthodologie est sa standardisation aisée dans tous les pays, qui permettra de renseigner des bases de données nationales et internationales, et ainsi d'assurer un suivi de la dissémination de l'ABR dans les différents compartiments de l'environnement à l'échelle de la planète.

5.3 Synthèse

5.3.1 Milieux considérés

Les principales sources d'émission d'ATB, de BRA et de GRA sont les déjections humaines et animales, en particulier des individus ayant été traités aux ATB (urines et fèces pour les ATB et fèces pour les BRA et GRA). Ainsi, les principales sources de contamination de l'environnement par les ATB, les BRA et les GRA identifiées sont :

- Les **eaux usées traitées** issues des stations de traitement des eaux usées (STEU) : les réseaux d'assainissement collectent les eaux usées issues des activités humaines (dont domestiques, industrielles et d'activités de soins) et une partie des eaux pluviales pour les diriger vers des STEU dont le principal objectif est de limiter la contamination organique et particulaire. Les eaux usées traitées sont majoritairement rejetées dans les eaux de surface. Ces rejets localisés et continus sont qualifiés de sources de contamination ponctuelles.

- Les **produits résiduaires organiques** (PRO) qui regroupent notamment les effluents d'élevage (fumiers, lisiers) et les boues issues du traitement des eaux usées urbaines. Après stockage et/ou traitement, les PRO sont généralement épandus sur les sols agricoles dans un contexte de valorisation des déchets pour fertiliser les sols, suivant un plan d'épandage défini par arrêté préfectoral. Ces rejets sont qualifiés de source de contamination diffuse.
- Les **eaux de pisciculture d'eau douce** : cinq ATB disposent d'une autorisation de mise sur le marché pour la filière piscicole. Les pisciculture sont directement connectées à l'environnement aquatique. Ainsi, les traitements ATB appliqués ainsi que les BRA et GRA présents dans les bassins peuvent être disséminés rapidement vers le milieu aquatique adjacent.

L'assainissement non collectif, les rejets des sites producteurs de principes actifs ATB ou de médicaments contenant des ATB, les anciens sites d'enfouissement de déchets ou les biodéchets issus des composteurs de proximité pourraient également contaminer l'environnement par les ATB, les BRA et/ou les GRA. Toutefois, par manque de données, ces sources de contamination n'ont pas pu être étudiées lors de l'expertise.

La figure 16 illustre les voies d'introduction et de répartition de ces sources de contamination dans les différents compartiments récepteurs de l'environnement considérés dans cette expertise :

- Les milieux aquatiques : eaux de surface, eaux souterraines et eaux littorales,
- Les milieux terrestres : sols et flore (rhizosphère et phyllosphère),
- La faune sauvage.

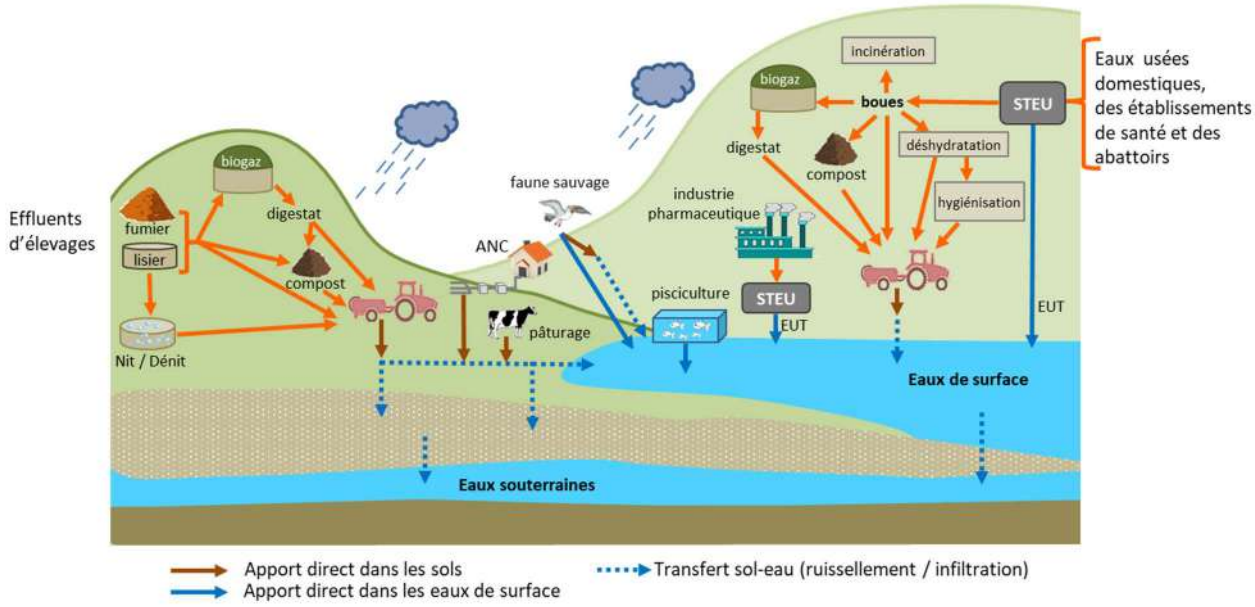


Figure 16. Principales voies de contamination des sols et des eaux par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques.

STEU=station de traitement des eaux usées ; EUT=eaux usées traitées ; ANC=assainissement non collectif ; Nit/Dénit=traitement biologique du lisier par nitrification / dénitrification.

Les sources principales de contamination et les compartiments récepteurs associés, tels que présentés dans l'expertise et dans la figure 16, correspondent aux conditions actuelles. Le changement climatique (ex : augmentation de la fréquence des événements pluvieux extrêmes) et le développement de l'économie circulaire de l'eau (ex : augmentation de l'utilisation d'eaux usées traitées pour l'irrigation, recharge artificielle de nappes d'eau souterraine) auront un impact sur la dissémination des ATB, des BRA et des GRA. Cette évolution des pratiques n'a pas été prise en compte dans cette expertise.

5.3.2 Méthodes de détection et de quantification

La diversité des méthodes analytiques mises en œuvre pour la détection des ATB, des BRA et des GRA dans les différentes matrices environnementales complique la comparaison des études. Les techniques et les stratégies d'échantillonnage sont une première source de variation importante des résultats.

- **Antibiotiques**
  - La détection et la quantification des ATB reposent sur de nombreuses méthodes dont les outils ne sont pas encore totalement harmonisés. Pour les milieux aquatiques, des techniques d'échantillonnage basées sur l'échantillonnage passif sont de plus en plus utilisées. Les méthodes d'extraction doivent être adaptées en fonction du type de matrice (sols, PRO, sédiments, eaux, biofilms) et/ou de la fraction ciblée (phase dissoute/solide) selon les ATB.
  - Sur le volet analytique, les techniques de séparation par chromatographie en phase liquide, couplée à la détection par spectrométrie de masse, qui permettent de détecter et de quantifier simultanément, et de manière ciblée, un grand nombre de composés considérés comme polaires et peu volatils, sont les techniques de prédilection. Elles peuvent être complétées par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, pour les composés apolaires plus volatils. Le panel d'ATB étudiés est très variable selon les études, et il subsiste des molécules encore peu ou pas étudiées à ce jour (soit par difficulté technique, soit par absence de standards analytiques).
- **Antibiorésistance**
  - Les méthodes de détection et quantification de l'ABR se heurtent aux mêmes écueils. Deux approches peuvent être employées : une approche culturale qui détecte ou quantifie des BRA, ou une approche moléculaire qui détecte ou quantifie les GRA présents, à partir des ADN extraits des matrices environnementales. Pour ces deux approches, la multiplicité des méthodes employées en raison de la diversité des BRA et des GRA recherchés complique les comparaisons entre études. Comme pour les ATB, les méthodes d'échantillonnage, d'extraction d'ADN ainsi que les techniques de détection/quantification moléculaire des gènes, voire le choix des conditions de culture microbiologique souffrent d'un manque d'uniformisation.

De manière générale, l'absence d'harmonisation, voire de norme(s), concernant l'échantillonnage ou l'analyse des ATB, des BRA ou des GRA, est une source de variabilité importante des données, dont l'impact est difficile à évaluer et empêche la comparaison des données d'une étude à une autre.

La nécessité de disposer d'indicateurs est une problématique connue et discutée dans de nombreuses initiatives, toutefois, les indicateurs identifiés différent selon les objectifs attendus (voir § 5.2.4).

6 Contamination de l'environnement par les antibiotiques

Les données recensées en France témoignent d'une importante variabilité des concentrations en ATB quels que soient les milieux et les sites considérés. Néanmoins des sources de contamination ressortent de manière récurrente : les rejets des eaux usées traitées, l'épandage de PRO et dans une moindre mesure les rejets de pisciculture, qui sont toutefois assez peu étudiés.

6.1 Bilan des données de contamination de l'environnement par les antibiotiques en France

6.1.1 Données disponibles et modalités de traitement des données

Les données présentées proviennent de deux types de sources d'information : les données produites par des équipes de recherche et les données du Système d'information sur l'eau (SIE), qui organise notamment la bancarisation des données publiques sur les milieux aquatiques. Compte tenu des différences dans leurs modalités d'acquisition (en particulier plan d'échantillonnage et limites analytiques), chaque type de données a été traité de manière indépendante.

6.1.1.1 Recensement, sélection et traitement des données

6.1.1.1.1 Recensement des données produites par des équipes de recherche

La recherche bibliographique a ciblé les publications scientifiques comportant des données françaises de contamination par les ATB dans les matrices considérées. La recherche a été effectuée en ciblant les équipes travaillant sur la quantification de médicaments dans l'environnement en France. Elle a ensuite été complétée par des articles d'intérêt cités dans les publications recensées. En complément, les données produites par des équipes de recherche recensées dans les bases de données rapportant des concentrations en ATB (Togola 2018 ; SIPIBEL 2019) et des données non publiées transmises directement par des équipes de recherche ont été prises en compte (Nazaret 2020a, 2020b ; Petit 2020). Chaque publication a été évaluée afin d'assurer son adéquation avec l'objectif : seules les publications mentionnant la quantification d'ATB dans une des matrices d'intérêt ont été conservées.

Les concentrations en ATB ont ensuite été répertoriées, par matrice et par ATB, en distinguant d'une part les concentrations individuelles (c'est-à-dire une concentration par échantillon et par ATB) et d'autre part les concentrations agrégées (c'est-à-dire une concentration moyenne ou médiane, temporelle ou spatiale pour un ensemble d'échantillons). Lors de cette étape, les résultats « non exploitables » suivants ont été écartés :

- Les résultats présentés uniquement sous forme graphique,
- Les résultats ne précisant pas les limites analytiques de la méthode utilisée : limite de détection (LD) ou limite de quantification (LQ),
- Les concentrations notées comme inférieures à une valeur autre que la LD ou la LQ.

6.1.1.1.2 Recensement des données issues des bases de données sur la contamination de l'environnement

Les données alimentant le système d'information sur l'eau (SIE) sont commanditées principalement par l'Office français de la biodiversité (OFB) et les Agences et Offices de l'eau, dans le cadre de la surveillance réglementaire, et parfois de programmes de recherche que ces organismes pilotent.

Une extraction des données du SIE relatives aux ATB a été effectuée à partir des trois banques de données existantes (voir § 5.1.2.1.4) en janvier 2019 et a porté sur les données bancarisées entre janvier 2008 et décembre 2018. Toutes les données qualifiées de « correctes » dans les bases ont été retenues.

6.1.1.1.3 Traitement des données

Les données de contaminations sont agrégées par ATB et par matrice en distinguant les données produites par des équipes de recherche de celles issues du SIE sur la contamination de l'environnement. Sont mentionnées, pour l'ensemble des données, les fréquences de quantification et les concentrations moyennes, médianes et maximales mesurées. Les médianes et moyennes ont été calculées à partir d'un effectif de cinq échantillons. Pour cela, selon les pratiques en vigueur pour la description des données de contamination de l'environnement par des contaminants chimiques, le GT a choisi de substituer les données censurées « à gauche »[23] selon les modalités présentées dans le tableau VI.

Tableau VI. Modalités de substitution des données censurées à gauche.

Concentration mesurée	Concentration substituée
C < LD	C = LD/2
LD < C < LQ	C = (LD + LQ)/2
C < LQ et pas d'indication sur la LD	C = LQ/2

Afin d'évaluer l'impact de cette substitution, les concentrations ainsi calculées ont été confrontées aux moyennes et médianes calculées uniquement avec les données quantifiées. Les écarts constatés, pour les dix ATB les plus analysés par matrice, dépendent des matrices et des molécules considérées. Toutefois, les concentrations sont du même ordre de grandeur.

Les données agrégées collectées ont, quant à elles, servi à compléter et discuter les résultats obtenus à partir des données individuelles.

6.1.1.2 Antibiotiques pour lesquels aucune donnée de contamination n'est disponible

Il existe un certain nombre d'ATB identifiés comme ayant potentiellement un impact sur les mécanismes de résistance mais pour lesquels aucune donnée de contamination de l'environnement n'a été identifiée. Différentes causes expliquent cette absence :

- Les molécules ne sont pas identifiées comme d'intérêt : leurs consommations sont très faibles, très localisées et/ou très spécifiques. Elles n'ont donc jamais été priorisées pour des campagnes de suivis que ce soit dans les projets de recherche ou dans le cadre d'exercices nationaux exploratoires. C'est le cas de la plupart des ATB dits de « derniers recours » (ex : tigécycline, linézolide, daptomycine, tédizolide), rarement utilisés et *a priori* indétectables dans l'environnement ;
- Les molécules sont bien identifiées comme molécules d'intérêt, mais des difficultés analytiques majeures font qu'elles ne sont pas intégrées aux campagnes d'analyses (ex : streptogramines, carbapénèmes, colistine - voir § 5.2.2.2) ;
- Les données concernant les molécules qui se révèlent « non quantifiables » tendent à ne pas être systématiquement publiées ;
- La dégradation rapide de certains ATB qui les rend rarement détectables dans l'environnement est bien caractérisée (ex : β-lactamines).

[23] Les données dites « censurées à gauche » correspondent à des concentrations inférieures à la limite analytique du laboratoire, donc non quantifiées ou non détectées.

6.1.1.3 Description générale des données exploitées

Au total, 70 substances actives et sept produits de transformation ont été analysés au moins une fois dans les matrices environnementales étudiées, dont 70 substances actives et six produits de transformation par les équipes de recherche et 33 substances actives et un produit de transformation dans les données bancarisées du SIE (tableau VII).

Tableau VII. Nombre d'antibiotiques recherchés dans des matrices environnementales en France et nombre d'analyses par classe pharmacologique.

Classes pharmacologiques	Données produites par des équipes de recherche		Données issues des bases de données		Total
	N ATB recherchés	N analyses	N ATB recherchés	N analyses	N ATB recherchés
Aminosides	1	13	1	1 073	1
Antibactériens stéroïdiens	1	12	0	-	1
Antimycobactériens	1	20	0	-	1
C1G et C2G	3	84	0	-	3
C3G et C4G	4	283	0	-	4
Carbapénèmes	1	170	0	-	1
Dérivés de l'imidazole	2	110	0	-	2
Fluoroquinolones	10 + 1 PT	1 804	7	66 481	10 + 1 PT
Glycopeptides	1	190	0	-	1
Lincosamides	2	222	2	6 715	2
Macrolides	9 + 1 PT	1 656	4+1 PT	43 450	9 + 2 PT
Monobactames	1	170	0	-	1
Pénicillines	7	696	4	7 155	7
Phénicolés	3 + 1 PT	257	1	4 696	3 + 1 PT
Polypeptides cycliques	1	12	0	-	1
Quinolones	4	880	2	3 636	4
Streptogramines	1	12	0	-	1
Sulfamides	13 + 1 PT	1 778	7	39 624	13 + 1 PT
Tétracyclines	4 + 2 PT	1 004	4	17 705	4 + 2 PT
Triméthoprime	1	623	1	7 667	1
Total	70 + 6 PT	9 996	33 + 1 PT	198 202	70 + 7 PT

N ATB recherchés = nombre d'ATB recherchés dans la classe ; N analyses = nombre de fois qu'un ATB de la classe est analysé ; PT = produit de transformation

6.1.1.3.1 Données produites par des équipes de recherche exploitées de manière agrégée

Les classes pharmacologiques avec le plus grand nombre d'ATB analysés sont les sulfamides, les fluoroquinolones, les macrolides et les pénicillines (tableau VII) qui appartiennent aux classes les plus vendues en médecine humaine. À ces trois classes majoritaires, s'ajoutent les tétracyclines, première classe consommée en médecine vétérinaire.

Toutes les classes d'ATB utilisées en médecine humaine ou vétérinaire (voir tableau VII) sont représentées, à l'exception des « autres céphalosporines », des dérivés du nitrofurane et des pleuromutilines qui représentent à elles trois moins de 0,4 % du total des ATB vendus (en tonnes). Toutefois, les concentrations environnementales de certaines classes consommées en médecine humaine et/ou vétérinaire sont rarement déterminées. Il s'agit en particulier des streptogramines,

deuxième classe la plus consommée en médecine humaine et des aminosides, quatrième classe la plus consommée en médecine vétérinaire.

Les pénicillines, qui sont les ATB les plus consommés en médecine humaine, ne sont que modérément recherchées. Ceci s'explique par leur rapide dégradation dans l'environnement (voir § 6.2.1.2).

Parmi les ATB « critiques » en médecine humaine (voir § 2.3.1.2), les quinolones, les fluoroquinolones et les macrolides ont été fréquemment analysés par les équipes de recherche. Les C3G, les C4G, la vancomycine (glycopeptide) et le méropénème (carbapénème) ont également été analysés dans une moindre mesure (autour de 200 analyses chacun). Les autres ATB critiques (autres glycopeptides et carbapénèmes, témocilline, polymyxines et kétolides) n'ont jamais été analysés.

Les nombres d'études et d'analyses réalisées sont très variables en fonction des matrices étudiées (tableau VIII) : la majorité des études porte sur la phase dissoute des eaux de surface. Aucune donnée française n'a été identifiée pour les eaux usées d'abattoirs, les eaux et rejets de pisciculture, les eaux côtières, les plantes, le biote aquatique et la faune sauvage.

Tableau VIII. Nombre d'échantillons et de sources de données par matrice.

Types de sources de contamination		Nombre d'échantillons	Nombre de sources de données*
Sources de contamination d'origine humaine	Eaux usées traitées urbaines	121	12
	PRO	114	9
Sources de contamination d'origine animale	PRO solides	30	7
	PRO liquide	9	4
Total		**274**	**25**

Compartiments récepteurs		Nombre d'échantillons	Nombre de sources de données*
Eaux de surface	Phases dissoutes	588	26
	Sédiments	68	4
	Périphytons	32	2
Eaux souterraines (phase dissoute)		137	5
Sols		84	7
Total		**909**	**31**

* Le nombre de sources de données correspond au nombre de publications et de bases de données de recherche pour lesquelles des données ont été recensées pour la matrice considérée.

6.1.1.3.2 Données du Système d'information sur l'eau

Les données du SIE ne concernent que des eaux de surface et des eaux souterraines, aucune donnée concernant les eaux côtières n'a été identifiée. En revanche, le nombre total de données est presque 20 fois supérieur au nombre de données produites par les équipes de recherche.

Les données du SIE proviennent majoritairement de la surveillance réglementaire. Or, dans ce cadre, les molécules à suivre sont choisies en fonction des connaissances produites par les projets de recherche. La liste des ATB analysés est donc systématiquement plus réduite que celles des projets de recherche et ne compte que très peu de molécules différentes.

Les principales classes d'ATB pour lesquelles des données sont disponibles dans les SIE sont les fluoroquinolones, les macrolides, les sulfamides et les tétracyclines, qui correspondent à celle les plus analysées par les équipes de recherche.

6.1.2 Sources de contamination de l'environnement par les antibiotiques

Les données relatives aux concentrations en ATB dans les sources de contamination de l'environnement en France présentées ci-après ont été produites par des équipes de recherche. En effet, il n'existe pas à ce jour de suivi réglementaire pour ces sources, qui ne sont pas intégrées au SIE ou à un autre système équivalent.

Une distinction a été faite entre les sources de contamination d'origine humaine (eaux usées traitées de STEU, boues de STEU et biodéchets) et celles d'origine animale (PRO d'élevage solides et PRO d'élevage liquides). La synthèse de l'ensemble des concentrations en ATB mesurées dans les sources de contamination, produites par les équipes de recherche en France et recensées par ce travail, est présentée dans les tableaux XXXI et XXXII de l'annexe 5.

Le nombre d'analyses par ATB est très variable : le sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine sont les ATB les plus analysés dans les sources de contamination de l'environnement (respectivement 237 et 225 analyses). Parmi les quatre ATB analysés plus de 100 fois, trois sont des fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine, norfloxacine).

À l'exception du céfotaxime, quantifié dans cinq des 12 échantillons dans lesquels il a été analysé, les β-lactamines (pénicillines, céphalosporines, monobactames et carbapénèmes), bien que constituant la classe d'ATB la plus consommée, ne sont que rarement quantifiées dans les sources de contamination de l'environnement. Ainsi, 12 des 14 β-lactamines n'ont jamais été quantifiées et l'amoxicilline n'a été quantifiée qu'une seule fois dans les 18 échantillons étudiés. Ces résultats s'expliquent par la dégradation rapide de ces ATB dans l'environnement (voir § 6.2.1.2) et/ou des difficultés analytiques (voir § 5.2.2.2).

6.1.2.1 Eaux usées

6.1.2.1.1 Eaux usées brutes issues d'établissements de soins

Quelques études ont évalué la présence d'ATB dans les eaux usées brutes d'activité de soins en France :

- La majorité des échantillons a été analysée dans le cadre du projet SIPIBEL[24] (153 échantillons) et concerne cinq ATB : la ciprofloxacine, le sulfaméthoxazole, l'aztréonam, le méropénème et la vancomycine (Perrodin *et al.* 2013 ; Perrodin *et al.* 2016 ; SIPIBEL 2019) ;
- Mullot (2009) a analysé la ciprofloxacine et le sulfaméthoxazole dans 56 échantillons provenant de trois hôpitaux ;
- Capdeville (2011) puis Oberlé *et al.* (2012) ont publié leurs mesures de 50 ATB dans les eaux usées brutes d'un hôpital et d'un EHPAD, en été et en hiver ;
- Ory *et al.* (2016) ont analysé la ciprofloxacine dans trois échantillons d'eaux usées brutes d'un même hôpital, prélevés à des dates différentes.

Les analyses ont été effectuées après filtration des eaux. Ces études ne portant que sur peu d'établissements, les informations qu'elles fournissent sont parcellaires et ne peuvent pas être généralisées à l'ensemble de la France.

Sur les 53 ATB analysés dans des eaux usées d'activité de soins, 31 n'ont jamais été quantifiés. Toutefois, parmi les ATB non quantifiés, seuls l'aztréonam et le méropénème ont été analysés dans plus de quatre échantillons (correspondant à deux sites : un hôpital et un EHPAD). Le tableau IX présente les concentrations mesurées dans les eaux brutes d'activité de soins pour les 10 ATB quantifiés dans le plus grand nombre d'échantillons.

[24] http://www.graie.org/Sipibel/presentation.html

Tableau IX. Concentrations en antibiotiques mesurées dans les eaux usées brutes issues d'établissements de soins pour les 10 antibiotiques quantifiés dans le plus grand nombre d'échantillons.

ATB	Eaux usées brutes hospitalières[a] en ng.L^{-1}					Eaux usées brutes d'EHPAD[b] en ng.L^{-1}		
	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif	C_{Max}
Métronidazole	2	100 %	-	-	32 216	2	100 %	36
Ciprofloxacine	219	99 %	16 850	75 583	1 475 000	2	0 %	-
Norfloxacine	2	50 %	-	-	111	2	100 %	543
Ofloxacine	2	100 %	-	-	68 254	2	100 %	603
Vancomycine	161	82 %	744	2 223	67 350	0	-	-
Clindamycine	2	100 %	-	-	30	2	50 %	33
Azithromycine	2	100 %	-	-	360	2	100 %	32
Roxithromycine	2	100 %	-	-	44 660	2	100 %	88
Spiramycine	2	100 %	-	-	3 868	2	100 %	21 864
Sulfaméthoxazole	195	98 %	2 630	5 555	64 350	2	50 %	5

N=nombre d'échantillons ; % quantif=fréquence de quantification ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale - [a] (Mullot 2009 ; Capdeville 2011 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Perrodin *et al.* 2013 ; Ory *et al.* 2016 ; Perrodin *et al.* 2016 ; SIPIBEL 2019) ; [b] (Capdeville 2011 ; Oberlé *et al.* 2012). Les analyses ont été réalisées sur les échantillons filtrés.

6.1.2.1.1.1 Eaux usées brutes hospitalières

Les fréquences de quantification de la ciprofloxacine, du sulfaméthoxazole et de la vancomycine (seuls ATB analysés et quantifiés dans plus de deux échantillons) dans les eaux usées brutes hospitalières sont respectivement de 99 %, 98 % et 82 %.

Sur les 225 échantillons d'eaux usées brutes hospitalières dans lesquels des ATB ont été analysés, seuls deux n'ont pas présenté de concentration quantifiable en ATB. Toutefois, dans ces deux échantillons, seule la ciprofloxacine était analysée avec une LQ de 5 000 ng.L^{-1}.

Les concentrations médianes sont de 744 ng.L^{-1} pour la vancomycine, de 2 630 ng.L^{-1} pour le sulfaméthoxazole et de 16 850 ng.L^{-1} pour la ciprofloxacine (tableau IX). Les concentrations maximales, comprises entre 32 000 ng.L^{-1} et 69 000 ng.L^{-1} pour cinq ATB (ofloxacine, sulfaméthoxazole, vancomycine, roxithromycine, et métronidazole) et atteignant 1 475 000 ng.L^{-1} pour la ciprofloxacine (tableau IX), mettent en évidence l'existence de pics de concentrations très élevés dans les eaux usées brutes hospitalières pour ces ATB.

Bien que certaines études ne relèvent pas d'effet saisonnier (Mullot 2009), d'autres mettent en évidence une présence plus importante de certains ATB lors des périodes hivernales où l'usage des ATB est plus intense (Capdeville 2011 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Perrodin *et al.* 2013). Les caractéristiques propres à chaque hôpital, telles que la typologie des patients accueillis, la taille et la spécialisation de l'établissement ou les prescriptions, influencent également la contamination des effluents (Ory *et al.* 2016).

6.1.2.1.1.2 Eaux usées brutes d'EHPAD

Les informations disponibles sur les concentrations en ATB dans les eaux usées brutes d'EHPAD en France sont très limitées puisqu'elles sont l'objet d'une étude unique (Capdeville 2011 ; Oberlé *et al.* 2012). Cinquante ATB ont été analysés une fois en été et une fois en hiver dans les eaux d'un même établissement. Sur ces 50 ATB, sept ont été quantifiés lors des deux campagnes (acide pipémidique, azithromycine, métronidazole, norfloxacine, ofloxacine, roxithromycine et spiramycine)

et huit à une seule reprise (ampicilline, bacitracine, clarithromycine, clindamycine, lincomycine, sulfadiazine, sulfaméthoxazole et triméthoprime).

Les concentrations maximales mesurées dans ces eaux usées sont supérieures à 1 000 ng.L^{-1} pour l'acide pipémidique, la spiramycine et la bacitracine ou comprises entre 500 et 700 ng.L^{-1} pour l'ampicilline, l'ofloxacine et la norfloxacine (tableau IX). Toutefois, les concentrations mesurées pour ces ATB lors de la seconde campagne d'échantillonnage sur les eaux usées de ce même établissement se sont avérées inférieures à 100 ng.L^{-1}, indiquant une forte variabilité (notamment saisonnière) des concentrations en ATB dans les eaux usées d'EHPAD. Néanmoins, les concentrations maximales rapportées pour des effluents d'EHPAD se révèlent inférieures aux concentrations maximales pour les eaux usées brutes hospitalières.

6.1.2.1.2 Eaux usées traitées urbaines

Plus de la moitié des 121 échantillons d'eaux usées traitées de STEU dans lesquels des ATB ont été analysés rentre dans le cadre du projet SIPIBEL, *i.e.* majoritairement sur une seule STEU (68 échantillons). Le méropénème, l'aztréonam, la vancomycine, le sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine (Perrodin *et al.* 2016 ; SIPIBEL 2019) sont les ATB analysés. Les résultats des 53 échantillons ne provenant pas du projet SIPIBEL sont extraits de 10 publications (tableau X).

Sur les 56 ATB analysés dans des eaux usées traitées urbaines, le sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine sont les deux ATB les plus fréquemment analysés, avec respectivement 110 et 103 analyses, suivis par le méropénème, la vancomycine et l'aztréonam avec chacun 67 analyses. Pour les autres ATB, ce nombre est inférieur à 26.

Le nombre limité de données ne permet pas d'avoir une vision globale de la contamination des eaux usées traitées urbaines par les ATB en France. Néanmoins, les molécules les plus fréquemment quantifiées sont la clarithromycine, l'azithromycine, la spiramycine, la sulfapyridine, le sulfaméthoxazole, la norfloxacine et l'ofloxacine, avec des fréquences de quantification supérieures à 90 % (tableau X). Le méropénème et l'aztréonam, pourtant parmi les plus fréquemment analysés, n'ont jamais été quantifiés.

27 ATB n'ont jamais été quantifiés dans les eaux usées traitées urbaines en France (tableau XXXII, annexe 5).

Au moins un ATB a été quantifié dans 97 % des échantillons d'eaux usées traitées analysées. Dans les échantillons où aucun ATB n'a été quantifié, le nombre d'ATB analysés est compris entre 1 et 5.

Les concentrations médianes, pour les ATB quantifiés au moins cinq fois, varient entre 0,1 ng.L^{-1} pour la sulfadiméthoxine et 277 ng.L^{-1} pour l'azithromycine. Les concentrations médianes sont supérieures à 100 ng.L^{-1} pour quatre ATB (azithromycine, sulfaméthoxazole, clarithromycine et ofloxacine).

Comme le mettent en évidence les concentrations maximales mesurées pour la ciprofloxacine, le sulfaméthoxazole, l'érythromycine et la roxithromycine, les concentrations en ATB dans les eaux usées traitées peuvent ponctuellement dépasser 1 000 ng.L^{-1}.

Les macrolides utilisés en médecine humaine (azithromycine, roxithromycine, clarithromycine, érythromycine, spiramycine) sont les plus représentés parmi les ATB les plus fréquemment quantifiés dans les eaux usées traitées de STEU et ceux quantifiés aux concentrations les plus élevées.

La contamination, tant au niveau de la diversité des composés détectés que des concentrations mesurées, est dépendante à la fois du type d'eaux usées traitées par la STEU (ex : proportion d'eaux usées d'activités de soins) (Chonova *et al.* 2016 ; Dinh *et al.* 2017a ; Wiest *et al.* 2018), et du type de STEU (taille, traitements, efficacité) (Tamtam 2008 ; Coetsier *et al.* 2009 ; Capdeville 2011 ; Mailler *et al.* 2015 ; Dinh *et al.* 2017a).

Tableau X. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles dans les eaux usées traitées urbaines pour les 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois dans les sources de contamination d'origine humaine en France. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5.

ATB	Eaux usées traitées urbaines[a] en ng.L^{-1}				
	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}
Ciprofloxacine	103	48 %	50	417	6 080
Norfloxacine	17	94 %	60	143	700
Ofloxacine	26	92 %	100	215	960
Vancomycine	67	10 %	4	12	62
Azithromycine	6	100 %	277	434	800
Clarithromycine	12	100 %	113	225	840
Érythromycine	15	80 %	75	215	1 724
Roxithromycine	18	72 %	61	228	1 100
Spiramycine	6	100 %	68	100	200
Fluméquine	20	35 %	1	95	830
Sulfaméthoxazole	110	96 %	200	360	3 110
Sulfapyridine	7	100 %	60	119	396
Doxycycline	16	38 %	3	7	17
Tétracycline	15	73 %	5	6	14
Triméthoprime	22	77 %	66	117	460

N=nombre d'échantillons ; % quantif=fréquence de quantification ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale ; MS=matières sèches - (Tamtam 2008 ; Coetsier *et al.* 2009 ; Mullot 2009 ; Capdeville 2011 ; Loos *et al.* 2012 ; Oberlé 2012 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Pasquini *et al.* 2013 ; Petit *et al.* 2014 ; Chiffre *et al.* 2016 ; Perrodin *et al.* 2016 ; SIPIBEL 2019). Les analyses ont été réalisées sur les échantillons filtrés.

6.1.2.1.2.1 Impact du traitement des eaux usées traitées urbaines sur les concentrations en antibiotiques

Les premières étapes de traitement (dégrillage, dessablage, déshuilage) ne réduisent pas significativement les concentrations en ATB, alors que les traitements secondaires conduisent à des éliminations plus significatives.

Malgré des progrès majeurs, les systèmes de traitement biologique des eaux usées ne sont que modérément efficaces (48 à 77 %) pour l'élimination des ATB. La sorption et la biodégradation sont les deux principales voies d'élimination des ATB au cours des processus de traitement biologique des eaux usées avec des efficacités variables en fonction des ATB. Par exemple, la sorption est la principale voie d'élimination des fluoroquinolones et des macrolides, alors que la biodégradation est la principale voie d'élimination des sulfamides (Oberoi *et al.* 2019). L'élimination est dépendante du temps de séjour dans les bassins par rapport à la cinétique de sorption ou de dégradation des composés. En conséquence, de plus en plus de STEU mettent en place ou réalisent des études pilotes mettant en œuvre des traitements tertiaires pour améliorer leurs rendements d'élimination des résidus de médicaments mais aussi des perturbateurs endocriniens et des produits phytosanitaires (Syntheau 2017). Notamment, plusieurs STEU se sont dotées de procédés d'affinage par charbon actif en poudre ou micro-grains permettant généralement d'obtenir de bons rendements d'élimination mais générant des déchets (charbons contaminés) à traiter ou à régénérer (exemple de réalisation à STEU de Kerran - Morbihan).

Les procédés d'oxydation à base d'ozone permettent une dégradation des composés mais peuvent conduire à la formation de produits de transformation (Stalder *et al.* 2012). De manière générale, les

usines bénéficiant des procédés de traitement tertiaire les plus avancés (ozonation, charbon actif, ultrafiltration, *etc.*) sont les plus efficaces dans l'élimination des résidus de médicaments dans l'eau traitée dont les ATB (taux d'élimination de 97 % à 100 %) (Angeles *et al.* 2020). Ces installations demeurent encore rares en France, toutefois certaines STEU comme celles de Sophia-Antipolis (~50 000 EH - Alpes-Maritimes) et de Saint-Pourçain-sur Sioule (~10 000 EH - Allier) ont mis en place l'ozonation dans leur filière de traitement afin de protéger le milieu récepteurs vis-à-vis des micropolluants.

6.1.2.1.2.2 Impact des eaux usées d'activités de soins sur les concentrations en antibiotiques dans les eaux usées traitées urbaines

Des travaux réalisés sur le traitement séparé des eaux usées brutes composant les eaux usées urbaines ont mis en évidence des concentrations jusqu'à vingt fois supérieures dans les eaux usées hospitalières traitées par rapport à celles des eaux usées domestiques traitées (Chonova *et al.* 2016 ; Wiest *et al.* 2018). Ainsi, la proportion d'eaux usées hospitalières collectées a une incidence directe sur les concentrations en ATB rejetés par les STEU.

À titre d'exemple, les rejets issus du centre hospitalier Alpes-Léman (700 lits) (programme SIPIBEL) représentent 120 $m^3.j^{-1}$ contre 4 000 $m^3.j^{-1}$ (soit 200 fois le débit de l'hôpital) pour les rejets d'assainissement domestiques arrivant dans la même STEU (Graie 2013). Bien que les flux d'eaux usées hospitalières soient généralement faibles en comparaison des flux d'eaux usées urbaines (Mullot 2009), le projet européen PILLS (2007-2012) a mis en évidence que les flux d'ATB apportés par les hôpitaux peuvent être conséquents, tout en étant fortement variables d'une molécule à l'autre (ex : amoxicilline de 0 à 40 %, ciprofloxacine de 12 à 100 %) (Pills 2012). Des conclusions similaires ont aussi été décrites par Dinh *et al.* (2017c) en étudiant les ATB présents dans les effluents de deux STEU, l'une traitant des eaux usées hospitalières et urbaines, l'autre ne traitant que des eaux usées urbaines. Leurs conclusions font état d'une plus grande diversité d'ATB et de concentrations plus élevées dans les eaux usées traitées de la STEU traitant des eaux usées hospitalières. Dinh *et al.* (2017b) montrent également une contribution significative des eaux usées hospitalières à la contamination totale de l'eau usée traitée de la STEU de Fontenay-lès-Briis, en Essonne. Le nombre d'établissements médico-sociaux, d'unités de soins de longue durée et d'EHPAD influence aussi probablement la quantité d'ATB arrivant (et sortant) de la STEU. Cependant, il y a encore peu d'études qui ont évalué la contribution de ce type d'établissement.

6.1.2.1.3 Eaux usées d'abattoirs

À notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur la contamination des eaux usées d'abattoirs par les ATB. Toutefois, ces eaux usées seraient *a priori* une source négligeable de contamination par les ATB (voir § 5.1.1.1.2.3).

6.1.2.2 Eaux en sortie de pisciculture d'eau douce

Une enquête conduite en 2014-2015 sur 100 pisciculture représentatives des élevages piscicoles d'eau douce en France métropolitaine a décrit qu'au cours de l'année 2013, 59 % des éleveurs ont eu recours à des ATB en tant que spécialités vétérinaires, et 5 % à des ATB à la fois en tant que spécialités vétérinaires et en tant qu'aliment médicamenteux. La majorité de ces élevages a utilisé du florfénicol (83 %), 29 % des sulfamides, 18 % de la fluméquine et 12 % de l'oxytétracycline. Moins de 10 % a eu recours à une autre molécule ATB (acide oxolinique, amoxicilline, *etc.*) (Le Bouquin *et al.* 2018).

À notre connaissance, aucune étude disponible ne caractérise la contamination des eaux et rejets d'aquaculture par les ATB en France. Seuls Gordon *et al.* (2007) ont étudié l'impact des pisciculture sur la concentration en ATB (oxytétracycline, florfénicol et acide oxolinique) dans des sédiments en aval de pisciculture (voir § 6.1.3.2.1.2).

6.1.2.3 Produits résiduaires organiques

Les PRO constituent une matrice très hétérogène du fait des sources de PRO, des modalités de collecte et de stockage et des éventuels traitements appliqués. De plus, les modalités d'échantillonnage ont un fort impact sur les résultats (voir § 5.2.1.4). Enfin, la majorité des résultats sont exprimés en grammes de matière sèche (MS), ce qui ne permet pas de prendre en compte la teneur en eau initiale de l'échantillon qui peut être très variable d'un type de PRO à l'autre. Ainsi, les données ne sont pas forcément comparables d'une étude à l'autre.

6.1.2.3.1 Produits résiduaires organiques d'origine humaine

Des analyses d'ATB sont disponibles pour 114 échantillons de boues de STEU, dont cinq ont fait l'objet d'un traitement supplémentaire par compostage. Quarante-quatre ATB ont été analysés (tableau XXXII, annexe 5). Le tableau XI présente les concentrations dans les PRO d'origine humaine des 15 ATB quantifiés le plus grand nombre de fois dans les sources de contamination d'origine humaine en France.

Trente ATB n'ont jamais été quantifiés dans les PRO d'origine humaine. Les six ATB les plus fréquemment quantifiés (entre 38 % et 91 %) sont des quinolones ou des fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine, norfloxacine, fluméquine, énoxacine, acide pipémidique).

L'ofloxacine, la ciprofloxacine et la norfloxacine sont les trois ATB les plus présents dans les échantillons de boues de STEU : ils sont quantifiés dans plus de 87 % des échantillons et présentent des concentrations médianes comprises entre 2 600 ng.g^{-1} et 3 000 ng.g MS^{-1}. Pour ces trois ATB, les concentrations maximales sont comprises entre 50 315 ng.g MS^{-1} pour la norfloxacine et 232 000 ng.g MS^{-1} pour l'ofloxacine.

Pour les autres ATB, les fréquences de quantification sont inférieures ou égales à 40 %, les concentrations médianes inférieures à 62 ng.g MS^{-1} et les concentrations maximales inférieures à 5 000 ng.g MS^{-1}.

Bourdat-Deschamps *et al.* (2017) ont étudié les concentrations en ATB dans quatre échantillons de biodéchets compostés. Sur les huit ATB analysés (tableau XXXII, annexe 5), seule l'ofloxacine a été quantifiée. Pour cet ATB, la fréquence de quantification est de 75 %, la concentration médiane de 29 ng.g^{-1} et la concentration maximale de 59 ng.g^{-1}.

Tableau XI. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles dans les produits résiduaires organiques d'origine humaine pour les 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois dans les sources de contamination d'origine humaine en France. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5.

ATB	PRO - Boues de STEU[a] en ng.g MS^{-1}					PRO - Déchets compostés[b] en ng.g MS^{-1}				
	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}
Ciprofloxacine	97	91 %	2 786	7 318	82 439	4	0 %	-	-	-
Norfloxacine	79	87 %	3 000	4 090	50 315	4	0 %	-	-	-
Ofloxacine	87	91 %	2 637	7 479	232 016	4	75 %	-	-	59
Vancomycine	5	0 %	3	3	-	0	-	-	-	-
Azithromycine	54	30 %	1	77	886	0	-	-	-	-
Clarithromycine	7	0 %	4	5	-	0	-	-	-	-
Érythromycine	19	0 %	14	20	-	0	-	-	-	-
Roxithromycine	15	0 %	5	7	-	0	-	-	-	-
Spiramycine	15	13 %	62	205	1 200	0	-	-	-	-
Fluméquine	13	38 %	25	53	410	0	-	-	-	-
Sulfaméthoxazole	94	17 %	1	11	388	4	0 %	-	-	-
Sulfapyridine	7	0 %	4	7	-	0	-	-	-	-
Doxycycline	16	6 %	67	68	33	4	0 %	-	-	-
Tétracycline	25	20 %	20	238	4 598	0	-	-	-	-
Triméthoprime	20	35 %	5	7	40	0	-	-	-	-

N=nombre d'échantillons ; % quantif=fréquence de quantification ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale ; MS=matières sèches - [a] (Algros et Jourdain 2007 ; Dinh 2012 ; Pasquini *et al.* 2013 ; Peysson et Vulliet 2013 ; Salvia, Fieu et Vulliet 2015 ; Bourdat-Deschamps *et al*. 2017 ; Mailler *et al*. 2017 ; SIPIBEL 2019) - [b] (Bourdat-Deschamps *et al.* 2017).

6.1.2.3.2 Produits résiduaires organiques d'origine animale

Après traitement aux ATB, les concentrations en ATB dans les déjections animales, et donc dans les PRO, dépendent du métabolisme animal, de la durée du traitement et de la voie d'administration. À l'hétérogénéité inhérente à cette matrice s'ajoutent, pour les PRO d'origine animale, les spécificités dues aux types d'élevage (usages d'ATB, types de PRO produits) et le délai entre l'administration d'ATB et l'échantillonnage.

Des ATB ont été analysés dans 39 PRO d'origine animale en France dont :

- 30 PRO solides qui incluent des fumiers et des litières (volailles) et des phases solides de lisiers de porcs. Ces PRO ont pu être stockés plus ou moins longtemps avant échantillonnage, toutefois, cette information n'est pas toujours disponible dans les publications. Certains de ces PRO ont été traités par compostage.
- 9 PRO liquides qui incluent des lisiers de porcs, des phases liquides de lisiers de porcs et des effluents liquides d'élevage. Ces PRO n'ont pas été traités avant échantillonnage, en revanche, ils ont pu être stockés plus ou moins longtemps. Cette dernière information n'est pas toujours disponible.

Les caractéristiques de ces deux types de PRO sont donc très variables. De plus, les limites de quantification sont également très variables d'une étude à l'autre. Par conséquent, les données présentées sont difficilement comparables entre elles et ne peuvent être extrapolées à l'ensemble des PRO d'origine animale en France.

Sur les 32 ATB analysés dans les PRO d'origine animale, 15 n'ont jamais été quantifiés (tableau XXXIII, annexe 5). Aucun ATB de la classe des phénicolés, des β-lactamines ou des lincosamides n'a été quantifié dans les PRO d'origine animale. Les sulfamides ne sont que peu quantifiés puisque, sur les six sulfamides analysés, seule la sulfaméthazine a été quantifiée dans 23 % des échantillons.

Le tableau XII présente les concentrations en ATB quantifiés plus d'une fois plus d'une fois dans des PRO d'élevage en France.

Tableau XII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles pour les 11 antibiotiques quantifiés plus d'une fois dans les produits résiduaires organiques d'élevage en France. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5.

ATB	PRO d'élevage solides[a] en ng.g MS^{-1}					PRO d'élevage liquides[b] en ng.L^{-1}				
	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}
Ciprofloxacine	16	44 %	15	241	2 200	5	0 %	0	6	-
Enrofloxacine	18	39 %	25	704	9 700	5	20 %	25	24	1
Norfloxacine	11	9 %	30	64	289	5	20 %	2	24	2
Ofloxacine	11	27 %	15	42	347	4	0 %	-	-	-
Spiramycine	11	27 %	100	65	8	3	0 %	-	-	-
Fluméquine	7	0 %	10	10	-	4	50 %	-	-	1 515
Sulfaméthazine	23	17 %	3	71	730	8	38 %	4	577	4 590
Doxycycline	18	17 %	10	11 898	186 686	7	71 %	134	505	2 596
Oxytétracycline	11	27 %	100	209	1 610	3	33 %	-	-	20 400
Tétracycline	12	17 %	20	1 291	15 192	3	33 %	-	-	190
Triméthoprime	18	17 %	6	6	17	4	0 %	-	-	-

N=nombre d'échantillons ; % quantif=fréquence de quantification ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale ; MS=matières sèches - [a] (Algros et Jourdain 2007 ; Moraru *et al.* 2012 ; Simonet et Gardeur-Algros 2012 ; Pourcher *et al.* 2014 ; Bourdat-Deschamps *et al.* 2017 ; Nazaret 2020a, 2020b) - [b] (Algros et Jourdain 2007 ; Tamtam *et al.* 2009a ; Simonet et Gardeur-Algros 2012 ; Bourdat-Deschamps *et al.* 2017).

Avec une fréquence de quantification de 44 %, la ciprofloxacine est l'ATB le plus fréquemment quantifié dans les PRO d'élevage solides. Les autres ATB ont été quantifiés au maximum dans 33 % des échantillons dans lesquels ils ont été analysés. Les concentrations en ATB dans les PRO d'élevage solides peuvent ponctuellement atteindre des concentrations élevées : cinq ATB (trois tétracyclines et deux fluoroquinolones) présentent des concentrations maximales supérieures à 1 000 ng.g MS^{-1}, avec un maximum de 186 686 ng.g MS^{-1} mesuré pour la doxycycline.

Trois ATB ont été quantifiés dans plus d'un échantillon de PRO d'élevage liquide : la doxycycline, la sulfaméthazine et la fluméquine. Les concentrations en ATB dans les PRO d'élevage liquides peuvent ponctuellement atteindre des concentrations élevées : quatre ATB (deux tétracyclines, une quinolone et un sulfamide) présentent des concentrations maximales supérieures à 1 500 ng.L^{-1}, avec un maximum de 20 400 ng.L^{-1} mesuré pour l'oxytétracycline.

6.1.2.3.3 Impact du traitement des produits résiduaires organiques sur les concentrations en antibiotiques

Avant leur épandage sur des sols agricoles, les PRO font généralement l'objet de traitements ou de conditions particulières de stockage qui peuvent avoir une incidence sur leur concentration résiduelle en ATB. Ainsi, les procédés de traitements thermophiles comme le compostage sont plus efficaces sur la réduction des concentrations en ATB que la méthanisation mésophile ou le simple stockage à température ambiante (Zhang *et al.* 2019). De même, les traitements aérobies ou anaérobies n'ont

pas les mêmes incidences sur la réduction des concentrations en ATB (Youngquist, Mitchell et Cogger 2016).

Une étude espagnole menée sur un digesteur anaérobie mésophile alimenté par des fumiers porcins et des déchets d'abattoirs a montré des taux d'élimination de 42 % à 94 % en toutes saisons pour des macrolides (tilmicosine et tylosine) (Gros *et al.* 2019). En revanche, la réduction est apparue faible voire nulle pour les fluoroquinolones et les tétracyclines à l'exception de la marbofloxacine (72 % - 96 %) et de la chlortétracycline (57 % - 68 %). La nature du PRO (fumier ou lisier) apparaît également comme un facteur important puisque les effluents solides sont en général stockés en tas ou compostés alors que les effluents liquides sont stockés en fosse à température ambiante ou traités par méthanisation mésophile. Ainsi, la persistance des résidus d'ATB pourrait être plus longue dans les effluents liquides par rapport aux effluents solides. En revanche, la durée du traitement des PRO n'a pas un impact aussi clair que celui de la température.

6.1.3 Compartiments récepteurs de l'environnement

6.1.3.1 Caractéristiques des données disponibles

6.1.3.1.1 Répartition géographique des données disponibles

Les données de l'Ansm soulignent que la consommation d'ATB en France présente des disparités régionales (voir § 2.3.1.1). Ces différences territoriales s'expliquent par des recours différenciés au système de soins et des niveaux de consommation d'ATB différents. De même, la consommation d'ATB vétérinaires répond aux singularités des systèmes agricoles régionaux et à leur évolution. En conséquence, la quantité potentielle d'ATB « disséminés » dans l'environnement diffère d'une région à l'autre. Par ailleurs, des disparités existent également entre les collectivités urbaines dans leur capacité de collecte et de traitement des eaux usées.

Les disparités géographiques concernent également les variables climatiques, paysagères et hydrologiques. Ainsi, les capacités de dilution des milieux aquatiques dépendent directement des régimes hydrologiques et par conséquent des débits au cours de l'année, de leur mode d'alimentation, c'est-à-dire la nature et l'origine des hautes eaux (pluviale, nivale ou glaciaire).

Ainsi, les données obtenues sur une zone donnée ne peuvent être extrapolées à l'ensemble du territoire français. Or, l'analyse d'ATB dans les compartiments environnementaux n'a pas été menée de manière homogène sur l'ensemble du territoire français (figure 17).

Une majorité de données produites par les équipes de recherche provient du bassin hydrographique Loire-Bretagne (48 % des échantillons). Aucune donnée exploitable n'a été recensée pour le bassin Artois-Picardie. Pour les départements et régions d'outre-mer (DROM), seuls deux échantillons de sol provenant de la Réunion ont été analysés.

Pour les données recensées dans le SIE, les molécules règlementées (voir § 5.1.2.1.4) sont analysées de manière homogène sur le territoire, y compris dans les DROM. Toutefois, les données relatives aux molécules non réglementées sont plus localisées car acquises dans le cadre d'activités prospectives. Ainsi, la tylosine et la lincomycine n'ont été analysées qu'en Artois-Picardie et la sulfaquinoxaline, le sulfathiazone et la fluméquine n'ont été analysés qu'en Rhône-Méditerranée-Corse.

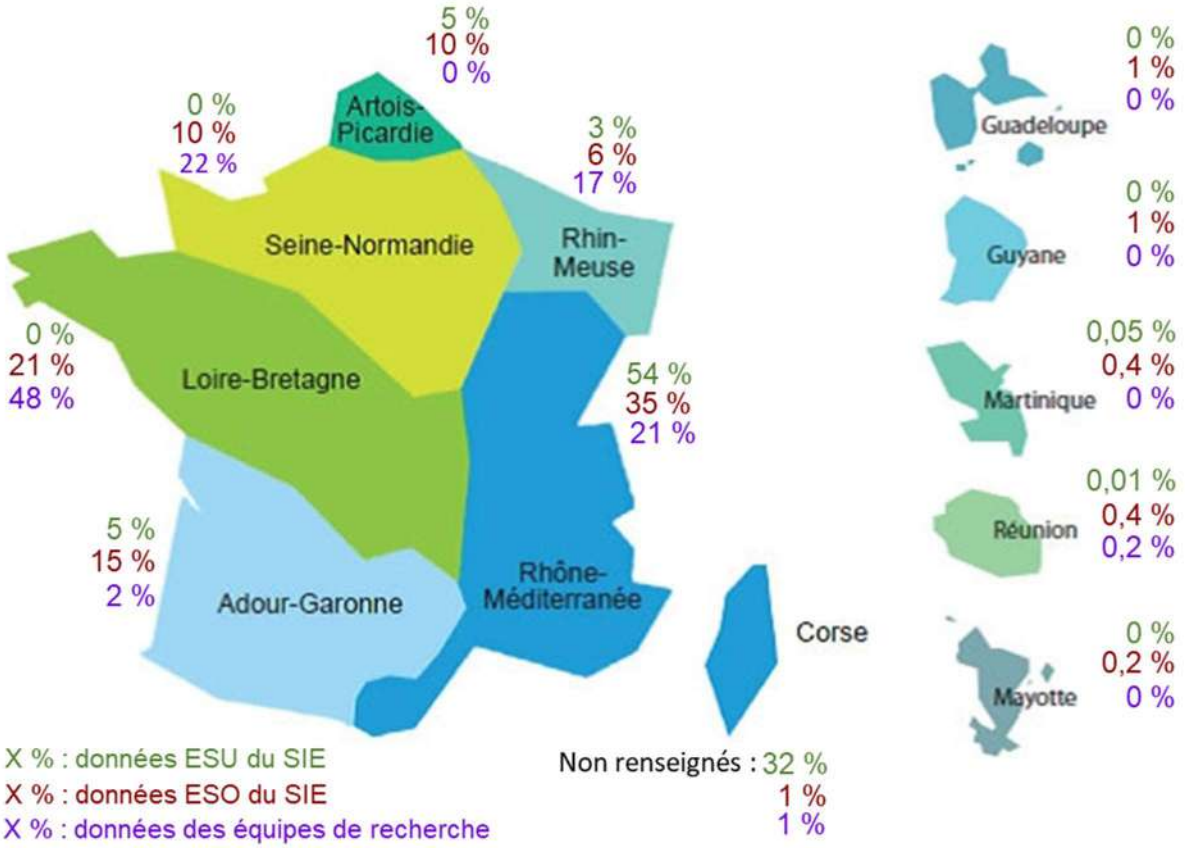


Figure 17. Répartition des échantillons par grands bassins hydrographiques : pour les données produites par les équipes de recherche (en violet), pour les données relatives aux eaux de surface (ESU) du SIE (en vert) et pour les données relatives aux eaux souterraines (ESO) du SIE (en marron).

6.1.3.1.2 Données produites par les équipes de recherche

Le tableau XIII présente les concentrations des 15 ATB quantifiés dans le plus grand nombre d'échantillons rentrant dans le cadre de projets de recherche, en France, tous compartiments récepteurs confondus. La synthèse de l'ensemble des concentrations en ATB mesurées dans ces compartiments environnementaux est présentée dans le tableau XXXIV de l'annexe 5.

Dans les programmes de recherche, la stratégie d'échantillonnage est souvent orientée en fonction d'une/des sources d'ATB vers les milieux récepteurs : rejets de STEU, élevages, *etc*. De fait, les résultats ont tendance à présenter un effet « pire scénario », avec des concentrations maximisées.

Le nombre d'analyses est très variable en fonction des ATB : le sulfaméthoxazole et le triméthoprime sont les ATB les plus analysés au total (respectivement 584 et 559 analyses). Parmi les treize ATB analysés plus de 200 fois, six sont des quinolones (fluméquine et acide oxolinique) ou fluoroquinolones (ciprofloxacine, enrofloxacine, ofloxacine et norfloxacine), deux des sulfamides (sulfaméthoxazole et sulfaméthazine) et deux des macrolides (érythromycine et tylosine), les trois autres étant le triméthoprime, l'oxytétracycline et l'amoxicilline.

À l'exception de l'amoxicilline, les β-lactamines (pénicillines, céphalosporines, monobactames et carbapénèmes), bien que constituant la classe d'ATB la plus consommée, ne sont que rarement quantifiées dans l'environnement avec au maximum trois quantifications pour l'ampicilline (fréquence de quantification < 2 %). Onze des 16 β-lactamines ne sont jamais quantifiées. Ces résultats s'expliquent par la dégradation rapide de ces ATB dans l'environnement (voir § 6.2.1.2) et/ou des difficultés analytiques (voir § 5.2.2.2).

6.1.3.1.3 Données du système d'information sur l'eau (SIE)

Le tableau XIV présente les concentrations des 15 ATB quantifiés dans le plus grand nombre d'échantillons pour les données du SIE, en France, dans les phases dissoutes des eaux de surface continentales et des eaux souterraines. La synthèse de l'ensemble des concentrations en ATB mesurées dans ces compartiments environnementaux pour les données du SIE est présentée dans le tableau XXXV de l'annexe 5.

Dans le cadre de la surveillance réglementaire, les stations de mesures sont représentatives du territoire national et donc de l'hétérogénéité des masses d'eau et des pressions anthropiques. Cette plus grande représentativité donne une image plus réaliste à l'échelle nationale des niveaux moyens de contamination en ATB, mais ne met pas en évidence les situations « pire scénario ».

Ces données sont généralement obtenues par des laboratoires privés dans le cadre de marchés publics avec des critères analytiques plus contraignants (performances et validations de méthode, accréditation, *etc.*). De ce fait, les limites de quantification des molécules sont généralement plus élevées que dans les travaux de recherche.

Le nombre d'analyses par ATB est au minimum de 1 000 pour la dihydrostreptomycine, la sulfadiméthoxine et l'acide oxolinique. Cinq ATB ont été analysés dans plus de 13 000 échantillons : le sulfaméthoxazole, l'ofloxacine, l'érythromycine, la ciprofloxacine et la clarithromycine. Ainsi, le nombre d'analyses par ATB dans le SIE est nettement supérieur à celui des équipes de recherche.

Sur les 34 ATB analysés, huit n'ont jamais été quantifiés.

Tableau XIII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles mesurées dans les compartiments récepteurs en France des 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5.

ATB	ESU															ESO (phase dissoute)[d] en ng.L^{-1}					Sols et sols amendés[e] en ng.g MS^{-1}				
	Phase dissoute[a] en ng.L^{-1}					Sédiments[b] en ng.g MS^{-1}					Périphytons[c] en ng.g MS^{-1}														
	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif	Méd	Moy	C_{Max}
Métronidazole	64	38 %	1	3	26	0	-	-	-	-	12	0 %	0,2	0,2	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Ciprofloxacine	175	10 %	1	5	135	25	32 %	0,2	11	143	20	85 %	7	10	31	53	4 %	0,4	8	66	51	10 %	1	3	36
Enoxacine	11	0 %	4	6	-	25	52 %	1	2	5	20	80 %	1	5	33	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Norfloxacine	86	21 %	1	6	75	25	32 %	0,2	11	101	20	60 %	2	5	29	0	-	-	-	-	74	9 %	2	4	17
Ofloxacine	126	39 %	1	6	231	25	48 %	0,04	26	181	20	45 %	0,2	18	99	3	0 %	-	-	-	51	20 %	1	2	9
Lincomycine	135	16 %	3	8	373	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	21	0 %	3	3	-	0	-	-	-	-
Clarithromycine	140	53 %	3	9	131	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0 %	-	-	-	0	-	-	-	-
Érythromycine	252	30 %	6	8	128	25	24 %	0,3	1	5	20	30 %	4	10	41	21	10 %	2	4	6	22	23 %	0,1	0,1	0,1
Roxithromycine	79	37 %	0,4	3	24	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0 %	5	4	-	5	0 %	0,02	0,02	-
Amoxicilline	147	1 %	6	17	235	25	32 %	0,2	3	3	20	60 %	2	2	4	11	0 %	6	10	-	0	-	-	-	-
Acide oxolinique	172	7 %	6	5	28	68	38 %	2	16	231	20	55 %	1	2	11	21	5 %	2	4	11	28	29 %	0,2	2	19
Fluméquine	238	17 %	3	4	143	68	46 %	2	39	600	20	55 %	1	6	31	21	0 %	2	2	-	45	18 %	1	1	7
Sulfaméthazine	169	12 %	3	5	181	4	0 %	-	-	-	0	-	-	-	-	21	5 %	1	2	16	44	2 %	0,4	0,3	0,02
Sulfaméthoxazole	331	60 %	3	13	1 435	25	12 %	0,2	0,4	1	32	47 %	0,4	3	20	129	51 %	3	5	25	67	1 %	0,4	0,4	3
Triméthoprime	359	21 %	3	7	468	25	44 %	0,05	3	30	32	38 %	0,3	2	10	97	0 %	7	5	-	46	2 %	0,2	0,1	0,04

ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; % quantif=fréquence de quantification ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale mesurée ; MS=matières sèches - [a] (Tamtam 2008 ; Coetsier *et al.* 2009 ; Strub 2009 ; Tamtam *et al.* 2009a ; Tamtam *et al.* 2009b ; Bruchet *et al.* 2011 ; Capdeville 2011 ; Dinh *et al.* 2011 ; Joigneaux 2011 ; Mompelat, Thomas et Le Bot 2011 ; Vulliet, Cren-Olivé et Grenier-Loustalot 2011 ; Dinh 2012 ; Oberlé 2012 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Garcia-Armisen *et al.* 2013 ; Perrodin *et al.* 2013 ; Petit *et al.* 2014 ; Camilleri *et al.* 2015 ; Guillon *et al.* 2015 ; Chiffre *et al.* 2016 ; Lardy-Fontan *et al.* 2016 ; Dinh *et al.* 2017a ; Jaffrezic *et al.* 2017 ; Togola 2018 ; Charuaud *et al.* 2019 ; SIPIBEL 2019) ; [b] (Gordon *et al.* 2007 ; Dinh 2012 ; Dinh *et al.* 2017c ; Petit 2020) ; [c] (Aubertheau *et al.* 2017 ; Petit 2020) ; [d] (Capdeville 2011 ; Joigneaux 2011 ; Guillon *et al.* 2015 ; Charuaud *et al.* 2019 ; SIPIBEL 2019) ; [e] (Tamtam *et al.* 2011b ; Salvia *et al.* 2012 ; Salvia, Fieu et Vulliet 2015 ; Bourdat-Deschamps *et al.* 2017 ; Dinh *et al.* 2017c ; Nazaret 2020a, 2020b).

Tableau XIV. Synthèse, réalisée à partir des données du système d'information sur l'eau, des concentrations individuelles mesurées dans les compartiments récepteurs en France des 15 antibiotiques quantifiés le plus grand nombre de fois. Le détail pour tous les antibiotiques est donné dans l'annexe 5.

ATB	ESU en ng.L^{-1}					ESO en ng.L^{-1}				
	N	% quantif	Méd	Moy	C_{MAX}	N	% quantif	Méd	Moy	C_{MAX}
Ciprofloxacine	10 808	1 %	10	26	274	4 175	0,2 %	10	13	43
Ofloxacine	14 778	4 %	10	12	8 700	5 066	0,4 %	10	10	204
Clindamycine	3 763	4 %	3	13	90	1 244	0 %	3	3	-
Clarithromycine	10 817	18 %	3	6	497	2 850	0,2 %	3	6	42
14-hydroxy-clarithromycine	712	5 %	3	3	43	1 804	0 %	25	15	-
Érythromycine	10 952	8 %	3	197	2 251	4 401	1 %	3	72	1 872
Amoxicilline	1 356	3 %	26	63	464	2 398	0 %	50	45	-
Florfénicol	3 622	0,2 %	50	51	334	1 074	0 %	50	237	-
Acide oxolinique	0	-	-	-	-	1 073	0,7 %	3	3	539
Sulfadiazine	0	-	-	-	-	1 153	0,4 %	3	3	25
Sulfaméthazine	2 211	2 %	3	3	162	2 517	0,2 %	3	2	11
Sulfaméthoxazole	16 385	27 %	10	13	4 110	5 154	3 %	3	31	333
Doxycycline	3 763	2 %	3	8	73	2 420	0,2 %	3	4	74
Oxytétracycline	3 623	1 %	3	3	222	1 873	0 %	3	3	-
Triméthoprime	4 668	5 %	3	4	127	2 999	0,2 %	3	3	186

ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; % quantif=fréquence de quantification ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale.

Source : Naiades 2019 et Ades 2019 ; Traitement Anses

6.1.3.2 Milieux aquatiques

6.1.3.2.1 Eaux de surface continentale

6.1.3.2.1.1 Phase dissoute

- **Données produites par des équipes de recherche**

Sur les 71 ATB analysés dans la phase dissoute des eaux de surface, 32 n'ont jamais été quantifiés (tableau XXXIV, annexe 5).

Le triméthoprime, le sulfaméthoxazole et l'érythromycine sont les trois ATB analysés et quantifiés dans le plus grand nombre d'échantillons de la phase dissoute des eaux de surface. Ils présentent des fréquences de quantification respectivement de 21 % (75 quantifications / 359 analyses), 60 % (199 / 331) et 30 % (76 / 252) (tableau XIII).

Trois ATB ont été quantifiés dans plus de 50 % des échantillons : la sulfapyridine (69 %, N=29), le sulfaméthoxazole (60 %, N=331) et la clarithromycine (53 %, N=140).

Pour l'ensemble des ATB quantifiés, les concentrations médianes dans la phase dissoute des eaux de surface sont toujours inférieures à 12 $ng.L^{-1}$ et les concentrations moyennes à 26 $ng.L^{-1}$. Les concentrations maximales mesurées dépassent 100 $ng.L^{-1}$ pour 16 ATB, et dépassent 1 000 $ng.L^{-1}$ pour la sulfadiazine et le sulfaméthoxazole (tableau XXXIV, annexe 5). De nombreuses études confirment un apport important d'ATB dans les milieux aquatiques *via* le rejet d'eaux usées urbaines traitées de STEU (Tamtam *et al.* 2008 ; Coetsier *et al.* 2009 ; Feitosa-Felizzola et Chiron 2009 ; Tamtam *et al.* 2009a ; Capdeville 2011 ; Joigneaux 2011 ; Garcia-Armisen *et al.* 2013 ; Camilleri *et al.* 2015 ; Dinh *et al.* 2017c ; Jaffrezic *et al.* 2017 ; Azimi *et al.* 2018 ; Chonova *et al.* 2018 ; Guibal *et al.* 2018). Les concentrations mesurées en aval des rejets de STEU sont généralement plus élevées qu'en amont, mais inférieures à celles retrouvées dans les eaux usées traitées.

- **Données du système d'information sur l'eau**

Sur les 27 ATB analysés dans les eaux de surface, 10 n'ont jamais été quantifiés et 7 ont été quantifiés dans moins de 1 % des échantillons (tableau XXXV, annexe 5).

Les ATB les plus fréquemment analysés sont le sulfaméthoxazole, l'ofloxacine, l'érythromycine, la clarithromycine et la ciprofloxacine, avec tous plus de 10 000 analyses.

Le sulfaméthoxazole est l'ATB le plus quantifié, suivi de la clarithromycine avec des fréquences de quantification respectives de 27 % et 18 % (tableau XIX). Les fréquences de quantification des données du SIE sont inférieures à celles produites par les équipes de recherche, en raison d'une part des limites de quantification plus élevées et d'autre part d'une stratégie d'échantillonnage plus représentative du territoire français.

Les concentrations médianes sont toutes inférieures ou égales à 50 $ng.L^{-1}$ et les moyennes à 63 $ng.L^{-1}$, sauf pour l'azithromycine et l'érythromycine, avec respectivement 176 $ng.L^{-1}$ et 197 $ng.L^{-1}$. Des concentrations maximales supérieures à 1 000 $ng.L^{-1}$ ont été mesurées pour l'érythromycine (2 251 $ng.L^{-1}$), le sulfaméthoxazole (4 110 $ng.L^{-1}$) et l'ofloxacine (8 700 $ng.L^{-1}$). Ces données sont concordantes avec celles produites par les équipes de recherche.

6.1.3.2.1.2 Sédiments

Vingt-six ATB ont été analysés dans des sédiments en France, dont 11 n'ont jamais été quantifiés (tableau XXXIV, annexe 5). Parmi les 26 ATB analysés, 12 sont des quinolones ou fluoroquinolones. L'acide oxolinique et la fluméquine sont d'ailleurs les deux seuls ATB analysés dans l'ensemble des études recensées (68 analyses chacun).

Les ATB les plus quantifiés dans les sédiments sont des quinolones ou fluoroquinolones (fluméquine, acide oxolinique, énoxacine, ofloxacine, norfloxacine et ciprofloxacine), le triméthoprime et l'amoxicilline. Ces huit ATB sont quantifiés avec une fréquence de

quantification comprise entre 32 % pour la ciprofloxacine, l'amoxicilline et la norfloxacine et 52 % pour l'énoxacine.

Pour les ATB quantifiés, les concentrations médianes sont toujours inférieures à 2 ng.g MS^{-1} et les concentrations moyennes à 39 ng.g MS^{-1}. Les concentrations maximales mesurées pour cette matrice dépassent 100 ng.g MS^{-1} pour cinq ATB qui sont tous des quinolones ou fluoroquinolones (fluméquine, acide oxolinique, ofloxacine, ciprofloxacine et norfloxacine), avec un maximum de 600 ng.g MS^{-1} pour la fluméquine.

Les concentrations mesurées dans les sédiments sont plus élevées à l'aval direct des sources de contamination comme les rejets de STEU (Dinh 2012 ; Dinh *et al.* 2017b ; Dinh *et al.* 2017c ; Vivant *et al.* 2019) ou les pisciculture (Gordon *et al.* 2007). Toutefois, les sédiments prélevés en amont de rejets n'étaient pas exempts d'ATB (Gordon *et al.* 2007 ; Dinh *et al.* 2017c).

Par ailleurs, deux études réalisées respectivement dans les environs d'Orléans et dans la Seine se sont intéressées à la présence d'ATB dans des carottes de sédiments et ont permis de mettre en évidence une évolution temporelle des concentrations en ATB dans les couches de sédiments (Tamtam *et al.* 2011a ; Thiebault *et al.* 2017). Ces études montrent que les concentrations en ATB sont du même ordre de grandeur (autour d'une dizaine de $ng.g^{-1}$) pour l'ensemble des composés analysés (fluoroquinolones, quinolones, sulfamide et diaminopyrimidine). Des résultats similaires ont aussi été observés sur des carottes sédimentaires prélevées dans la Loire dans le cadre du projet Metorg 2 (2012).

6.1.3.2.1.3 Périphytons

Deux études ont porté sur la contamination de périphytons prélevés dans des eaux de surface par des ATB (Aubertheau *et al.* 2017 ; Vivant *et al.* 2019). Parmi les 13 ATB analysés, sept sont des quinolones ou fluoroquinolones. À l'exception du métronidazole, ils ont tous été quantifiés au moins une fois dans les périphytons.

Les fréquences de quantification sont supérieures à 50 % pour six ATB (ciprofloxacine, énoxacine, norfloxacine, fluméquine, acide oxolinique et amoxicilline) et atteignent 85 % pour la ciprofloxacine.

Les concentrations médianes sont toutes inférieures à 7 ng.g MS^{-1} (correspondant à la ciprofloxacine) et les concentrations moyennes à 18 ng.g MS^{-1} (correspondant à l'ofloxacine). Ponctuellement, des concentrations maximales de l'ordre de la centaine de $ng.g^{-1}$ ont été mesurées pour la tétracycline et pour l'ofloxacine.

Aubertheau *et al.* (2017) ont montré que la contamination des périphytons était dépendante de la distance aux rejets de la STEU, qu'il s'agisse du nombre d'ATB présents dans le périphyton ou des concentrations mesurées.

Vivant *et al.* (2019) ont montré, sur un bassin versant, que les concentrations mesurées dans les périphytons prélevés à proximité d'un rejet de STEU étaient les plus élevées. Les concentrations diminuaient ensuite à l'aval tout en restant supérieures aux concentrations mesurées dans les périphytons en tête de bassin versant. Cette étude a également mis en évidence des variations temporelles dans le type d'ATB et les concentrations mesurées.

6.1.3.2.1.4 Biote aquatique

Les rares données de concentrations en ATB dans le biote aquatique identifiées sont des données agrégées obtenues sur le bassin versant de la Seine (Dinh 2012 ; Vivant *et al.* 2019).

Dinh (2012) a cherché 25 ATB dans des échantillons de gammares et de poissons (Loche franche et Goujon) et a comparés les concentrations mesurées dans le biote à celles mesurées dans les eaux et les sédiments, sur les mêmes sites aux mêmes périodes. Il met en évidence une corrélation entre l'adsorption des ATB dans les sédiments et leur accumulation dans les gammares.

- Six ATB ont été détectés dans les gammares : l'acide nalidixique, la fluméquine, l'ofloxacine, la ciprofloxacine, la norfloxacine et le triméthoprime. L'ofloxacine, la ciprofloxacine et la norfloxacine sont majoritaires avec des concentrations de 20 à

100 ng.g^{-1} ; l'acide nalidixique, la fluméquine et le triméthoprime présentant des valeurs plus faibles de l'ordre de quelques ng.g^{-1}.

- Cinq antibiotiques : l'ofloxacine, la norfloxacine, la ciprofloxacine, la fluméquine et le triméthoprime, ont été détectés dans les poissons entiers à des concentrations de l'ordre de quelques ng.g^{-1} à 32 ng.g^{-1}. Les variations de concentrations en ATB dans les poissons reflètent les variations observées dans les eaux et/ou les sédiments.
- Le sulfaméthoxazole, son métabolite le N-acétyl-sulfaméthoxazole, l'érythromycine et la vancomycine sont des molécules largement présentes dans les eaux mais peu ou pas détectés dans les organismes.

Vivant *et al.* (2019) ont analysé 12 ATB (acide oxolinique, fluméquine, ciprofloxacine, énoxacine, enrofloxacine, norfloxacine, ofloxacine, tétracycline, érythromycine, amoxicilline, sulfaméthoxazole et triméthoprime) dans des échantillons de muscles de poissons. Onze des 12 ATB analysés ont une fréquence de détection inférieure à 4 % et l'énoxacine (quinolone) une fréquence de quantification de 7 %. Les concentrations maximales mesurées atteignent 5,94 ng.g MS^{-1} de muscle pour l'amoxicilline et 3,87 ng.g MS^{-1} pour le sulfaméthoxazole.

6.1.3.2.2 Eaux souterraines

6.1.3.2.2.1 Données produites par les équipes de recherche

Sur les 41 ATB analysés dans les eaux souterraines, 33 n'ont jamais été quantifiés.

Les huit ATB quantifiés au moins une fois comprennent trois sulfamides (sulfaméthoxazole, sulfaméthazine et sulfadiazine), trois quinolones ou fluoroquinolones (ciprofloxacine, marbofloxacine et acide oxolinique) et deux macrolides (érythromycine et tilmicosine).

Avec une fréquence de quantification de 51 %, le sulfaméthoxazole est l'ATB le plus fréquemment quantifié dans les eaux souterraines. Les autres ATB ont été quantifiés au maximum dans deux échantillons (ciprofloxacine, érythromycine, marbofloxacine), ce qui correspond à des fréquences de quantification inférieures à 13 %.

Les concentrations médianes ou moyennes des ATB quantifiés au moins une fois dans les eaux souterraines sont inférieures ou égales à 8 ng.L^{-1} (concentration moyenne pour la ciprofloxacine).

Les concentrations maximales ont été mesurées pour deux fluoroquinolones : la marbofloxacine (67 ng.L^{-1}) et la ciprofloxacine (66 ng.L^{-1}). Les concentrations maximales mesurées pour les autres ATB sont inférieures ou égales à 25 ng.L^{-1} (concentration mesurée pour le sulfaméthoxazole).

D'autres études, dont les concentrations en ATB n'ont pas pu être désagrégées, ont analysé des ATB dans des eaux souterraines en France (Lapworth *et al.* 2015; Lopez *et al.* 2015; Vulliet et Cren-Olive 2011; Vulliet *et al.* 2014).

Les ATB les plus fréquemment quantifiés, lors d'une campagne du BRGM menée sur l'ensemble du territoire métropolitain, sont le sulfaméthoxazole, l'érythromycine et le métronidazole, quantifiés à des concentrations généralement comprises entre < 10 ng.L^{-1} et 30 ng.L^{-1}. Les concentrations d'érythromycine et de métronidazole sont supérieures à 100 ng.L^{-1} dans quelques échantillons (Lopez *et al.* 2015). Le sulfaméthoxazole et le métronidazole font également partie des molécules les plus fréquemment détectées dans les eaux souterraines par Vulliet et Cren-Olive (2011) et Lapworth *et al.* (2015), à des concentrations du même ordre que celles retrouvées par Lopez *et al.* (2015) : entre moins de 10 ng.L^{-1} et 30 ng.L^{-1}.

Une étude réalisée dans les DROM a relevé la présence de sept ATB dont l'ofloxacine, mesurée dans 11 % des échantillons à une concentration médiane d'une vingtaine de ng.L^{-1} et une concentration maximale de 204 ng.L^{-1} (Vulliet *et al.* 2014).

6.1.3.2.2.2 Données du SIE

Sur les 34 ATB analysés dans les eaux souterraines, 16 n'ont jamais été quantifiés. À l'exception du sulfaméthoxazole, quantifié dans 3 % des échantillons, tous les ATB quantifiés, l'ont été dans moins de 1 % des échantillons. Comme pour les eaux de surface, les limites de quantification et la stratégie d'échantillonnage expliquent ces fréquences de quantification inférieures à celles rapportées par les équipes de recherche. Le principe de la surveillance réglementaire étant basé sur une représentativité nationale des stations de mesure (avec et sans pression anthropique), les fréquences de quantification sont inéluctablement plus faibles que lorsque les études sont focalisées sur les points potentiellement impactés.

Les concentrations mesurées sont très faibles puisque les maximales dépassent 100 $ng.L^{-1}$ uniquement pour l'érythromycine (1 872 $ng.L^{-1}$), l'acide oxolinique (539 $ng.L^{-1}$), le sulfaméthoxazole (333 $ng.L^{-1}$), l'ofloxacine (204 $ng.L^{-1}$) et le triméthoprime (186 $ng.L^{-1}$).

6.1.3.3 Sols et sols amendés

La majorité des données de contamination des sols proviennent d'études sur l'impact des amendements par des PRO. À l'instar des PRO, les sols sont des matrices très hétérogènes, tant par la nature des sols que par la fréquence, l'ancienneté et le type des amendements qui sont effectués. L'historique des amendements n'est pas toujours documenté dans les études. Par conséquent, les données disponibles ne sont représentatives que du sol étudié au moment de l'échantillonnage.

Trente-trois ATB ont été analysés dans des sols ou des sols amendés en France, dont 19 n'ont jamais été quantifiés et cinq ne l'ont été qu'une seule fois (fréquence de quantification comprise entre 1 % et 5 %) (tableau XXXIV, annexe 5). Parmi les ATB analysés dans plus de 50 échantillons, trois sont des fluoroquinolones (norfloxacine, ciprofloxacine, ofloxacine), le quatrième étant le sulfaméthoxazole.

L'acide nalidixique est l'ATB le plus fréquemment quantifié (52 %) suivi par l'acide oxolinique (29 %). Les autres ATB sont quantifiés entre 9 et 25 % des échantillons. Pour les ATB quantifiés, les concentrations médianes sont toujours inférieures à 2,1 $ng.g\ MS^{-1}$ (norfloxacine) et les concentrations moyennes à 5,1 $ng.g\ MS^{-1}$ (acide nalidixique).

Parmi les 14 ATB quantifiés dans des sols ou sols amendés en France, six sont des quinolones ou fluoroquinolones (ofloxacine, norfloxacine, acide oxolinique, acide nalidixique, ciprofloxacine, fluméquine). Ces six ATB présentent les concentrations maximales mesurées les plus élevées : entre 7 $ng.g\ MS^{-1}$ pour la fluméquine et 36 $ng.g\ MS^{-1}$ pour la ciprofloxacine. La grande hétérogénéité des résultats est due à la fréquence, l'ancienneté et la qualité des amendements par les PRO. L'historique des amendements n'est pas toujours renseigné dans les études.

Plusieurs ATB ont été mesurés dans des parcelles expérimentales de longue durée recevant différents déchets organiques (PRO), comprenant soit des boues, des boues compostées avec des déchets verts, des lisiers ou des déchets urbains compostés (Bourdat-Deschamps *et al.* 2017). Les fluoroquinolones ont notamment été quantifiées ou détectées dans les sols amendés par des boues ou des boues compostées (5 à 10 $ng.g\ MS^{-1}$ en norfloxacine, ofloxacine et ciprofloxacine) et parfois dans les sols recevant des déchets urbains compostés. Ces niveaux faibles de contamination sont en accord avec des applications raisonnées de PRO et l'ensemble des mécanismes de dégradation, de forte sorption aux constituants du sol et/ou d'entraînement par ruissellement. L'ofloxacine et le sulfaméthoxazole ont été détectés dans les lixiviats de sols mais à des fréquences inférieures à 7 % et à des concentrations proches des limites de détection (0,002-0,03 $\mu g.L^{-1}$).

Les travaux de Salvia, Fieu et Vulliet (2015) indiquent la présence de fluoroquinolones (principalement ofloxacine et/ou norfloxacine) à de faibles concentrations dans 11 des 12 sols amendés étudiés. En revanche, la ciprofloxacine, qui a été quantifiée dans la plupart des échantillons de boues, n'a pas été détectée dans les sols. Il convient toutefois de noter que la

LD élevée n'exclut pas sa présence à un niveau faible dans le sol. Ces résultats pourraient suggérer un transfert d'ofloxacine et de norfloxacine des boues vers le sol.

Enfin, dans le cadre du projet EVALUFQ-VOL, des concentrations de 165 à 696 ng.g MS^{-1} pour l'enrofloxacine et de 48 à 106 ng.g MS^{-1} pour la ciprofloxacine ont été mesurées dans les cinq premiers centimètres d'un sol amendé par des fumiers de volailles traitées avec des fluoroquinolones (Cotinet *et al.* 2011).

6.2 Devenir des antibiotiques dans l'environnement

Le devenir des ATB dans l'environnement est régi par leur persistance[25] (résultant des propriétés intrinsèques des ATB) et par l'atténuation naturelle (résultant des propriétés intrinsèques du milieu naturel) dans les milieux récepteurs.

6.2.1 Processus contrôlant le devenir des antibiotiques

Le devenir des ATB dans les différents compartiments de l'environnement dépend de plusieurs processus (figure 18), détaillés ci-après, dont les effets peuvent se favoriser ou s'annuler l'un l'autre. La combinaison de tous ces processus contrôle la répartition et la persistance des ATB dans les différents compartiments de l'environnement.

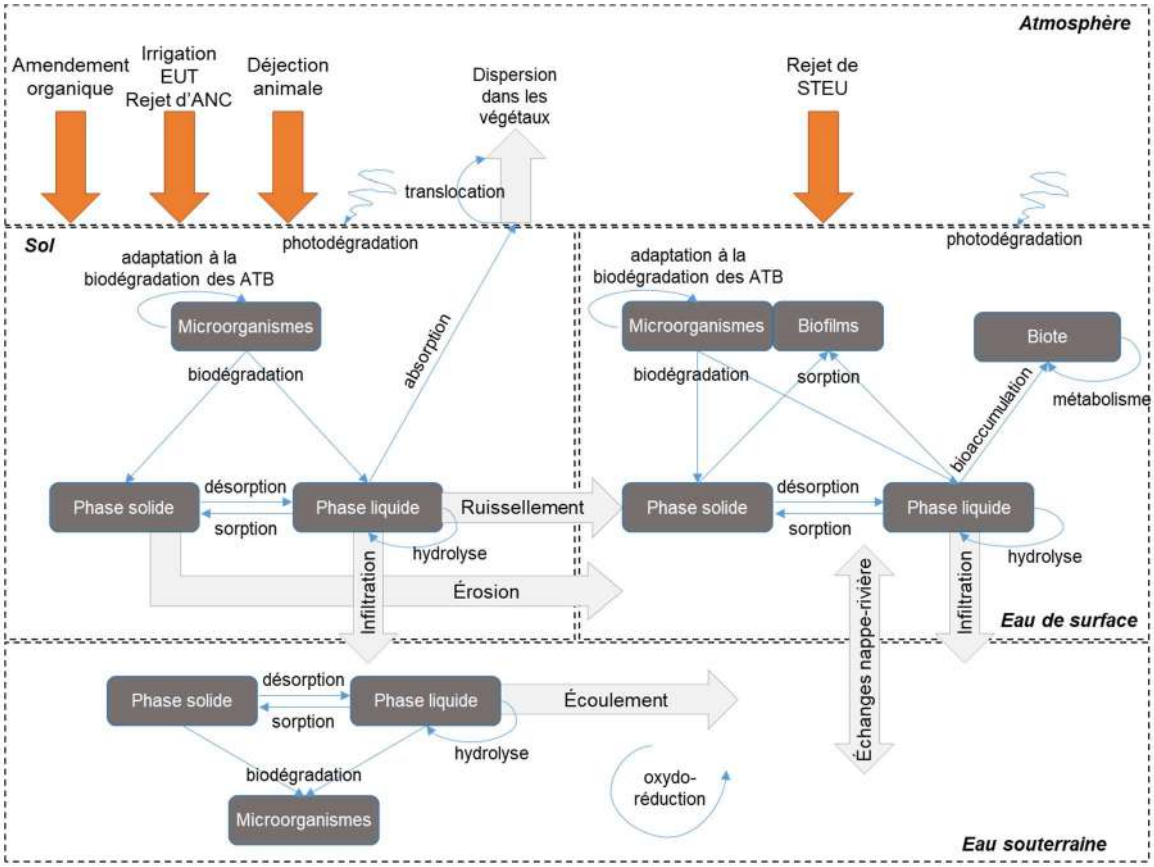


Figure 18. Processus contrôlant le devenir des antibiotiques dans l'environnement.
Les cases grises représentent les entités, les flèches bleues les processus, les flèches orangées les sources de contamination et les flèches grises les voies de dispersion. EUT=eaux usées traitées ; ANC=assainissement non collectif.

[25] Évaluation basée sur la dégradation de la molécule dans l'environnement (sol et eau)

6.2.1.1 Partition

Une fois dans l'environnement les ATB se distribuent principalement entre les phases solide et/ou liquide du milieu (très peu dans la phase gazeuse en raison de leur faible volatilité). Selon les caractéristiques physico-chimiques intrinsèques des ATB, mais aussi de la matrice environnementale (sols, eaux, sédiments, périphytons) et de la matrice source (PRO, eaux usées traitées), une fraction plus ou moins importante de ces derniers s'adsorbe à la surface ou à l'intérieur des composants du milieu (argiles, matières organiques, substances extracellulaires, particules en suspension, *etc.*). Ainsi, les ATB les moins solubles et les plus lipophiles sont généralement retrouvés préférentiellement dans la phase solide. Il est à noter que des composés adsorbés peuvent se désorber par la suite (phénomènes de désorption).

Le phénomène de sorption peut mettre en jeu différents types d'interactions qui conduisent à la rétention des ATB à l'interface solide/solution. Des liaisons de type van der Walls ou des échanges cationiques ont ainsi été rapportés avec les sulfamides (Gao and Pedersen, 2005), les fluoroquinolones (Goyne *et al.*, 2005) et les tétracyclines (Figueroa *et al.*, 2004). La sorption *via* des cations inorganiques eux-mêmes associés à des matières organiques ou des argiles a également été mise en avant dans la littérature (Al-Khazrajy and Boxall, 2016). De même, la possibilité de liaisons hydrogène (Martínez-Hernández *et al.*, 2014) ou de complexes entre des ATB et des cations ou des oxydes fer (Gu et Karthikeyan 2005b ; Ter Laak, Gebbink et Tolls 2006) a été observée. Les tétracyclines sont généralement retenues en interagissant fortement avec les minéraux argileux et les hydroxydes métalliques (Figueroa et MacKay 2005 ; Gu et Karthikeyan 2005a ; Gu *et al.* 2007).

La sorption est classiquement caractérisée par un coefficient de distribution (Kd) du composé entre la phase solide et la solution. Parmi les caractéristiques d'un sol ou d'un sédiment, la teneur totale en matière organique est généralement corrélée avec le coefficient de distribution. Ainsi, une normalisation des coefficients en fonction de la teneur en carbone organique (Koc) est fréquemment utilisée pour permettre la comparaison de l'adsorption d'une même molécule sur des sols ou des sédiments ayant des teneurs en matière organique différentes. Cependant, les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes ne sont pas nécessairement bien prises en compte, (contrairement aux interactions hydrophobes) par la normalisation au Koc (Tolls 2001). Néanmoins, la matière organique particulaire ou dissoute a souvent un rôle déterminant sur le phénomène de sorption. En effet, il a été montré que la solubilité des ATB dans l'eau augmente avec la teneur en matière organique dissoute (Chiou 2002), ce qui favorise leur mobilité et leur diffusion dans les milieux terrestres (Tolls 2001 ; Wegst-Uhrich *et al.* 2014). Kulshrestha, Giese et Aga (2004) ont ainsi montré qu'une grande quantité de matière organique dissoute diminue la sorption de certains ATB (comme l'oxytétracycline) sur les argiles. L'association avec la matière organique dissoute peut ainsi favoriser leur maintien en solution. La matière organique dissoute peut aussi saturer les sites de sorption disponibles pour les ATB et ainsi diminuer leur adsorption sur les particules de sol : ce phénomène a été mis en évidence pour la tylosine (Zhang *et al.* 2011). De même, le paramètre Koc ne suffit pas à prédire le comportement d'ATB qui sont ionisables (Li, Carter et Boxall 2020). Pour ces ATB, la sorption peut être fortement dépendante du pH, entraînant des changements dans la charge nette globale de la molécule (OCDE 2000). Les changements du pH du sol peuvent également affecter la charge de surface ou la capacité d'échange cationique des particules de sol et ainsi interférer sur la sorption des ATB. Ainsi, dans une expérience menée sur des colonnes de sol, Salvia *et al.* (2014) ont observé que les sulfamides sont adsorbés dans le premier horizon du sol en raison notamment de leur faible polarité (log Kow compris entre -0,6 et 1,6). Toutefois, dans des sols présentant un pH supérieur à 7,5, les sulfamides ayant un pKa compris entre 6 et 7,5 sont sous forme anionique et par conséquent, sont plus solubles et donc plus mobiles dans la phase liquide du sol. D'autres travaux soulignent l'importance de la force ionique, dont des variations peuvent entraîner des changements de pH et provoquer des compétitions entre les ions présents dans la solution et les ATB (Figueroa, Leonard et MacKay 2004 ; Sposito 2008).

La sorption est un mécanisme généralement réversible dont la cinétique de désorption est plus lente que celle d'adsorption ; ce phénomène est qualifié « d'hystérèse inverse » et peut contribuer à une contamination différée. Toutefois ce sujet reste très peu documenté. De nouvelles approches analytiques sont actuellement développées pour mesurer la fraction désorbable des ATB adsorbés et en évaluer l'impact écotoxicologique. Des mesures de désorption réalisée par DGT[26] à partir de biosolides montrent que 16 % de la ciprofloxacine adsorbée est sous une forme désorbable, c'est-à-dire remobilisable. Ainsi, la libération de la ciprofloxacine serait fortement limitée par sa désorption et sa diffusion lente (D'Angelo et Starnes 2016). Ces mécanismes de sorption/désorption sont d'une grande incidence puisqu'ils influencent fortement la bioaccessibilité et le transport des ATB dans les sols et les sédiments (Kulshrestha, Giese et Aga 2004). Par ailleurs, il existe également des mécanismes de sorption irréversible mettant en œuvre des phénomènes de tamis moléculaire ou de la formation de liaisons covalentes au cours de la diffusion dans l'espace poral des solides. Ces mécanismes de « non-equilibrium sorption » contribuent à la formation de résidus liés – non extractibles – dont on connaît encore assez mal la nature ou le devenir (Loeffler *et al.* 2020).

La partition entre la phase solide et la solution est considérée comme un des processus déterminant pour appréhender le devenir des ATB dans les milieux naturels. En effet, l'état de l'art de la contamination par les ATB corrobore les connaissances sur l'affinité de sorption/désorption des composés décrite dans la littérature scientifique. En ce sens, les ATB les moins propices à la sorption dans les sols ou les sédiments sont généralement ceux qui sont le plus retrouvés dans les eaux sous conditions qu'ils soient peu ou pas dégradables.

6.2.1.2 Dégradation

Les ATB peuvent subir une dégradation, dès leurs sources d'émission (ex : STEU) ou dans les milieux récepteurs, qui explique pour partie leur dissipation. En effet, diverses réactions chimiques (ex : hydrolyse, oxydo-réduction, attaque radicalaire, *etc.*), qui peuvent être catalysées biologiquement par des micro-organismes ou abiotiquement par des surfaces/espèces minérales ou organiques ou par le rayonnement solaire, peuvent conduire à leur transformation structurelle. Il convient de noter que chaque milieu terrestre ou aquatique, en liaison avec ses spécificités, est plus ou moins propice à l'une ou l'autre de ces réactions.

Les cinétiques de dissipation sont généralement exprimées par la DT50, définit comme le temps nécessaire pour atteindre 50 % de dissipation. Ce paramètre intègre l'ensemble des processus abiotiques et biotiques qui réduisent progressivement la quantité de résidus extractibles. En général, ces données sont acquises *via* des expérimentations en solutions ou avec des sols agricoles incubés suivant des conditions contrôlées. Dans le cadre de la procédure d'homologation des molécules, l'OCDE fixe des lignes directrices, notamment des tests standardisés pour déterminer la dégradation dans l'environnement. Il est également à souligner que ces expérimentations ne prennent en compte, ni le contexte environnemental comme le climat ou les pratiques agricoles (amendement organique, irrigation avec des eaux usées traitées, *etc.*), ni l'historique d'exposition, connus comme des facteurs influençant fortement la dissipation de ces composés. De même, les conditions expérimentales ayant un très fort impact sur les valeurs de DT50 mesurées, celles-ci sont soumises à de fortes variations selon les milieux et les expérimentations. De ce fait, les DT50 rapportées dans la littérature sont fortement variables (de < 1 à > 1 000 jours) suivant les composés ou suivant leurs contextes de détermination.

Ainsi, Braschi *et al.* (2013) ont constaté que l'amoxicilline était rapidement dissipée, avec une DT50 de 0,43 à 0,57 jour. De même, Liu *et al.* (2014) ont observé que de la chlortétracycline était rapidement dissipée dans un sol dopé à 10 $mg.kg^{-1}$ (DT50 < 1 jour). En revanche, une

[26] DGT= diffusive gradients in thin films

étude en mésocosme extérieur a montré une faible dissipation de l'azithromycine (DT50 = 408 - 3 466 jours), l'ofloxacine (DT50 = 866 - 1 733 jours) et de la tétracycline (DT50 = 578 jours) (Walters, McClellan et Halden 2010). Néanmoins, sur la base d'une revue de la littérature, Grenni, Ancona et Barra Caracciolo (2018) ont observé que les fluoroquinolones, les macrolides et les tétracyclines présentent généralement des valeurs élevées de DT50. Une étude sur la dégradation des sulfamides a montré que le sulfaméthoxazole persiste dans les eaux de surface où il présente une cinétique de dissipation lente (Boreen, Arnold et McNeill 2004). De même, certaines fluoroquinolones et d'autres sulfamides ont été caractérisés comme peu biodégradables (Kümmerer, Al-Ahmad et Mersch-Sundermann 2000 ; Alexy, Kümpel et Kümmerer 2004).

La transformation d'un ATB peut être complète (minéralisation), entraînant la formation de produits inorganiques, ou incomplète, conduisant alors à la formation de produits organiques intermédiaires. Parmi les processus abiotiques, l'hydrolyse ou encore la photolyse solaire (*via* l'action des rayonnements ultra-violets, notamment UV-C) sont les principales transformations pouvant conduire à une dégradation partielle des ATB. Ces processus peuvent notamment contribuer à une dégradation significative des ATB dans des conditions où l'activité microbienne est supprimée, par exemple, dans un sol à faible taux d'humidité. Ainsi, il a été montré que le chloramphénicol (Jin *et al.* 2019) ou l'érythromycine peuvent être hydrolysés à la surface de minéraux argileux (Kim *et al.* 2004b). Les cinétiques d'hydrolyse dépendent, pour certains composés (notamment les β-lactamines : amoxicilline, céfalotine et céfoxitine), des conditions de pH et/ou de température (Mitchell *et al.* 2014 ; Hirte *et al.* 2016). De même, plusieurs travaux ont montré la photodégradation d'ATB présents dans les eaux de surface ou adsorbés sur des sols ou sur des argiles en suspension exposés à la lumière solaire (ex : chlortétracycline (Werner, McNeill et Arnold 2009 ; Liu *et al.* 2011b) et ciprofloxacine (Wu *et al.* 2018)). Il est à noter que la photodégradation peut se faire par une voie directe si l'ATB est photosensible (action directe des rayons UV sur la molécule) ou par une voie indirecte (qui consiste en l'action d'intermédiaires chimiques très oxydants, créés sous l'action de rayons UV sur d'autres composés comme la matière organique ou les nitrates) (Lastre-Acosta *et al.* 2019). Ainsi, selon leur modèle photochimique, Vione *et al.* (2018) montrent que la photolyse directe et la réaction par les radicaux OH° sont les principales voies de photodégradation de la sulfadiazine dans les eaux à faible teneur en carbone organique dissous (COD < 1 $mgC.L^{-1}$). Pour des valeurs de COD plus élevées (> 3 - 4 $mgC.L^{-1}$), les espèces réactives induites par la présence de matière organique (forme dite d'« état triplet ») représenterait la majorité de la phototransformation de la forme neutre alors que la forme ionisée serait principalement photodégradée par photolyse directe. Des travaux rapportent également que les minéraux, tels que les oxydes de manganèse ou de fer, peuvent transformer certains ATB comme les fluoroquinolones par des réactions d'oxydo-réduction (Zhang et Huang 2005b, 2005a).

La biodégradation est également une importante voie de dégradation des ATB dans l'environnement. En effet, les micro-organismes ont développé au cours de leur évolution un arsenal enzymatique pour détoxifier leur environnement. Ils sont ainsi capables de transformer de nombreux composés xénobiotiques, dont les ATB, *via* deux types de mécanismes : (i) le co-métabolisme catalysé par des enzymes non spécifiques qui conduit à la transformation partielle des ATB et donc à la formation de produits de transformation ; et (ii) le métabolisme catalysé par des enzymes spécifiques conduit à la minéralisation d'une partie ou de l'ensemble du composé ATB en composés simples et non toxiques. Dans ce second mécanisme, l'ATB est utilisé comme une source de nutriments et d'énergie pour la croissance de populations microbiennes aptes à le minéraliser dans les cas où les concentrations sont suffisantes pour supporter la croissance. Les ATB les mieux métabolisables incluent les classes des sulfamides, des macrolides, et des pénicillines (Martin-Laurent *et al.* 2014 ; Topp *et al.* 2016 ; Crofts *et al.* 2018). Néanmoins, la persistance environnementale de ces composés métabolisables peut-être réduite dans les cas où une population microbienne augmente en activité en raison de sa croissance. En effet, différents travaux mettent en évidence des phénomènes de sélection et d'acclimatation des bactéries, qui peuvent ainsi accroître

progressivement leur capacité à dégrader certaines molécules. De même, le co-métabolisme d'ATB peut être amplifié dans certains milieux enrichis en d'autres éléments. Les mécanismes de biodégradation sont particulièrement bien décrits pour les sulfamides. Ainsi, bien que ces ATB soient des composés difficilement dégradables, ils peuvent être transformés de manière co-métabolique par différents micro-organismes (Chen et Xie 2018) conduisant à l'accumulation de métabolites tels que le 3-amino-5-méthylisoxazole et le 2-amino-4,6-diméthylpyrimidine pour le sulfaméthoxazole et la sulfaméthazine, respectivement (Ricken *et al.* 2013).

Ces composés peuvent être aussi transformés selon une voie métabolique. Topp *et al.* (2013) ont isolé une souche bactérienne (*Microbacterium* sp. C448), d'un sol agricole régulièrement exposé à un cocktail d'ATB, capable de minéraliser partiellement la sulfaméthazine et conduisant à l'accumulation stœchiométrique de 2-amino-4,6-diméthylypyrimidine. Cette découverte a été confirmée par d'autres équipes de recherche qui ont également isolé et caractérisé à partir de différents environnements (terrestres et aquatiques) des *Microbacterium* capables de transformer partiellement les sulfamides (Ricken *et al.* 2013 ; Tappe *et al.* 2013). La capacité à dégrader les sulfamides a par la suite été plus largement mise en évidence dans des isolats affiliés aux protéobacteries (Martin-Laurent *et al.* 2019). En milieu liquide, des champignons comme *Xylaria longipes* apparaissent également capables de transformer des fluoroquinolones hautement persistantes comme la ciprofloxacine en produits de dégradation présentant une activité antibactérienne réduite par rapport à la substance active (Rusch *et al.* 2018). Dans les sols, la biodégradation de la ciprofloxacine est vraisemblablement ralentie par sa forte sorption sur les particules du sol qui réduit sa biodisponibilité pour les micro-organismes capables de la transformer.

Outre la présence nécessaire de micro-organismes capables de les dégrader, la biodégradation des ATB est aussi fortement dépendante des paramètres environnementaux. Ainsi, dans les milieux naturels comme les sols profonds et les eaux souterraines, les températures basses, la faible teneur en matière organique et la faible densité des communautés microbiennes tendent à limiter la dégradation des ATB alors que dans les horizons de surface des sols (notamment ceux amendés) et les eaux superficielles, le processus sera plus aisé. Dans le cas des PRO compostés, les différences de propriétés chimiques déterminent la dégradabilité des ATB, mais le principal facteur réside dans la température atteinte lors de la phase thermophile qui permet une activité biologique importante (Selvam et Wong 2017).

Outre les quantités d'ATB utilisés, les nombreux processus de transformation expliquent les composés préférentiellement retrouvés en France dans les milieux terrestres ou aquatiques et les sources d'émission (§ 6.1.2). Ainsi, les β-lactamines (notamment l'amoxicilline) ne sont retrouvées qu'à de très faibles concentrations dans l'environnement en raison de leur hydrolyse rapide (DT50 de l'ordre de quelques jours) (Charuaud *et al.* 2019 ; Charuaud, Jardé et Le Bot 2019) bien qu'ils soient la classe d'ATB la plus consommée en médecine humaine. Leur dégradation intervient dès leur rejet dans les réseaux d'assainissement tandis que d'autres classes d'ATB comme les fluoroquinolones (ciprofloxacine ou ofloxacine – moins dégradables), bien que moins prescrites, sont retrouvées à de plus fortes concentrations (Oberlé *et al.* 2012).

Il est aussi important de noter que de très nombreux produits de transformation des ATB formés par les nombreux mécanismes biotiques ou abiotiques dans différentes conditions environnementales, ne sont pas encore connus. Ainsi, à ce jour, très peu de produits de transformation des ATB font l'objet d'une évaluation que ce soit en termes de présence dans l'environnement ou de maintien des propriétés ATB (ex : la ciprofloxacine est également le métabolite d'autres fluoroquinolones (Lewis, Juhasz et Smith 2012 ; Rusch *et al.* 2019). Il en est de même au niveau des PRO (Selvam et Wong 2017). Ils échappent donc majoritairement à toute évaluation. Le plus souvent les produits de transformation sont plus polaires que les composés parents, ce qui va augmenter leur mobilité et diminuer leur sorption sur les MES, les sols et les sédiments. Mais en revanche, ils peuvent être plus réactifs et mieux se prêter à une fixation covalente à la matière organique.

6.2.1.3 Transport

Dans les milieux terrestres ou les milieux aquatiques, les ATB et leurs produits de transformation peuvent être transportés depuis leurs sources d'émission vers différents compartiments du milieu récepteur. Le transport s'effectue *via* les flux d'eau soit sous forme soluble (libre ou complexé à un autre composé), soit sous forme particulaire adsorbé à une particule ou un colloïde. Les colloïdes (avec des diamètres compris entre 1 nm et 10 nm) sont omniprésents dans l'environnement, notamment sous forme de minéraux argileux, d'oxydes métalliques (oxyhydroxydes de Fe ou Al), de macromolécules organiques (substances humiques) et de biocolloïdes (ex : bactéries, virus et protozoaires) (Šimůnek *et al.* 2006 ; Bin *et al.* 2011). Ces colloïdes de différentes natures (abiotiques et biotiques) partagent des propriétés communes telles qu'une grande surface spécifique qui leur congère une importante réactivité pour adsorber des composés organiques dont les ATB (Xing *et al.* 2015). Arrivés dans le milieu récepteur, les ATB peuvent se désorber des colloïdes et être relargués dans l'eau.

6.2.2 Devenir spatio-temporel dans les milieux aquatiques

6.2.2.1 Eaux de surface

6.2.2.1.1 Influence des sources de contamination

Fairbairn *et al.* (2016) mettent en évidence deux types de profil de contamination spatio-temporelle pour les ATB étudiés :

- Les ATB pour lesquels les profils de contamination relèvent essentiellement d'apports localisés par les eaux usées traitées (tylosine, érythromycine et sulfaméthoxazole) :
  - Fréquences de quantification et concentrations plus élevées mesurées à 250 m en aval d'un rejet de STEU, avec une différence significative par rapport aux autres sites situés en amont du rejet de la STEU.
  - Variation saisonnière non significative, avec une tendance à des fréquences de détection et/ou des concentrations plus faibles lors de la période de plus fort débit pour certains ATB.
- Les ATB pour lesquels les profils de contamination suggèrent à la fois une contamination par les rejets de STEU et une contamination diffuse, que les auteurs attribuent au ruissellement des eaux pluviales sur les sols agricoles et à l'infiltration des rejets d'ANC (triméthoprime) :
  - Détection dans au moins 50 % de tous les échantillons (amont et aval de la STEU) mais corrélation des concentrations avec les activités humaines et les rejets d'eaux usées traitées.
  - Variations saisonnières significatives : concentrations en amont du rejet de STEU plus importantes en période de bas débit cumulé ou non avec la période d'épandage de fumier.

En effet, les concentrations les plus élevées en ATB dans les eaux de surface sont généralement mises en évidence à l'aval immédiat des rejets de STEU, tout en restant inférieures à celles retrouvées dans les eaux usées traitées. Les concentrations en ATB augmentent de deux à dix fois immédiatement en aval du rejet et peuvent varier du $ng.L^{-1}$ à quelques $\mu g.L^{-1}$. En fonction du flux d'eaux usées traitées rejeté et du débit de la rivière, cette augmentation est perceptible sur quelques mètres ou plusieurs kilomètres en aval du rejet, puis les concentrations diminuent progressivement avec l'éloignement (Lindqvist, Tuhkanen et Kronberg 2005 ; Brown 2010 ; Baker et Kasprzyk-Hordern 2013). Par exemple, Batt, Bruce et Aga (2006) ont trouvé 65 $ng.L^{-1}$ de ciprofloxacine et 76 $ng.L^{-1}$ de sulfaméthoxazole dans les eaux de surface jusqu'à 100 mètres en aval d'une STEU (USA). De même, Alygizakis *et al.* (2016) mettent en évidence une corrélation négative entre la distance du point de rejet de la STEU et la concentration en amoxicilline dans les eaux du golfe Saronique (Grèce). Cette

tendance est aussi observée dans d'autres matrices comme les périphytons ou les sédiments (Aubertheau-Laurent 2013 ; Gibs *et al.* 2013 ; Aubertheau *et al.* 2017 ; Vivant *et al.* 2019). Par ailleurs, pour certains sites, une augmentation des concentrations et de la diversité des molécules est observée en l'hiver par rapport à l'été (Tamtam 2008 ; Tamtam *et al.* 2008 ; Dinh *et al.* 2017c ; Guibal *et al.* 2018). Cette différence relève principalement d'une prescription d'ATB plus forte en hiver qu'en été (Elseviers *et al*. 2007).

Les milieux aquatiques sont aussi impactés par les PRO *via* les phénomènes de ruissellement, et d'infiltration qui peuvent entraîner des ATB depuis les produits épandus vers les masses d'eau, notamment les eaux de surface (Blackwell *et al.* 2009). Par conséquent, les périodes d'épandage des PRO sur les sols peuvent avoir un impact sur les concentrations en ATB mesurées dans les eaux de surface (Tamtam *et al.* 2009a ; Guillon *et al.* 2015).

Le long d'un réseau hydrographique de cours d'eau d'ordre un à quatre (ordre de Strahler) avec une activité agricole, une augmentation globale des concentrations en ATB et du nombre d'ATB quantifiés a été mise en évidence de l'amont vers l'aval. Cette évolution des concentrations reflète le gradient d'anthropisation du bassin versant (contributions croissantes de la pression exercée par des exploitations bovines et par la densité humaine de l'amont vers l'aval) (Petit *et al.* 2012). À l'inverse, le long d'un bassin hydrographique agricole du Nebraska (USA), les concentrations moyennes en ATB à usage vétérinaire mesurées ne présentent pas de variation spatiale significative (Jaimes-Correa, Snow et Bartelt-Hunt 2015). Toutefois, sur ce même bassin, les concentrations moyennes en ATB utilisés en médecine vétérinaire reflètent les différences temporelles significatives observées dans les eaux (Jaimes-Correa, Snow et Bartelt-Hunt 2015).

Un suivi mené sur la Vienne montre une grande variabilité des concentrations en ATB dans les périphytons tout au long des 350 km du bassin versant (Aubertheau *et al.* 2017) se caractérisant par une succession répétée de zones peu/moins contaminées en amont des centres urbains, suivie par un enrichissement des concentrations en ATB en aval des rejets de STEU, puis par une diminution progressive des concentrations entre deux centres urbains. À l'échelle d'un grand bassin versant, il ne semble pas y avoir de tendance à une augmentation graduelle des concentrations depuis la source vers l'exutoire, mais une quasi-omniprésence des ATB en raison d'apports continus et diffus conférant une pseudo-persistance à ces composés (Aubertheau, 2013).

Au niveau des phases sédimentaires, les travaux menés dans la Loire, le Loiret et la Seine mettent aussi en évidence une évolution historique des concentrations en fluoroquinolones, quinolones, macrolides, sulfamides et diaminopyrimidine dans les carottages de sédiments (Tamtam *et al.* 2011a ; Metorg 2 2012 ; Thiebault *et al.* 2017). Les plus anciennes couches contaminées coïncident avec la date de mise sur le marché des ATB considérés. Des résultats similaires ont été trouvés dans d'autres pays, comme dans des carottes de sédiments de la baie de Jamaïque à New York (Lara-Martín *et al.* 2015). Les couches récentes de sédiments peuvent présenter des concentrations moindres que les couches de profondeurs intermédiaires, ce qui est attribué à l'amélioration continuelles des traitements mis en place dans les STEU et/ou à des processus d'atténuation naturelle. Toutefois les concentrations les plus faibles sont généralement observées dans les couches anciennes de sédiments.

6.2.2.1.2 Influence des facteurs hydrologiques

Les variations saisonnières qui affectent l'hydrologie (débit, pluviométrie) affectent également la distribution et les concentrations en ATB dans les eaux de surface (Gray, Todd et Hershey 2020). Plusieurs études mettent ainsi en évidence des concentrations en ATB plus faibles en hiver (haut débit) qu'en été (bas débit), bien que les prescriptions et/ou les concentrations dans les eaux usées de STEU soient plus importantes à cette période (Petit *et al.* 2012 ; Fairbairn *et al.* 2016). Ceci montre l'importance de ne pas raisonner uniquement en concentration mais aussi en flux à l'échelle des bassins versants. En effet, le débit des cours d'eau tend à augmenter en hiver et à favoriser une dilution plus importante des ATB. Au contraire, les périodes d'étiage sont responsables d'une re-concentration des contaminants dans le milieu.

Cette saisonnalité n'est cependant pas la même suivant les régimes hydro-climatiques rencontrés sur le territoire français (nivo-glaciaire, pluvio-océanique et pluvio-méditerranéen). Les tendances ne sont toutefois pas identiques pour l'ensemble des ATB (Tamtam *et al.* 2007) et l'effet n'est pas perceptible pour tous les sites. Ainsi, Charuaud *et al.* (2019) n'observent aucune variation saisonnière quant à la présence de différents ATB.

Luo *et al.* (2011) ont étudié les paramètres influant sur l'atténuation des ATB dans le fleuve Hai He (Chine) et concluent que le débit du fleuve exerce l'effet le plus significatif sur les valeurs globales de coefficient d'atténuation pour les sulfamides, les quinolones et les macrolides, ce qui indique que la dilution joue un rôle important dans l'atténuation de ces trois classes d'ATB. De plus, une atténuation plus lente des macrolides, des quinolones et des sulfamides a été significativement corrélée à une teneur en COD plus élevée.

Dans les sédiments, les observations faites à partir de l'étude de carottages (voir § 6.1.3.2.1.2) confirment un archivage des ATB au cours des processus hydro-sédimentaires qui contrôle la charge solide des rivières et des retenues. Cependant, il ressort également que lorsque les sédiments sont remobilisés lors d'événements de fort débit, les ATB sorbés sur les sédiments de surface peuvent être remobilisés et transportés (Gibs *et al.* 2013).

Les évènements pluvieux intenses conduisent aussi au lessivage des sols contaminés et favorisent un pic de contaminants dans les milieux aquatiques. Ainsi, la durée entre l'épandage et les premières précipitations influe sur les concentrations d'ATB mobilisés dans l'eau de ruissellement (Barrios *et al.* 2020). Des concentrations plus importantes de sulfaméthoxazole, de triméthoprime et de fluméquine ont été observées en période de crue sur la Seine (Tamtam *et al.* 2007). Lors des périodes de fortes pluies ou de fonte des neiges, le volume des eaux usées des réseaux d'assainissement unitaires peut dépasser la capacité du réseau ou de la STEU. Pour cette raison, les réseaux unitaires peuvent déborder occasionnellement et rejeter l'excès d'eaux usées directement dans les ruisseaux, rivières ou autres plans d'eau à proximité. Ces surverses de réseaux unitaires contiennent non seulement des eaux pluviales mais aussi les eaux usées non traitées charriant des ATB. En France, la part de réseaux strictement unitaire est faible (>10 %) et la majeure partie des agglomérations dispose de réseaux mixtes (*i.e.* séparatif dans les quartiers récents et unitaire dans les quartiers historiques, voir § 5.1.1.1.5).

Au niveau des zones estuariennes, la dynamique des concentrations en ATB est très complexe de par l'apport variable de contamination par l'amont et le rôle de l'estuaire comme vecteur des intrusions salines et comme réacteur physico-chimique (Aminot *et al.* 2016). De plus, la dynamique fluvio-estuarienne offre aussi bien des puits de stockage à contaminants que des réacteurs de dégradation. La connaissance de la dynamique des ATB au niveau de ces exutoires reste encore faible d'autant que les effets de forte dilution complexifient le suivi des concentrations. Dans l'estuaire de la Seine, le nombre de molécules détectées est inférieur à celui mesuré dans les eaux d'un continuum hospitalier et d'un continuum agricole sur le même bassin versant, et les concentrations en ATB ne sont pas plus élevées, alors que la campagne de mesures a été menée en période de bas débit. Ces résultats sont expliqués par une dilution importante en estuaire de Seine (Petit *et al.* 2012). Les ATB les plus stables sont retrouvés à proximité de rejets de STEU mais se diluent rapidement dans la zone d'embouchure, à l'exception du sulfaméthoxazole qui persiste. Hors de France, une étude menée dans l'estuaire du Yangtsé a montré de fortes variations des concentrations en sulfadiazine et sulfapyridine (Zhao, Zhou et Zhang 2015).

6.2.2.1.3 Influence des processus

Les concentrations en ATB dans les eaux de surface évoluent aussi au regard des cinétiques relatives à chaque processus naturel (partition, dégradation, transport).

Ainsi, certains ATB sont rapidement dissipés de la colonne d'eau par sorption dans les sédiments avoisinant la source d'émission (sorption des composés solubles / sédimentation des composés associés aux particules en suspension). Luo *et al.* (2011) ont calculé des coefficients d'atténuation de premier ordre (K) pour 12 ATB dans six affluents du fleuve Hai

He (Chine). Les coefficients moyens indiquent que les tétracyclines (K compris entre 0,39 et 1,22 h^{-1}) sont les plus sujettes à l'atténuation, suivies des macrolides (K compris entre 0,09 et 0,48 h^{-1}), des quinolones (K compris entre 0,08 et 0,45 h^{-1}) et des sulfamides (K compris entre 0,01 et 0,44 h^{-1}). Selon les auteurs, la sorption contribuerait fortement à l'atténuation pour les tétracyclines et les macrolides dans les rivières. En France, des données montrent notamment que les fluoroquinolones ont un fort taux de dissipation dans la colonne d'eau, en relation avec leur sorption sur les matières en suspension et les sédiments (Dinh *et al.* 2017a) : partition de 11 à 36 % dans la phase particulaire pour quatre fluoroquinolones (ciprofloxacine, norfloxacine, ofloxacine et énoxacine) et la vancomycine.

Les cinétiques de dégradation jouent également un rôle important dans le devenir spatial et temporel de certains ATB.

Les cinétiques de biodégradation peuvent être notamment très différentes suivant les caractéristiques du milieu. Ainsi, les tests (OCDE 2002) réalisés sur des eaux et des sédiments aérobies ou anaérobies montrent que la cinétique de biodégradation des macrolides (ex : azithromycine) peut perdurer sur plusieurs années (Ericson 2007). En revanche, une dissipation plus rapide des macrolides a été rapportée dans des milieux précédemment exposés aux ATB par rapport à des milieux non exposés. Ce résultat suggère que l'acclimatation à long terme peut jouer un rôle important. En effet, une minéralisation de l'érythromycine a été observée par la communauté microbienne des sédiments aquacoles (Kim *et al.* 2004a), et de sédiments pré-exposés par rapport à des sédiments qui n'avaient pas été exposés aux ATB (Kim et Cerniglia 2005). Au contraire, les céphalosporines connaissent une biodégradation rapide. Des travaux montrent ainsi que le taux d'élimination des céphalosporines est rapide dans les sédiments anoxiques (demi-vies de 1,1 à 4,1 jours), et dans les sédiments oxiques (demi-vies de 0,8 à 3,1 jours) (Jiang, Wang et Ji 2010).

Les cinétiques d'hydrolyse ont aussi des ordres de grandeurs variables suivant les composés. Ainsi, les β-lactames sont hydrolysables en quelques heures et persistent peu dans l'eau et les sédiments (Huang *et al.* 2011). Quelques études rapportent tout de même la présence de ces composés à des niveaux très faibles dans les milieux aquatiques (ex : en Allemagne (Christian *et al.* 2003) ou aux USA (Cha, Yang et Carlson 2006)). Jiang, Wang et Ji (2010) ont montré que pour d'autres composés, comme les céphalosporines, la dégradation abiotique peut prendre quelques jours en eau de surface. Ainsi, les cinétiques d'hydrolyse correspondent à une DT50 = 2,7 à 18,7 jours et les cinétiques de photolyse correspondent à une DT50 = 4,1 jours (pour la ceftriaxone). En revanche, pour certains macrolides (spiramycine, tylosine) et phénicolés (chloramphénicol, florfénicol), les constantes cinétiques sont si lentes (de l'ordre de - 0,0008 à - 0,00110 $jour^{-1}$ à 25°C) que ce mécanisme est peu probable dans l'environnement (Mitchell *et al.* 2015). De même, les sulfamides et quinolones sont connues pour être réfractaires à l'hydrolyse (Cetecioglu *et al.* 2013).

L'évolution spatiale et/ou temporelle des ATB relève ainsi à la fois de l'intensité de chaque processus (*i.e.* liée aux propriétés intrinsèques de chaque composé et aux propriétés des milieux) et des limitations cinétiques liées à la compétition, la superposition ou l'enchaînement entre les différents processus (partition, dégradation et transport). Aussi, les ATB les plus fréquemment quantifiés dans les eaux de surface (quinolones, fluoroquinolones, macrolides et sulfamides) sont ceux qui y présentent le plus de persistance (Petit *et al.* 2012).

6.2.2.2 Eaux souterraines

Les travaux sur le devenir des ATB dans les eaux souterraines sont encore peu nombreux mais des facteurs explicatifs ont commencé à être identifiés. Toutefois, ils ne permettent pas encore de prédire parfaitement le devenir des ATB dans ce compartiment (Boy-Roura *et al.* 2018 ; Menció et Mas-Pla 2019 ; Gray, Todd et Hershey 2020).

6.2.2.2.1 Influence des sources de contamination

La contamination des eaux souterraines dépend directement de la nature des activités anthropiques en surface. En effet, les études de Boy-Roura *et al.* (2018) et de Kivits *et al.*

(2018), menées, respectivement, sur des bassins versants agricoles en Espagne ou aux Pays-Bas, relient les concentrations en ATB retrouvées dans des eaux souterraines à l'épandage des fumiers. Boy-Roura *et al.* (2018) précisent que le caractère irrégulier des amendements et de leurs compositions induit une grande variabilité sur la distribution spatiale des ATB. À l'inverse, dans la province agricole de La Plana de Castellón (Espagne), l'infiltration des eaux usées traitées servant à l'irrigation des cultures d'agrumes est identifiée comme la principale source d'introduction de sulfaméthoxazole et de triméthoprime dans les eaux souterraines (Renau-Pruñonosa *et al.* 2020).

Les échanges entre les eaux de surface et les eaux souterraines constituent également une voie de contamination des eaux souterraines puisque les eaux de surface contiennent généralement des concentrations plus élevées d'ATB que les eaux souterraines (Focazio *et al.* 2008 ; Stuart *et al.* 2011 ; Li 2014). Inversement, les eaux souterraines servent aussi de recharge aux eaux de surface (soutien d'étiage), et peuvent, dans certains cas, apporter des ATB aux eaux de surface (Li *et al.* 2018). Toutefois, Gray, Todd et Hershey (2020) n'ont pu mettre en évidence de corrélations significatives entre les concentrations dans les eaux de surface et dans les eaux souterraines que pour deux ATB, la danofloxacine et l'érythromycine, et uniquement en hiver.

Il convient également de noter que l'adaptation continue des pratiques agronomiques et des traitements vétérinaires ont conduit à une évolution de la composition des sources de contaminations sur les dernières décennies. Kivits *et al.* (2018) ont pu retracer cette tendance temporelle au travers de la présence des ATB dans un aquifère (jusqu'à 23 m de profondeur et des eaux souterraines âgées de 40 ans). Leurs données corrèlent les profils d'ATB retrouvés dans les couches de l'aquifère à l'historique connu de l'utilisation d'ATB en médecine vétérinaire aux Pays-Bas, confirmant également l'infiltration des ATB à partir des champs agricoles amendés.

6.2.2.2.2 Influence des facteurs hydrogéochimiques

Les facteurs liés à l'écoulement des eaux souterraines sont susceptibles d'influer directement la distribution spatiale et le transport des ATB dans ce milieu. Boy-Roura *et al.* (2018) n'observent cependant pas de gradient spatial de la concentration en ATB (ciprofloxacine et sulfaméthoxazole) dans un aquifère en Espagne. En effet, la modification du champ d'écoulement due à des régimes de prélèvements variables (*via* de nombreux puits) contribue notamment à augmenter la dispersion des ATB dans la masse d'eau.

De même, le transport des ATB n'est pas toujours continu dans l'aquifère. Le transfert des ATB peut être « réactif », c'est-à-dire lorsque des échanges s'opèrent avec la matrice solide du milieu poreux. Ces échanges traduisent des phénomènes d'interactions qui se concrétisent par un facteur de retard affectant le déplacement des ATB dans la masse d'eau (*i.e.* par rapport à un traceur non réactif). Le temps de parcours de certains ATB (ex : ciprofloxacine) peut être ainsi fortement impacté dans la zone non saturée et dans l'aquifère. Boy-Roura *et al.* (2018) estiment que la migration des ATB est d'au maximum quelques dizaines de mètres par an, mais dépend de la pluviométrie et de l'infiltrabilité des sols. Dans les milieux karstiques, le transfert des ATB vers les eaux souterraines est beaucoup plus rapide, en raison de la suppression des phénomènes d'atténuation liés au passage par le sol (voir § 5.1.2.1.2). Toutefois, la contamination de ce type d'aquifère par les ATB est à ce jour peu étudié.

Les effets saisonniers semblent également avoir un impact sur l'évolution temporelle des concentrations en ATB. Gray, Todd et Hershey (2020) expliquent les concentrations plus élevées en ATB qu'ils ont mesurées en hiver, par une dégradation plus faible des ATB à la surface du sol qui faciliterait une plus grande percolation vers les eaux souterraines en raison d'une température et d'une intensité lumineuse plus faibles. Ils étayent cette hypothèse par la corrélation entre les concentrations en ATB dans les eaux souterraines et la température des eaux de surface.

Dans leur étude poussée d'un aquifère espagnol, Boy-Roura *et al.* (2018) ont observé peu de corrélation dans les variogrammes des concentrations en ATB et la géochimie (conductivité

électrique ou concentration en nitrates) au sein de l'aquifère. Cependant, quelques travaux soulèvent que les propriétés chimiques des eaux souterraines peuvent être des facteurs explicatifs des profils de concentrations en ATB dans les eaux souterraines (Menció et Mas-Pla (2019). Toutefois, ils soulignent le manque de prise en compte des paramètres de transport des ATB et la nécessité d'une approche groupée « hydrogéochimiques ».

6.2.2.2.3 Influence des processus

La dynamique des ATB dans les milieux souterrains dépend également des contrôles entre les processus qui y opèrent. De manière générale, les possibilités de dégradation biotique ou abiotique sont cinétiquement réduites (biodégradation) ou annihilées (photolyse). Néanmoins, le transport d'un polluant dans un aquifère n'est pas nécessairement conservatif puisque des dégradations peuvent être observées. Ainsi, Kivits *et al.* (2018) ont pu mettre en évidence l'absence d'ATB en dessous de la couche redox nitrate/fer d'un aquifère, suggérant que les ATB pourraient subir une dégradation ou une atténuation dans des conditions redox réduisant les nitrates. Sur des temps longs, les processus de transformation biotique anaérobie peuvent avoir leur importance pour la résilience des aquifères.

Dans les eaux souterraines, le devenir des ATB est principalement régi par la partition et le transport. En ce sens, les différences de propriétés/caractéristiques physico-chimiques entre les composés peuvent conduire à des différences de comportement à l'origine des disparités observées dans leur distribution spatiale. Ainsi, dans la majorité des études sur la contamination des eaux souterraines, les sulfamides et en particulier le sulfaméthoxazole sont les ATB les plus quantifiés (Capdeville 2011 ; Joigneaux 2011 ; Kivits *et al.* 2018 ; SIPIBEL 2019 ; Gray, Todd et Hershey 2020 ; Renau-Pruñonosa *et al.* 2020), en raison notamment de leur solubilité élevée (Gray, Todd et Hershey 2020). Boy-Roura *et al.* (2018) ont également mis en évidence une variabilité de plusieurs ordres de grandeur dans les facteurs de retard des différents ATB qu'ils ont étudiés (ex : ciprofloxacine). Chaque composé se comporte différemment, et ce comportement est principalement conditionné par les caractéristiques du milieu solide et des apports en eau.

6.2.3 Devenir spatio-temporel dans les milieux terrestres

Différentes voies d'exposition conduisent à la contamination des sols agricoles par des ATB mais les voies principales sont les amendements organiques, l'irrigation avec des eaux usées traitées et le pâturage avec des animaux traités aux ATB. Dans les sols, les ATB sont soumis à des processus abiotiques (sorption, photolyse, lyse chimique) et biotiques (bioaccumulation et biotransformation) qui déterminent leur distribution dans les différents compartiments de l'environnement. Le niveau d'accomplissement de chacun de ces processus dépend des propriétés physico-chimiques des ATB mais aussi des conditions pédoclimatiques incluant la température, l'humidité et les propriétés physico-chimiques des sols (Gallego et Martin-Laurent 2020).

Parmi les processus abiotiques, l'adsorption des ATB est probablement l'un des plus importants car il conditionne grandement la susceptibilité au transfert et la biodisponibilité des ATB qui conditionne la pression de sélection pour l'émergence de BRA et la dispersion de GRA (Díaz-Cruz, López de Alda et Barceló 2003). Ainsi, des ATB tels que les tétracyclines, les macrolides, la sulfaméthazine ou les quinolones forment des complexes stables avec les argiles, conduisant à leur adsorption (Hamscher *et al.* 2005 ; Awad *et al.* 2016). Pour certains sulfamides, il a été montré que la désorption était possible conduisant au relargage de faibles concentrations d'ATB sur de longues périodes (Zarfl, Klasmeier et Matthies 2009). Toutefois, les ATB qui ont une cinétique de sorption lente, tels que le sulfaméthoxazole (Sabourin *et al.* 2009), peuvent être entraînés plus facilement par les eaux d'infiltration vers les masses d'eaux. D'une manière générale, les ATB présentant une faible propension à s'adsorber sont ceux qui sont biodisponibles pour les plantes, la macro- et la mesofaune et le microbiote et qui présentent la plus forte mobilité dans les sols, d'où ils peuvent s'échapper pour contaminer les masses d'eaux.

Par ailleurs, dans les sols, des processus abiotique (tel que photodégradation à la surface du sol) et biotique (tel que la biotransformation) peuvent conduire à la transformation des ATB en produits de transformation qui pour certains peuvent être plus stables, plus toxiques et plus persistants que les substances actives. La photodégradation de sulfamides et de tétracyclines a été observée à la surface de sols amendés avec du lisier de porcs contaminé avec ces ATB (Thiele-Bruhn et Peters 2007). La biotransformation des ATB est principalement catalysée par des micro-organismes qui au cours de leur évolution se sont dotés d'un arsenal enzymatique leur permettant non seulement de détoxifier leur environnement mais aussi d'accéder à des nutriments pour leur croissance même dans des environnements oligotrophes, principalement *via* des transformations co-métabolique et métabolique, respectivement. Dans les sols, la biodégradation métabolique des ATB a été montrée pour différents sulfamides (Topp *et al.* 2013 ; Chen *et al.* 2019).

L'ensemble de ces processus abiotiques et biotiques contribue à la fonction de biofiltration des sols qui détermine le devenir des ATB et leur impact sur le microbiote des sols. Ces processus pour la plupart interviennent simultanément et sont influencés par la nature des matrices et les conditions pédoclimatiques.

Ainsi, les ATB peuvent être préservés par les constituants des PRO ; plusieurs ATB comme les tétracyclines (DT90 jusqu'à 422 jours), les quinolones (DT90 = 100 - 5 800 jours), les macrolides (DT90 = 18 - 1 000 jours), les lincosamides (DT90 = 135 - 1 400 jours) et les pleuromutilines (DT90 = 49 - 1 100 jours) persistent sur de longues périodes dans les fumiers issus de différents types d'élevage (poulets, porcs, bovins) (Berendsen *et al.* 2018). À l'exception des macrolides, la dissipation de la plupart des ATB dans les PRO est principalement un processus abiotique. Le compostage des PRO peut conduire à la dégradation de 50 à 99 % de certains ATB, tels que les tétracyclines (Xie, Shen et Zhao 2018). Il peut aussi conduire à la formation de résidus d'ATB liés aux matières organiques en décomposition (Kim *et al.* 2012). Le compostage réalisé en conditions thermophiles et aérobies contribue à diminuer la quantité d'ATB extractible, (Youngquist, Mitchell et Cogger 2016 ; Oliver *et al.* 2020). Par ailleurs, plusieurs études montrent que les concentrations en ATB dans les sols agricoles amendés avec des PRO demeurent faibles en raison de l'application de doses raisonnées et de l'ensemble des mécanismes abiotiques et biotiques régissant le devenir des ATB dans les sols.

Plusieurs études suggèrent que le travail superficiel des sols amendés avec du fumier liquide contaminé avec des ATB entraîne une réduction du transport vertical par infiltration des ATB et réduit le transport par ruissellement (Kay, Blackwell et Boxall 2004 ; Kreuzig *et al.* 2005). De la même manière, l'importance du travail du sol a été soulignée dans des études montrant des émissions plus élevées de sulfamides dans les eaux de ruissellement de prairies amendées que dans celles de parcelles cultivées où le sol avait été travaillé superficiellement. Barrios *et al.* (2020) ont montré que le transport d'ATB (chlortétracycline) et de gènes de résistance à cet ATB dans les eaux de ruissellement est fonction du moment de l'épandage du lisier, du pédoclimat, des propriétés physico-chimiques du sol et de l'ATB. Les résultats suggèrent qu'un intervalle de plus de deux semaines entre l'application de matières organiques contaminées (fumier/lisier) avec des ATB et la pluie réduit de manière significative les niveaux d'ATB dans les eaux. D'autres travaux font état que le mode d'épandage a peu d'impact sur le transfert des ATB des PRO aux eaux du sol (Joy *et al.* 2013). Il est aussi important de noter que les propriétés de sorption des ATB aux particules minérales et/ou organiques conditionnent la propriété de biofiltration des sols qui est un phénomène majeur de régulation du transport des contaminants organiques, dont les ATB, dans le sol et dans les eaux souterraines.

Par ailleurs, les conditions pédoclimatiques, notamment les précipitations, conditionnent le devenir des ATB dans les sols. Pan et Chu (2017) ont observé que la durée des précipitations et le pH de l'eau de pluie affectaient la migration verticale d'ATB vétérinaires (tétracycline, sulfaméthazine, norfloxacine, érythromycine et chloramphénicol) apportés par des fumiers appliqués à la surface d'une colonne de sol. De plus, la biodégradation des β-lactamines

dépend de l'humidité du sol (Braschi *et al.* 2013) et les cinétiques de biodégradation des sulfamides dépendent de la température du sol (Rosendahl *et al.* 2011).

6.3 Synthèse

Les concentrations en ATB dans les sources de contamination et les compartiments récepteurs mesurées en France ont été agrégées par ATB et par matrice, en attachant une valeur aux résultats inférieurs à une limite analytique[27]. Pour les eaux de surface et les eaux souterraines, les données produites par les équipes de recherche ont été complétées par les données recensées dans le système d'information sur l'eau (SIE). Toutefois, en raison des disparités entre les deux jeux de données, ils n'ont pas pu être agrégés. De plus, la grande disparité du nombre d'échantillons prélevés par matrice (la majorité des études portant sur la phase dissoute des eaux de surface), du nombre d'analyses par ATB et du nombre d'ATB analysés par matrice, n'a permis d'obtenir qu'une image partielle de la contamination de l'environnement par les ATB en France. Les comparaisons entre compartiments sont donc à effectuer avec précaution.

En France, les concentrations en ATB dans les compartiments étudiés (eaux, sédiments, sols) restent faibles comparativement aux pays dont les systèmes d'assainissement sont moins performants, ou aux régions industrielles des pays producteurs d'ATB (ex : Inde, Chine).

- L'essentiel des ATB retrouvés dans l'environnement sont introduits par des sources anthropiques.
- Les apports continus en ATB confèrent à certains composés un caractère de contaminant ubiquiste.
- La persistance de certains ATB joue un rôle majeur dans la contamination de l'environnement :
  - Les ATB les plus persistants sont les plus fréquemment quantifiés : quinolones, fluoroquinolones, macrolides et sulfamides ;
  - Les β-lactamines, ATB les plus consommés, sont rarement quantifiés dans l'environnement en raison de leur forte dégradabilité.
- La dégradation de certains ATB génère des produits de transformation dont la présence, la persistance dans l'environnement et les propriétés « antibiotiques » sont méconnues.

6.3.1 Milieux aquatiques et leurs sources de contamination

La figure 19 illustre les concentrations mesurées par les équipes de recherche dans les eaux usées traitées et dans les compartiments récepteurs des milieux aquatiques pour six ATB[28] appartenant à des classes pharmacologiques différentes. Les principales conclusions sont :

- Les rejets des STEU constituent la source principale d'ATB dans les milieux aquatiques. Elle est complétée pour certains ATB par un apport significatif de la contamination diffuse due en particulier au ruissellement et/ou à l'infiltration des eaux depuis les sols agricoles.

[27] Les résultats inférieurs à une limite analytique ont été substitués par la moitié de cette limite analytique et ceux compris entre la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) par la somme des deux limites analytiques divisée par deux.

[28] Ces ATB ont été sélectionnés comme étant ceux pour lesquels le plus grand nombre de données est disponible dans leur classe pharmacologique, pour l'ensemble des matrices considérées.

- En France, les concentrations médianes des ATB quantifiés au moins une fois (données des travaux de recherche) sont inférieures ou égales à :
  - 17 000 ng.L^{-1} dans les eaux usées brutes hospitalières,
  - 300 ng.L^{-1} dans les eaux usées traitées de STEU,
  - 12 ng.L^{-1} dans la phase dissoute des eaux de surface,
  - 6 ng.L^{-1} dans la phase dissoute des eaux souterraine.
- Des ATB ont été quantifiés dans la quasi-totalité des échantillons d'**eaux usées traitées de STEU**. Une plus grande diversité d'ATB et des concentrations plus élevées ont été observées dans les eaux usées traitées de STEU recevant des eaux usées hospitalières.
- Dans la phase dissoute des **eaux de surface**, les concentrations d'ATB mesurées en aval des rejets de STEU sont plus élevées qu'en amont. Les concentrations décroissent progressivement entre deux zones de rejets (ex : entre les rejets de deux STEU consécutives) : cette diminution est due à la dilution, la sorption et la dégradation dans le milieu récepteur. Une partie des variations temporelles des concentrations en ATB s'explique par :
  - Des ruissellements de surfaces contaminées consécutifs à des évènements pluvieux et/ou des surverses de réseaux unitaires (déversement d'eaux usées non traitées ou partiellement traitées),
  - Des variations de débit des cours d'eau modifiant le facteur de dilution.
- Dans **les périphytons et les sédiments des eaux de surface,** les concentrations sont inférieures à 100 ng.g MS^{-1}. Alors que les occurrences et les concentrations médianes sont généralement plus élevées dans les périphytons que dans les sédiments, les concentrations maximales ont été mesurées dans les sédiments.
  - Les ATB sorbés sur les sédiments de surface sont remobilisables lors d'événements perturbants la colonne sédimentaire.
  - Les phénomènes de dégradation réduits dans les sédiments conduisent à un archivage des contaminants dans la colonne sédimentaire.
- À l'exception du sulfaméthoxazole, les ATB ne sont que très rarement quantifiés dans les **eaux souterraines**. Toutefois, une fois dans les nappes, les ATB peuvent persister en raison de cinétiques de dégradation très lentes.
- Bien qu'identifié comme une source de contamination potentielle des milieux récepteurs, l'impact des pisciculture sur les concentrations en ATB dans l'environnement n'a pas pu être étudié en raison d'un manque de données.

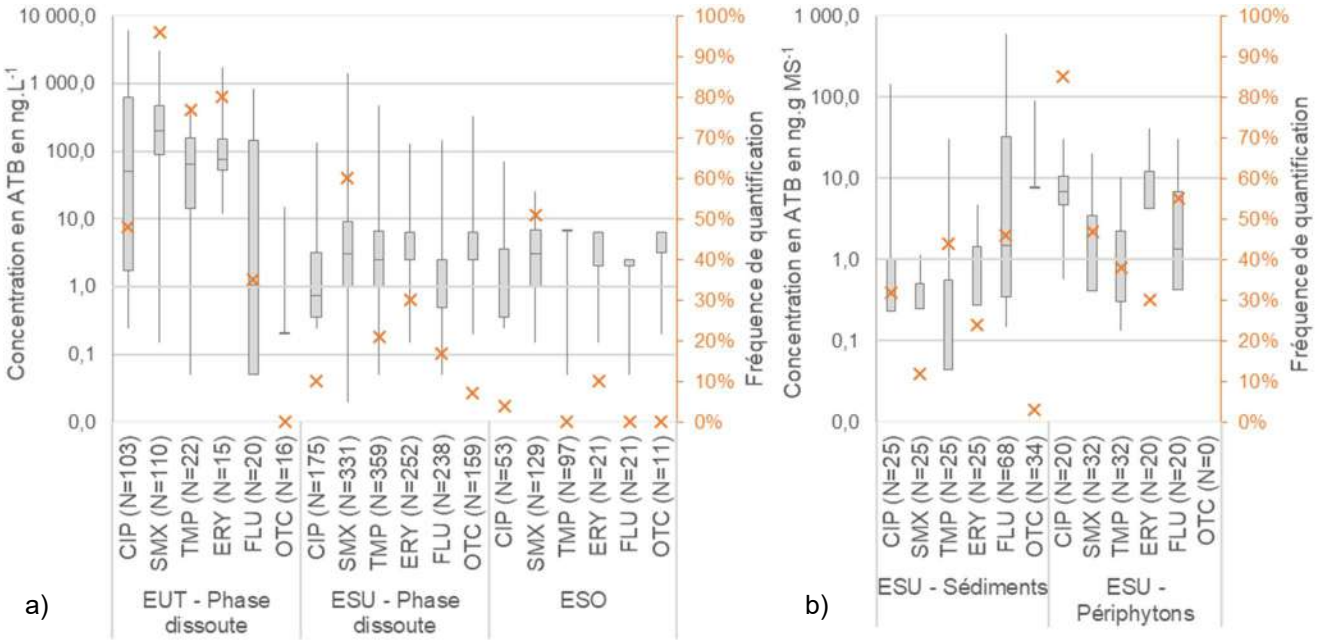


Figure 19. Concentrations de six antibiotiques de classes pharmacologiques différentes mesurées dans les phases dissoutes d'eaux usées traitées et des milieux aquatiques (a) et dans les sédiments et les périphytons (b) en France.

Les ATB sélectionnés sont ceux pour lesquels le plus grand nombre de données est disponible dans leur classe pharmacologique, pour l'ensemble des matrices considérées. Les données ont été produites dans le cadre de programmes de recherche et sont représentées sous forme de boîtes à moustaches (min, P25, médiane, P75 et max) pour les concentrations et de croix pour les fréquences de quantification. Les résultats inférieurs à la limite analytique ont été substitués[27].
CIP=ciprofloxacine, fluoroquinolone ; SMX=sulfaméthoxazole, sulfamide ; TMP=triméthoprime ; ERY=érythromycine, macrolide ; FLU=fluméquine, quinolone ; OTC=oxytétracycline, tétracycline ; EUT=eaux usées traitées ; ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; MS=matières sèches.

6.3.2 Milieux terrestres et ses sources de contamination

Dans les sols, les seules données existantes portent sur les sols amendés par des PRO. La figure 20 illustre les concentrations mesurées en France dans les boues de STEU, les PRO d'élevage solides et les sols pour six ATB[6].

- Dans **les boues de STEU**, les quinolones et les fluoroquinolones sont les ATB les plus fréquemment quantifiés et dont les concentrations sont les plus élevées (médianes entre 2 600 et 3 000 ng.g MS^{-1} pour l'ofloxacine, la ciprofloxacine et la norfloxacine). Les autres ATB sont retrouvés à des concentrations médianes inférieures à 62 ng.g MS^{-1}.
- La ciprofloxacine est l'ATB le plus fréquemment quantifié dans les **PRO d'élevage solides** (44 %). Cinq ATB (trois tétracyclines et deux fluoroquinolones) présentent des concentrations maximales supérieures à 1 000 ng.g MS^{-1}.
- Dans les **PRO d'élevage liquides**, quatre ATB (deux tétracyclines, une quinolone et un sulfamide) présentent des concentrations maximales supérieures à 1 500 ng.L^{-1}.
- Dans **les sols amendés**, les concentrations médianes observées pour les ATB quantifiés au moins une fois ne dépassent pas 2,1 ng.g MS^{-1}.
  - Les ATB détectés dépendent du type et de la source de PRO.
  - Les variations temporelles de concentrations observées dépendent de la périodicité des amendements par les PRO.
  - Le travail superficiel du sol et un délai de plus de deux semaines entre l'épandage et les événements pluvieux diminuent la mobilité des ATB depuis les sols amendés.

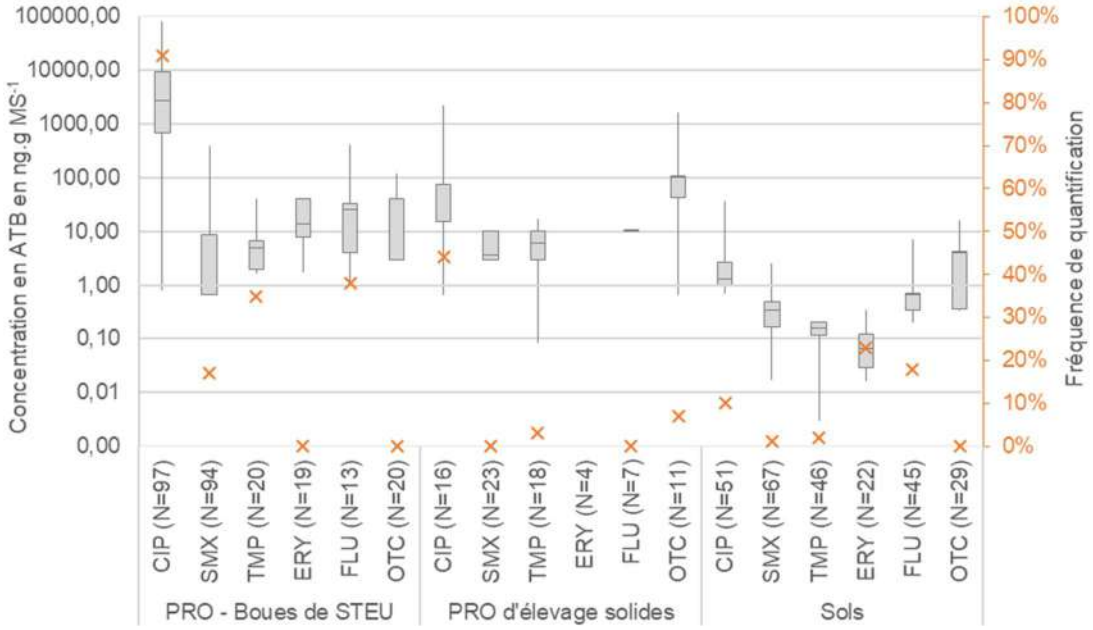


Figure 20. Concentrations de six antibiotiques de classes pharmacologiques différentes mesurées dans les boues de stations de traitement des eaux usées, les produits résiduaires organiques d'élevage solides et les sols en France.

Les ATB sélectionnés sont ceux pour lesquels le plus grand nombre de données est disponible dans leur classe pharmacologique, pour l'ensemble des matrices considérées. Les données ont été produites dans le cadre de programmes de recherche et sont représentées sous forme de boîtes à moustaches (min, P25, médiane, P75 et max) pour les concentrations et de croix pour les fréquences de quantification. Les résultats inférieurs à la limite analytique ont été substitués[27].

CIP=ciprofloxacine, fluoroquinolone ; SMX=sulfaméthoxazole, sulfamide ; TMP=triméthoprime ; ERY=érythromycine, macrolide ; FLU=fluméquine, quinolone ; OTC=oxytétracycline, tétracycline ; EUT=eaux usées traitées ; ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; MS=matières sèches.

7 Contamination de l'environnement par les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance

Depuis l'utilisation des ATB dans les activités humaines (médecine, agriculture, …), les BRA et les GRA sont devenus omniprésents dans l'environnement à des concentrations liées à l'importance de toute action anthropique. La contamination de l'environnement par les ATB (voir chapitre 6), qui s'explique par leur utilisation en médecines humaine et vétérinaire, s'accompagne d'une contamination de l'environnement par BRA et les GRA.

Comme pour les ATB, les sources de contamination en BRA et GRA sont

- Les rejets de STEU qui collectent les eaux domestiques mais également les eaux d'activités de soins,
- Les eaux usées d'activités de production : abattoirs, pisciculture mais également sites de fabrication des ATB,
- Les PRO utilisés pour amender les sols agricoles.

Les BRA et les GRA vont ainsi être retrouvés dans les compartiments environnementaux récepteurs :

- Les milieux aquatiques : eaux de surface, souterraines ou côtières et biote aquatique,
- Les milieux terrestres : sols, rhizosphère et phyllosphère, et faune sauvage[29].

Ce chapitre analyse les données des principales études françaises sur la contamination par les BRA et les GRA de l'environnement, de la source contaminée jusqu'au milieu récepteur impacté. En cas de manque patent de données françaises, il est alors fait référence à des données issues d'études réalisées dans des pays qui ont un cadre réglementaire et des conditions de prescriptions proches de ceux de l'État français.

7.1 Bilan des données de contamination de l'environnement par les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance en France

7.1.1 Sources de contamination de l'environnement

7.1.1.1 Les stations de traitement des eaux usées

Les STEU sont actuellement des sources majeures de BRA et de GRA dans l'environnement (voir § 5.1.1) dont la quantité dépend du type d'eaux usées brutes traitées et de l'efficacité de l'épuration. Les STEU reçoivent majoritairement des eaux usées domestiques et éventuellement des eaux usées d'activités de soins (hôpitaux, cliniques, EHPAD), des eaux usées d'activités industrielles (industries, restaurants, blanchisseries…) et, pour la plupart d'entre elles, des eaux de ruissellement. Toutefois, la contribution relative en BRA et GRA des rejets de STEU au regard des apports diffus d'origine agricole dans l'environnement est peu renseignée.

[29] La contamination des végétaux ne sera pas abordée dans ce rapport du fait du manque de données en France.

7.1.1.1.1 Eaux usées de stations de traitement des eaux usées

Les STEU sont des ouvrages essentiels pour le contrôle de la dissémination des bactéries d'origine humaine, des BRA et des GRA dans l'environnement. Elles représentent le dernier rempart avant le rejet dans le milieu naturel. Lorsqu'elles ne possèdent pas de traitement de désinfection, les STEU conventionnelles permettent de réduire d'environ 2 log les concentrations en bactéries d'origine fécale. Néanmoins, leur efficacité dépend grandement du bon fonctionnement et de l'entretien des infrastructures d'assainissement ainsi que des types de procédés utilisés. Bien qu'il soit difficile de conclure sur les efficacités des traitements en fonction de la typologie des procédés en place, une meilleure élimination des bactéries est possible *via* la mise en œuvre de technologies plus performantes, telles que des procédés de désinfection (UV ou ozonation) et/ou des procédés de filtration membranaire en lieu et place des étapes de séparation liquide/solide.

7.1.1.1.1.1 Bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA)

Le GT a retenu les études françaises portant sur *E. coli*, *E. coli* producteurs de BLSE (*E. coli* BLSE), les entérocoques et les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE).

L'analyse des données de la littérature montre qu'indépendamment du type de bactéries (*E. coli* ou entérocoques) et de leur résistance à un ATB, les traitements des STEU permettent de réduire leurs concentrations (figures 21 et 22).

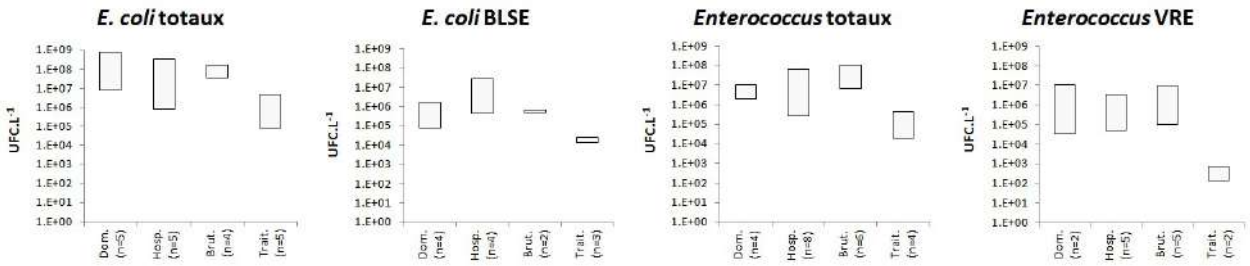


Figure 21. Concentration en *E. coli*, *E. coli* BLSE, entérocoques et VRE dans les eaux usées domestiques (dom.), eaux usées d'établissements de soins (hosp.), les eaux usées brutes (brut.) et eaux usées traitées (trait.) par les STEU en France[a] et en Europe[b].

[a] (Servais et Passerat 2009 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Slekovec *et al.* 2012 ; Leclercq *et al.* 2013 ; Bréchet *et al.* 2014 ; Drieux *et al.* 2016) ; [b] (Blanch *et al.* 2003 ; Caplin, Hanlon et Taylor 2008 ; Galvin *et al.* 2010 ; Kwak *et al.* 2015). Les boîtes représentent les valeurs minimales et maximales de séries dont la taille est précisée en abscisse.

Les concentrations en *E. coli* et entérocoques diminuent en moyenne de 1,5 et 2 log, respectivement ; celles des *E. coli* BLSE et des VRE sont réduites de 2 à 3 log, respectivement (figure 22).

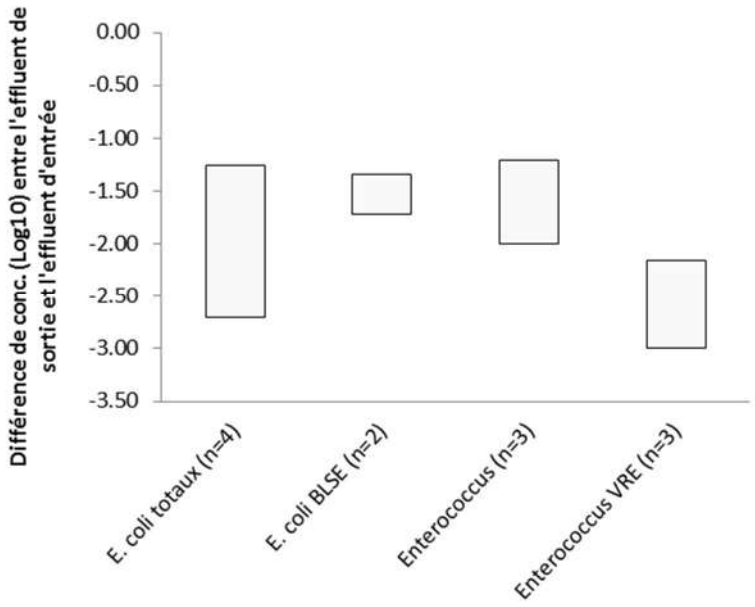


Figure 22. Diminution des concentrations en *E. coli*, *E. coli* BLSE, entérocoques et entérocoques VRE par les STEU.

(Servais et Passerat 2009 ; Galvin *et al.* 2010 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Slekovec *et al.* 2012 ; Leclercq *et al.* 2013 ; Varela *et al.* 2013 ; Bréchet *et al.* 2014 ; Gouliouris *et al.* 2019). Les boîtes représentent les valeurs minimales et maximales de séries dont la taille est précisée en abscisse.

Alors que les concentrations en VRE sont du même ordre de grandeur dans les eaux usées brutes et hospitalières (~10^6 UFC.L^{-1}), les eaux usées hospitalières sont plus chargées en *E. coli* BLSE (8,4.10^6 UFC.L^{-1}) que les eaux usées brutes (6,5.10^5 UFC.L^{-1} ; figure 21). Il convient de souligner que malgré l'abattement, les *E. coli* BLSE et les VRE sont encore quantifiés dans les eaux usées traitées de STEU à des niveaux pouvant atteindre 2,5.10^4 et 7.10^2 UFC.L^{-1}, respectivement.

Selon Passerat *et al.* (2010), les proportions des *E. coli* résistants à au moins un antibiotique étaient de 41 % dans les eaux usées domestiques et de 71 % dans les eaux usées hospitalières en France.

7.1.1.1.1.2 Gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés (GRA)

De nombreuses études ont caractérisé le contenu en GRA des eaux usées brutes (recevant ou non des rejets hospitaliers) et des eaux usées traitées avant leur rejet dans les eaux de surface.

La proportion de bactéries porteuses d'intégrons de résistance (IR) isolées dans les eaux usées brutes varie entre 10 et 35 %. La concentration d'IR est estimée dans les eaux brutes entre 10^{10} et 10^{12} copies.L^{-1}. Le traitement par la STEU réduit de 2 à 3 log cette concentration avec 10^7 à 10^9 copies.L^{-1} dans les eaux usées traitées. Comme pour les BRA, l'abattement de la concentration des IR varie selon les traitements mis en place dans la STEU (boues activées, procédés membranaires, traitement tertiaire) et le type d'eaux usées (Stalder *et al.* 2014 ; An *et al.* 2018).

Pärnänen *et al.* (2019) ont quantifié des GRA en entrée et sortie de 12 STEU européennes hors France (Portugal, Espagne, Chypre, Irlande, Allemagne, Norvège et Finlande). Les

résultats de ces « résistomes urbains », exprimés en abondance relative[30] montrent une séparation des pays en fonction de leur consommation d'ATB : d'une part, les pays à consommation élevée (Portugal, Espagne, Chypre), et d'autre part les pays à consommation faible (Allemagne, Norvège, Finlande). D'après cette étude, la France se positionnerait dans le groupe des pays forts consommateurs d'ATB. La plupart des GRA isolés codaient une résistance aux ATB de première génération. Toutes les eaux usées arrivant aux STEU contenaient trois catégories de GRA :

- Des gènes conférant une résistance spécifique à une classe d'antibiotiques comme les aminosides (*aadA, strB)*, les β-lactamines (*bla*$_{GES}$, *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{VEB}$), les macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) (*ere*(A), *erm*(F), *matA/mel*), les sulfamides (*sul1*), les tétracyclines (*tet*(M), *tet*(Q)),
- Des gènes codant des systèmes qui confèrent des résistances à plusieurs agents antimicrobiens notamment les pompes à efflux (*qacEΔ1, qacH*),
- Des gènes, plus rarement détectés, codant des co-résistances aux ATB de dernier recours (*bla*$_{NDM-1}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *mcr-1* ou *vanA*).

Les abondances relatives des gènes de la plupart des classes de résistance (aminosides, sulfamides, β-lactamines, MLS, tétracyclines, quinolones, amphénicols) sont plus élevées dans les eaux usées traitées des STEU des pays à forte consommation d'antibiotiques que dans celles des pays à faible consommation d'antibiotiques. Les abondances absolues de tous les GRA diminuent après traitement par les STEU quel que soit le pays (Ju *et al.* 2019).

7.1.1.1.2 Eaux usées hospitalières

Les eaux usées hospitalières ne représentent qu'une faible proportion des eaux usées brutes urbaines (Kümmerer 2004 ; Buelow *et al.* 2018). Ainsi, les rejets d'un centre hospitalier universitaire de 900 lits arrivant à une STEU traitant 285 000 équivalents-habitants représentent en volume 2,2 % des eaux usées brutes et sont la source de 13,8 % du flux des IR. Les eaux usées hospitalières contiennent 10 fois plus de bactéries hébergeant des IR de classe 1 que les eaux usées domestiques (Stalder *et al.* 2014). Les études menées depuis plusieurs années sur le site atelier français SIPIBEL ont mesuré par qPCR des concentrations d'*intI*1 autour de 10^{11} copies.L^{-1} dans les eaux usées hospitalières, contre 10^{10} copies.L^{-1} dans les eaux usées domestiques, sans que cette différence soit significative. L'abondance relative en intégrons était comprise entre 0,1 et 0,7 dans les eaux usées hospitalières étudiées et ne dépassait pas 0,1 dans les eaux usées domestiques (Stalder *et al.* 2014). L'étude de Buelow *et al.* (2020), menée sur 3 ans sur le même site, montre que les eaux usées domestiques contiennent une proportion plus faible d'IR de classe 1 contenant au moins une cassette de gènes que les eaux hospitalières. Cette donnée est confirmée à l'échelle européenne par l'étude Interreg « No Pills ». Cependant, la diversité des cassettes de gènes est plus importante dans les eaux domestiques que dans les eaux usées hospitalières (Buelow *et al.* (2020).

Les GRA des eaux usées hospitalières reflètent la présence de BRA ou la consommation d'ATB spécifiquement hospitaliers. Ainsi, le principal gène de résistance à la méticilline (*mecA*) a été détecté uniquement dans des eaux usées hospitalières en Allemagne (Schwartz *et al.* 2003), rappelant l'origine très majoritairement nosocomiale du SARM. Dans une étude suédoise, Borjesson *et al.* (2009) ont décrit des abondances relatives de gènes impliqués dans la résistance à la méticilline (*mecA*), à la tétracycline (*tet*(A) et *tet*(B)), et aux aminosides (*aac(6')-Ie* et *aph(2'')*), plus élevées dans des eaux usées hospitalières que dans les eaux

[30] Nombre de copies de gène ciblé exprimé en fonction du nombre de copies du gène codant l'ARN16S, soit en fonction du nombre total de bactéries.

usées de STEU. Dans l'étude de Stalder *et al.* (2014), les eaux usées hospitalières étaient plus riches en gènes *aacA* et *aadB*, conférant une résistance aux aminosides (ATB presque exclusivement hospitaliers), montrant ainsi le rôle de la pression ATB hospitalière dans la sélection de bactéries hébergeant des IR avec des cassettes de gènes de résistance aux aminosides.

Les études sur le résistome ont montré des différences significatives dans les classes de GRA retrouvés dans le microbiome autochtone des eaux usées hospitalières et domestiques. Dans les eaux usées hospitalières est trouvée une proportion plus importante des classes de GRA codant la résistance aux fluoroquinolones, au chloramphénicol, aux aminosides, à la vancomycine, aux β-lactamines, aux sulfamides, aux ammoniums quaternaires, à la bacitracine et des gènes codant tous les types d'intégrases associées aux EGM.

7.1.1.2 Eaux usées d'abattoirs

En France, les quelques études publiées ne concernent que des abattoirs d'ongulés domestiques[31]. Les études qui se sont intéressées aux BRA et aux GRA dans les eaux usées d'abattoirs se sont focalisées sur la caractérisation du niveau de résistance de souches d'*E. coli* isolées dans les eaux usées et les boues de ces abattoirs.

7.1.1.2.1 Contamination des eaux usées brutes d'abattoirs par des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques

Bibbal *et al.* (2014) ont compilé les concentrations d'*E. coli* dans les eaux usées brutes de différents abattoirs d'ongulés domestiques au cours de plusieurs campagnes de prélèvements. Les effluents bruts contenaient 10^8 à 10^9 UFC.L^{-1} d'*E. coli*, données comparables aux concentrations d'*E. coli* des eaux usées domestiques (§ 7.1.1.1.1).

Dans une étude réalisée en 2011 dans deux abattoirs, l'un de bovins adultes et l'autre de veaux, Um *et al.* (2016) ont montré que dans les eaux usées brutes provenant de l'abattoir de bovins adultes, 5,0 % des souches d'*E. coli* (N=40) étaient résistantes à au moins un des ATB testés. Ce pourcentage était de 87,5 % dans les eaux usées brutes de l'abattoir de veaux. Les pourcentages de souches multirésistantes (résistantes à ≥ 3 classes ATB différentes) étaient respectivement de 2,5 % et 80,0 % dans les eaux usées brutes d'abattoirs de bovins adultes et de veaux. Des souches d'*E. coli* porteuses de gènes *intI1* (57,5 %) et *intI2* (2,5 %) n'ont été identifiées que dans les eaux usées brutes de l'abattoir de veaux. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'autres études indiquant un niveau de résistance élevé des souches d'*E. coli* isolées du microbiote intestinal des veaux (Um *et al.* 2016). Au cours des années 2002-2003, trois campagnes de prélèvements ont été réalisées dans six abattoirs français d'ongulés domestiques (Bibbal *et al.* 2009). Les animaux abattus étaient des bovins adultes, des veaux, des petits ruminants et/ou des porcs. La recherche de résistance sur 54 souches isolées dans les eaux usées brutes a montré que 50,0 % d'entre elles étaient résistantes à au moins 1 ATB.

7.1.1.2.2 Efficacité du traitement des eaux usées brutes d'abattoirs sur les populations d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques

Les stations de traitement des effluents d'abattoirs sont majoritairement équipées de procédés de traitement par boues activées. Ce type de procédé conduit à une diminution moyenne de 2 log du nombre de souches d'*E. coli* dans l'effluent traité (Bibbal *et al.* 2014). Ainsi, on estime que ces stations rejettent environ 10^5-10^6 UFC.L^{-1} d'*E. coli* vers le milieu récepteur (*i.e.* même ordre de concentrations que les STEU).

[31] Ongulés domestiques : animaux domestiques des espèces bovine (y compris buffles et bisons), porcine, ovine et caprine, ainsi que des solipèdes domestiques (chevaux, ânes, mulets).

L'effet du traitement par boues activées dans les STEU d'abattoirs sur les proportions de souches d'*E. coli* résistantes a été évalué dans deux études françaises (Bibbal *et al.* 2009 ; Um *et al.* 2016). Elles ont montré que le traitement épuratoire des eaux usées brutes ne modifie pas la proportion de souches d'*E. coli* résistantes dans les eaux usées traitées ou dans les boues liquides ou épaissies. Comme dans les STEU urbaines (figure 22), le traitement épuratoire dans les stations de traitement des eaux usées d'abattoirs ne conduirait donc ni à une élimination préférentielle ni à une sélection préférentielle de souches d'*E. coli* résistantes. Les boues destinées à l'épandage produites par les STEU d'abattoirs contiennent jusqu'à 10^5 UFC.g^{-1} d'*E. coli*, soit moins que celles produites pas les STEU urbaines (10^7-10^8 UFC.g^{-1}) (Bréchet *et al.* 2014).

7.1.1.2.3 Caractéristiques des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques isolées des eaux usées et boues d'abattoirs

Les figures 23 et 24 présentent les pourcentages de souches d'*E. coli* résistantes, par ATB, dans des STEU d'abattoirs, tous points de prélèvement confondus (Bibbal *et al.* 2009 ; Um *et al.* 2016). Les souches résistantes d'*E. coli* étaient majoritairement résistantes à la tétracycline. Elles étaient également fréquemment résistantes à l'ampicilline, aux sulfamides, au triméthoprime, et à la streptomycine. Parmi les souches isolées dans les STEU d'abattoirs de veaux, 73,1 % étaient multirésistantes et 18,8 % étaient résistantes à au moins six ATB.

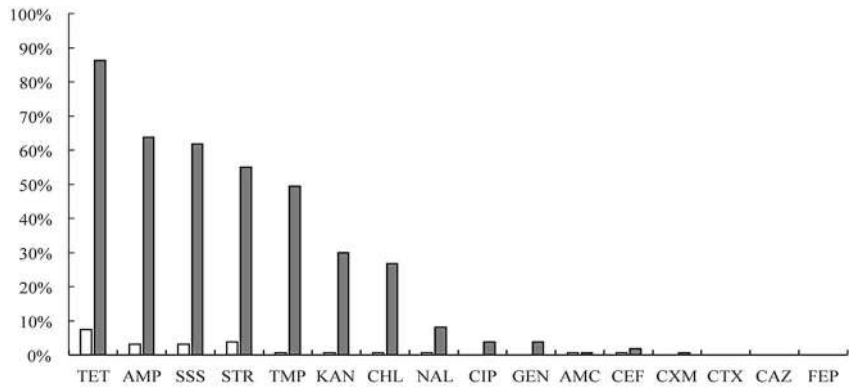


Figure 23. Proportion d'isolats d'*E. coli* antibiorésistants isolés de stations de traitement des eaux usées d'un abattoir de bovins adultes (bandes vides) et d'un abattoir de veaux (bandes pleines) (Um *et al.* 2016).

Une campagne avec quatre points de prélèvements : eaux usées brutes, eaux usées traitées, boues activées, boues centrifugées, N=160 isolats d'*E. coli* par abattoir. AMP=ampicilline ; AMC=amoxicilline-acide clavulanique ; CAZ=ceftazidime ; CEF=céphalothine ; CTX=céfotaxime ; CXM=céfuroxime ; CHL=chloramphénicol ; CIP=ciprofloxacine ; FEP=céfépime ; GEN=gentamicine ; KAN=kanamycine ; NAL=acide nalidixique ; SSS=sulfamides ; STR=streptomycine ; TET=tétracycline ; TMP=triméthoprime.

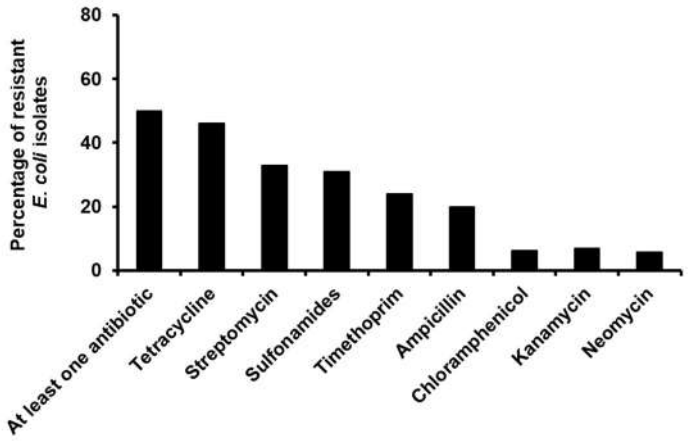


Figure 24. Proportion d'isolats d'*E. coli* antibiorésistants isolés de six stations de traitement des eaux usées d'abattoirs de bovins adultes, veaux, petits ruminants, et/ou porcs (Bibbal *et al.* 2009).

Trois campagnes de prélèvements (2002-2003) avec chacune trois points de prélèvements : eaux usées brutes, eaux usées prétraitées, eaux usées traitées, N=159 isolats d'*E. coli*.

Les GRA les plus fréquemment retrouvés codent la résistance à la tétracycline (*tet*(A)), à l'ampicilline (bla_{TEM}), aux sulfamides (*sul*), à la streptomycine (*strA, strB, aadA1*), et au chloramphénicol (*catI*). Plusieurs déterminants de résistance à un même ATB pouvaient être observés au sein d'une même souche.

Des isolats d'*E. coli* résistants aux ATB critiques ont aussi été retrouvés dans les effluents et boues de STEU d'abattoirs. Ainsi, six souches résistantes à la ciprofloxacine ont été isolées dans les eaux usées traitées et les boues d'une STEU d'abattoirs de veaux (N=160) (Um *et al.* 2016). Une autre étude a évalué le pourcentage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE dans les effluents d'une STEU recevant des eaux usées d'un abattoir. La prévalence de souches productrices de BLSE était de 1,7 % dans les eaux usées domestiques, 0,2 % dans les eaux usées brutes de l'abattoir, et 0,2 % dans l'eau usée traitée (Diallo *et al.* 2013). Les gènes identifiés étaient bla_{TEM-52}, $bla_{CTX-M-14}$, et $bla_{CTX-M-1}$. Sur ce même site, d'autres campagnes de prélèvements ont permis la recherche spécifique de souches d'*E. coli* productrices de BLSE sur des géloses additionnées de C3G. L'étude a montré que le gène $bla_{CTX-M-1}$ était majoritairement identifié parmi les souches productrices de BLSE isolées dans les eaux usées de l'abattoir (Dupouy *et al.* 2016).

7.1.1.2.4 Conclusions sur les données françaises

Peu d'études françaises caractérisent la résistance de la bactérie indicatrice *E. coli*. Ces études montrent que le traitement des STEU d'abattoirs réduit la concentration des *E. coli* totaux et résistants aux ATB rejetés dans l'environnement dans des proportions similaires (2 log). Les eaux usées traitées et les boues destinées à être épandues contiennent des souches d'*E. coli* résistantes aux ATB.

Les isolats d'*E. coli* résistants sont majoritairement résistants à la tétracycline. De même, les isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE et des souches résistantes aux fluoroquinolones ont également été retrouvées mais à des prévalences faibles.

7.1.1.3 Rejets d'usine productrice d'antibiotiques

L'immense majorité des ATB consommés en France sont importés de l'étranger. Aussi, la contamination de l'environnement en France par les eaux usées de l'industrie pharmaceutique n'est pas connue.

Cependant, des études portant sur les rejets de STEU d'usines chinoises de production de pénicilline G ou d'oxytétracycline, deux antibiotiques exportés dans le monde entier, ont montré une multirésistance plus importante chez les bactéries isolées dans la rivière en aval des points de rejet (Li *et al.* 2009 ; Li *et al.* 2010). De plus, la proportion d'isolats bactériens porteurs d'*intI1* est plus élevée dans les effluents de l'usine de production de pénicilline G et dans la rivière aval (14 % et 9 %, respectivement) que dans la rivière amont (non détectés) (Li *et al.* 2009). De même, 97 % et 86 % des isolats bactériens isolés dans l'effluent de l'usine de production d'oxytétracycline et dans la rivière aval portaient *intI1*, contre 3 % dans la rivière amont (Li *et al.* 2010).

Une étude plus récente sur une usine en Croatie produisant de l'azithromycine (macrolide) a montré un impact des rejets de cette usine sur l'abondance relative des gènes de résistance aux macrolides et la présence d'*intI1* dans les sédiments de la rivière Save, un affluent du Danube (Milaković *et al.* 2019). Les concentrations en azithromycine au voisinage des rejets sont d'environ 1 000 ng.g MS^{-1}. Trois gènes de résistance aux macrolides (*mph*(G), *erm*(B), *msr*(E)) et *intI1* ont principalement été détectés dans les sédiments avec des abondances relatives élevées, montrant que les rejets des effluents industriels contribuent à l'enrichissement de l'ABR, avec une persistance jusqu'à 11 km du point de rejet. Ceci confirme l'effet sélectif de ces ATB sur les bactéries porteuses d'*intI1*. Par ailleurs, cette étude a aussi montré un effet saisonnier sur les populations bactériennes.

7.1.1.4 Eaux en sortie de pisciculture d'eau douce

Ce cas est peu documenté en France et les données disponibles concernent des bactéries autochtones de l'eau ou pathogènes du poisson.

Trois publications (Le Bris *et al.* 2007 ; Naviner *et al.* 2007 ; Naviner *et al.* 2011) s'intéressent plus particulièrement à l'impact du traitement ATB en pisciculture sur la sélection de la résistance chez *Aeromonas* spp., bactérie autochtone des milieux aquatiques. Les deux premières études ont été conduites dans les installations expérimentales de l'Institut national de la recherche agronomique (INRA)[32]. La dernière, conduite en conditions réelles lors d'un épisode infectieux de maladie entérique de la bouche rouge causée par *Yersinia ruckerii*, montre une augmentation transitoire de la proportion des *Aeromonas* résistants à la fluméquine chez les poissons et dans l'eau du bassin.

L'étude de Le Bris *et al.* (2007) a évalué l'impact d'un traitement de sept jours à l'acide oxolinique incorporé dans l'aliment de truites sur la sélection et la persistance d'*Aeromonas* résistants à cet ATB dans l'eau de sortie des bassins et dans les matières fécales des poissons. Les analyses ont été réalisées pendant 21 jours dans un bassin contenant les animaux témoins non traités et dans un bassin contenant des animaux traités. Dans cette étude, des bassins de 200 L étaient alimentés par l'eau potable chlorée du réseau. Les *Aeromonas* isolés dans les bassins ne pouvaient provenir que de la microflore des truites ou de l'alimentation. En raison de la très faible concentration en *Aeromonas* dans l'eau en sortie des bassins, seuls les dénombrements réalisés sur les déjections du fond des bassins étaient interprétables. Dans le bassin des animaux traités, les concentrations en *Aeromonas,* initialement de 8,7 log UFC.g^{-1}, ont diminué de 1,25 log le 2ème jour de traitement. Elles ont augmenté le 7ème jour pour atteindre 8,2 log UFC.g^{-1} en fin d'expérience. Alors que la proportion d'*Aeromonas* résistants n'a pas dépassée 8,5 % dans les fèces des poissons témoins, elle était supérieure à 80 % dans les déjections des poissons traités. Les bactéries résistantes ont persisté pendant les 21 jours de l'expérimentation. Cependant, les conditions expérimentales éloignées des conditions réelles d'un bassin d'élevage ont produit des résultats difficilement extrapolables.

[32] Devenu Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE)

7.1.1.5 Produits résiduaires organiques (PRO)

Les principales sources de contamination des milieux terrestres sont les eaux et les PRO *via* les activités agricoles liées à l'irrigation et la fertilisation des sols.

Dix études réalisées en France depuis 2010 présentent des données sur l'ABR dans des PRO d'origine humaine (boues de STEU) et animale (déjections, fumiers et/ou lisiers d'animaux d'élevage). Ces études, ponctuelles et menées *in situ*, ont consisté à caractériser l'ABR en ciblant des BRA ou des GRA dans des contextes (matrices et lieux géographiques) variés. En raison du contexte, du type de PRO et de l'objectif propre à chaque étude, les résultats sont difficilement comparables. Le GT a donc choisi de présenter les résultats des études indépendamment sans en faire de synthèse.

7.1.1.5.1 Bactéries résistantes aux antibiotiques dans les produits résiduaires organiques

Les BRA ont été recherchées dans des boues de STEU (N=1), des déchets verts (N=1) ainsi que dans 32 PRO d'origine animale : lisier de porcs (N=3), sous-produits issus du traitement biologique du lisier de porcs (N=9), crottin de cheval (N=2), fumier de bovins (N=7) ou de cheval (N=3), compost de fumier de cheval (N=5), fiente de volailles (N=2), litière de volailles (N=1). Les études ont consisté (i) à isoler deux pathogènes opportunistes (*Stenotrophomonas maltophilia* ou *Pseudomonas aeruginosa*) à partir de milieux sélectifs puis à évaluer l'ABR des souches par méthode culturale (Youenou, Brothier et Nazaret 2014 ; Deredjian *et al.* 2016) ou (ii) à dénombrer des entérobactéries sur des milieux de culture sélectifs (*i.e.* additionnés d'ATB) (Combalbert *et al.* 2010 ; Moraru *et al.* 2012).

- **Impact des traitements appliqués aux effluents sur les bactéries résistantes aux antibiotiques**

Dans le projet DIPERPHA[33] (Combalbert *et al.* 2010), les concentrations en entérobactéries capables de se développer en présence de tétracycline (64 $mg.L^{-1}$) ou d'acide nalidixique (16 $mg.L^{-1}$) ont été mesurées dans les effluents produits par trois élevages de porcs équipés d'une unité de traitement biologique par nitrification-dénitrification (bassin N-D) suivi d'une séparation de phases du lisier en décanteur. Deux campagnes de prélèvements ont été réalisées sur chaque élevage (au printemps et à l'automne). Les prélèvements ont été effectués dans la fosse de stockage du lisier brut, dans le bassin N-D, dans la fosse de stockage recevant la fraction épaissie après décantation du lisier traité et dans la lagune recevant la fraction liquide.

Les entérobactéries résistantes à la tétracycline et à l'acide nalidixique dont les concentrations dans les lisiers étaient comprises respectivement entre 4.10^6 et 2.10^7 $UFC.L^{-1}$ et entre 4.10^5 et 10^7 $UFC.L^{-1}$ représentaient 36 % et 17 % des entérobactéries totales. La proportion d'entérobactéries résistantes n'a pas évolué entre les deux séries de prélèvements et est restée stable quel que soit le point de prélèvement.

Ces données suggèrent que le traitement du lisier n'impacte pas la résistance à la tétracycline et à l'acide nalidixique des entérobactéries. L'évolution de la concentration des entérobactéries résistantes le long de la filière de traitement est parallèle à la réduction des concentrations en entérobactéries totales qui a diminué de 3 à 4 log (10^7-10^8 $UFC.L^{-1}$ dans les lisiers bruts à moins de 10^5 $UFC.L^{-1}$ dans les lagunes).

[33] Projet DIPERPHA - Dynamique et Impact des Perturbateurs endocriniens et des composés Pharmaceutiques issus des élevages agricoles (ANR 2007).

Moraru *et al.* (2012) ont évalué la persistance d'entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine au cours du stockage en tas d'une litière de poulets traités aux fluoroquinolones. La température a atteint rapidement 66°C, ce qui a conduit à l'absence de détection des entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine (qui représentaient initialement 1 % des entérobactéries) après 2 jours de stockage.

Dans le projet DAbrAmOr[34] des entérobactéries résistantes à l'ampicilline ont été recherchées dans quatre PRO (fientes de poules, crottins de chevaux traités aux ATB, boues de STEU, déchets verts) destinés à être compostés ainsi que dans leurs composts. Elles ont été retrouvées dans l'ensemble des PRO à une concentration comprise entre $3{,}9.10^{7}$ UFC.g MS^{-1} (dans le crottin) et $9{,}5.10^{9}$ UFC.g MS^{-1} (dans les fientes). Le compostage a conduit à une réduction des concentrations des entérobactéries résistantes de l'ordre de 4 à 5 log pour trois des quatre PRO (fientes, boues, déchets verts) et de plus de 6 log pour le crottin.

Deux études ont mis en évidence la présence dans des fumiers et des composts de fumier d'isolats de deux espèces pathogènes opportunistes pour l'Homme : *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* (Youenou, Brothier et Nazaret 2014 ; Deredjian *et al.* 2016). Parmi ces isolats, outre la résistance naturelle à différents ATB, il a été observé des résistances complémentaires à des ATB d'intérêt clinique.

Dans des crottins, fientes, composts de crottins et des boues de STEU, une analyse des profils phénotypiques d'ABR a été réalisée sur 219 isolats d'entérobactéries, appartenant majoritairement à l'espèce *E. coli*. Sur l'ensemble de ces isolats, 26 % ont un phénotype de type BLSE et 2,3 % ont un phénotype de type céphalosporinase de haut niveau. Les résistances aux β-lactamines, triméthoprime/sulfaméthoxazole et quinolones étaient plus fréquentes chez des isolats d'*E. coli* du crottin, alors qu'un phénotype de type céphalosporinase de haut niveau a été retrouvé majoritairement dans les fientes de poules.

Les entérobactéries résistantes aux quinolones et aux β-lactamines ont été retrouvées plus fréquemment dans les déjections animales (fientes de poulets et crottins de chevaux) que dans les boues de STEU et se sont avérées à la limite de la détection dans les composts, à l'exception du compost de fientes de poulets. Les bactéries porteuses de gènes de résistance aux sulfamides ont été principalement isolées de crottins de chevaux ayant été traités aux ATB (77 % des isolats caractérisés portaient des gènes *sul*). Néanmoins, ces gènes ont été retrouvés en plus faible proportion chez les entérobactéries résistantes issues de fientes de poulets traités aux ATB (14 %) ou dans les boues de STEU (6 %) (Sadikalay 2018).

7.1.1.5.2 Gènes de résistance aux antibiotiques et gènes associés dans les produits résiduaires organiques

Cavé *et al.* (2016) n'ont pas détecté le gène *qnrB* dans un fumier de bovin qui contenait 2.10^{3} copies *sul1*.ng^{-1} d'ADN.

Dans l'étude de Le Devendec *et al.* (2016), portant sur le devenir des gènes bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$, *tet*(M), *erm*(B), *sul1*, *sul2* et *sul3* lors du stockage en tas ou du compostage de litière de volaille, seul le gène $bla_{CTX\text{-}M}$ n'a pas été détecté. Une réduction de l'abondance relative des gènes bla_{TEM}, *tet*(M), *sul1, sul2, sul3* et *erm* a été observée après 6 semaines de compostage ou de stockage en tas statique : de 0,2 log pour le gène *sul2* et de 4,2 log pour le gène *erm*(B). Excepté pour le gène *tet*(M), la réduction de l'abondance relative n'est pas influencée par le mode de gestion de la litière (compostage ou stockage) ni par le traitement ATB donné aux poulets. Ainsi, le traitement des animaux par la colistine augmente l'abondance relative du

[34] Projet DAbrAmOr - Dissémination d'antibiorésistance liée aux amendements organiques : Dissémination d'agents pathogènes et de gènes d'antibiorésistance dans les sols et chez l'homme associés à l'épandage d'amendements organiques (ANSES 2014).

gène *tet*(M) après compostage ou stockage : 10^{-3} copies de gène par copie d'ADNr 16S contre 10^{-6} copies de gène par copie d'ADNr 16S dans la litière d'animaux non traités.

Dans cette même étude, il a été montré que des bactéries hébergeant des plasmides porteurs de GRA persistent au cours du compostage, et que ces derniers peuvent être transmis par transfert horizontal aux bactéries présentes dans le compost.

Dans le cadre du projet ANR CEMABS[35], la prévalence des gènes de résistance aux sulfamides (*sul1, sul2*) et des gènes transmissibles de résistance aux quinolones (*qnrA, qnrB* et *qnrD*) a été déterminée dans du fumier de bovin composté ou non et dans des co-composts de boues de STEU et déchets verts. Les gènes *sul* ont été détectés à des niveaux élevés dans les deux types d'amendements (jusqu'à $3{,}7.10^{9}$ copies de *sul1*.g MS^{-1} de fumier) alors que parmi les gènes *qnr*, seul le gène *qnrD* a été détecté à des concentrations de l'ordre de 10^{6} à 9.10^{6} copies.g MS^{-1}. De même, les gènes *intI1* et *intI2* étaient très abondants dans les fumiers (10^{7}-10^{9} copies.g MS^{-1}). Un gène de résistance aux β-lactamines ($bla_{CTX\text{-}M1}$) a également été détecté à l'état de trace dans les deux types d'amendements.

Dans le projet DIGESTATE (2016-2020)[36], les gènes *intI1*, *intI2*, *sul1, sul2, qnrA, qnrB* et *qnrD*, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ et $bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$, bla_{OXA}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, *tet*(B) et *tet*(W) ont été recherchés dans des PRO issus de trois STEU, de trois élevages et de trois sites de méthanisation. Parmi les PRO analysés, quatre sont des composts, sept des digestats et quatre sont issus d'une séparation mécanique de digestats. Quel que soit le gène recherché, les abondances absolues sont du même ordre de grandeur dans les digestats et dans les composts. Les gènes *intI1*, *intI2*, *sul* et *tet*(W) dont l'abondance est la plus élevée (10^{6}-10^{8} copies.g MS^{-1}) ont été retrouvés dans l'ensemble des composts et des digestats analysés. La prévalence des gènes *bla* et *qnr* dont l'abondance était comprise entre 10^{3} et 10^{7} copies.g MS^{-1} ne dépassait pas 50 % pour les 4 composts et 28 % pour les 7 digestats analysés. Ce projet a également mis en évidence que le compostage des PRO ne réduit pas systématiquement les concentrations en GRA. Ainsi, l'abondance de *tet*(W) a diminué ou augmenté de 3 log selon le compost. La méthanisation, comme le compostage conduit à des augmentations (de 0,4 à plus de 2,5 log) ou des réductions (de 0,9 à plus de 4,4 log) des abondances absolues des GRA. La séparation mécanique des digestats forme un sous-produit liquide, stocké en fosse et un sous-produit solide destiné à être composté. Bien que ce ne soit pas observé systématiquement, elle conduit dans l'ensemble à une diminution des abondances absolues des GRA dans la phase liquide et à une augmentation dans la phase solide.

Dans le projet DAbrAmOr, 11 gènes (deux *sul*, deux *qnr*, cinq *bla*, *intI1* et *intI2*) ont été quantifiés dans les PRO décrits précédemment (fientes, crottins, boues de STEU, déchets verts) et dans leurs composts. Les gènes *sul1* et *sul2*, ont été mis en évidence dans tous les types de PRO, sauf pour le gène *sul1* non détecté dans les crottins. Les abondances absolues du gène *sul1* sont de l'ordre de 10^{5} copies.g MS^{-1} dans les 6 échantillons de boues de STEU et les deux échantillons de déchets verts, et 10^{7} copies.g MS^{-1} dans deux des sept échantillons de fientes. Elles fluctuent entre 10^{6} (fientes) et 10^{9}.g MS^{-1} (boues de STEU) pour le gène *sul2.* Les gènes *qnr* et *bla,* dont les concentrations sont inférieures à 10^{7} copies.g MS^{-1} ont été détectés dans les fientes de volailles, les déchets verts et les boues de STEU mais pas dans le crottin à l'exception du gène bla_{TEM}. Les gènes *intI1* et *intI2* sont présents dans tous les types de PRO. Cependant, le gène *intI2* n'a été détecté que dans l'un des six échantillons de

[35] Projet CEMABS - Exposition chronique aux antibiotiques et métaux dans les sols : impact sur les processus microbiens incluant la dynamique de l'antibio-résistance (ANR 2013).

[36] Projet DIGESTATE - Diagnostic des traitements des déchets et comportement des contaminants dans l'environnement (ANR 2015).

boues de STEU. Lorsqu'ils sont détectés, les abondances des gènes *intI1* et *intI2* fluctuent respectivement de 10^5 à 10^7, et de 10^3 à 10^7 copies.g MS^{-1}.

Dans les composts, les gènes *qnr* et *bla* sont indétectables quelle que soit l'origine de l'intrant. Les variations d'abondance entre les intrants et les composts de fientes sont faibles pour les gènes *sul* et *int* (environ 1 log). En revanche pour le crottin, le gène *sul1* n'a pas été détecté alors que des valeurs de 10^6 copies.g MS^{-1} ont été observées dans le compost. De même, une augmentation de 3 log de la concentration en gène *sul1* a été observée entre les boues et le compost.

Des lisiers et des fumiers de bovins stockés en tas ou compostés (projet DABARES)[37] contenaient 10^7 à 9.10^8 copies *sul1*.g MS^{-1}, 4.10^7 à 4.10^9 copies *sul*2.g MS^{-1}, 3.10^4 à 10^7 copies. *tet*(B).g MS^{-1}, 8.10^5 à 2.10^8 copies *tet*(W).g MS^{-1}, 10^5 à 9.10^8 copies *intI1*.g MS^{-1} et 10^4 à 10^9 copies *intI2*.g MS^{-1}. Les gènes *tet*(L) et *tet*(M) n'ont pas été retrouvés dans deux des amendements. Dans les autres amendements leurs abondances varient de 10^4 à 10^8 copies.g MS^{-1} pour *tet*(L) et 10^4 à 3.10^7 pour *tet*(M). En revanche, le gène *qnrD* a été rarement mis en évidence (détection dans un seul des amendements à raison de 10^6 copies.g MS^{-1}) et les gènes *qnrA* et *qnrB* n'ont pas été détectés.

En conclusion, au regard des données disponibles, la persistance des BRA et des GRA dépend de l'espèce bactérienne ou du gène considéré ainsi que du type de traitement appliqué aux PRO. La montée en température au-delà de 60 °C au cours du compostage permet une réduction d'au moins 2 log des concentrations en entérobactéries résistantes. Il convient de souligner qu'à l'exception des études de Moraru *et al.* (2012) et de Le Devendec *et al.* (2016) réalisées en conditions contrôlées, les études de terrain manquent de données sur les traitements ATB administrés aux animaux.

7.1.2 Compartiments récepteurs de l'environnement

De nombreuses publications décrivent la présence de BRA ou de GRA dans l'environnement. Toutefois, il n'existe pas de données décrivant la contamination par des BRA et des GRA de zones non anthropisées.

L'étude de la contamination des compartiments récepteurs par les BRA et les GRA a été menée de manière ciblée sur quelques sites en France (figure 25). Il s'agit pour la plupart de sites ateliers identifiés au niveau national, le plus souvent intégrés dans des zones ateliers ou des observatoires labellisés par les organismes de recherche, et qui font l'objet d'études multidisciplinaires depuis plusieurs années, dont :

- Pour les milieux aquatiques : SIPIBEL, PIREN-Seine[38], GIP Seine-Aval[39], ZA Seine, SNO Karst,
- Pour les milieux terrestres : sites du SOERE tels les essais Qualiagro à Feucherolles, PRO'spective à Colmar ou Efele à Rennes, ainsi que des stations expérimentales et du Conservatoire des sols de l'INRAE.

[37] Projet DABARES - Détection et caractérisation d'AntiBiotiques dans des sols agricoles français et impact des amendements organiques sur l'AntibioRÉSistance (plan EcoAntibio 2017).

[38] https://www.piren-seine.fr/

[39] https://www.seine-aval.fr/

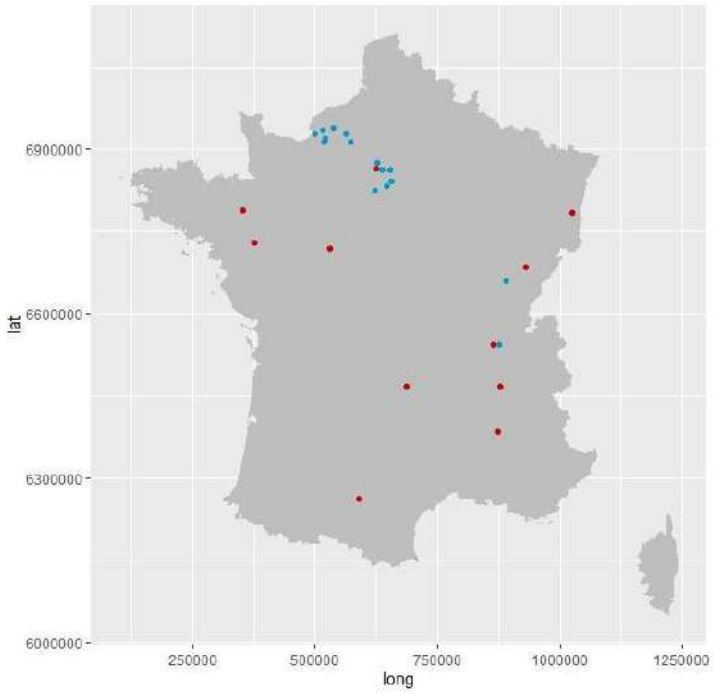


Figure 25. Cartographie des sites français métropolitains générant des données relatives à la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques et de supports génétiques de la résistance (milieu aquatique en bleu ; sols en rouge).

7.1.2.1 Milieux aquatiques

Trois types d'environnement aquatique sont considérés dans ce rapport : les eaux de surface (fleuves, rivières, estuaires), les eaux côtières et les eaux souterraines avec un focus sur les hydrosystèmes karstiques.

Bien que de nombreuses études aient été menées pour évaluer la contamination de ces milieux par des bactéries d'origine fécale, la comparaison des résultats obtenus sur les différents sites, se heurte à deux écueils majeurs :

- Le choix des paramètres mesurés (voir § 2.3.2) et la stratégie d'échantillonnage (voir § 5.2.1),
- Le mode d'évaluation de l'ABR qui diffère selon les études : profil phénotypique ou génotypique d'une espèce bactérienne cible, voire d'une communauté microbienne spécifique, ou quantification d'un support génétique à partir de l'ADN total extrait de l'eau ou des sédiments.

Néanmoins, plusieurs sites ont fait l'objet de suivis au travers de la recherche d'indicateurs communs (généralement les IR), de bactéries porteuses de résistance (*E. coli*), ou de déterminants de résistance généralement d'intérêt clinique (figure 25). Les études concernent :

- L'Arve (Site Pilote de Bellecombe - SIPIBEL),
- La Seine et son estuaire (zone atelier Seine, programmes PIREN-Seine et GIP Seine-Aval) pour lesquels les données et les isolats sont bancarisés,
- La Vienne et trois rivières du massif jurassien (Doubs, Loue, Ain – pour lesquelles les isolats sont bancarisés) ainsi que quelques études ponctuelles,
- Des aquifères karstiques (SNO Karst) pour lesquels les données et les isolats sont aussi bancarisés.

7.1.2.1.1 Aquifères continentaux de surface

7.1.2.1.1.1 Eaux de surface

Les travaux menés en Seine et dans son estuaire sur la dissémination des BRA d'origine fécale reposent sur une même méthode (diffusion sur gélose selon EUCAST), et une stratégie d'échantillonnage qui découle de la connaissance du déterminisme de la contamination de l'eau par les bactéries d'origine fécale (Servais *et al.* 2007), couplée à la caractérisation des sites de prélèvements (suivi de masse d'eau, débit, pluviométrie). Le tableau XV synthétise plusieurs études menées dans ce bassin.

Dans la partie amont du bassin versant de la Seine (Seine et ses affluents), où se localise la mégapole parisienne, Servais et Passerat (2009) ont observé que 42 % des isolats d'*E. coli* sont résistants à au moins un ATB d'intérêt clinique dont 35 % sont multirésistants. Les résistances à l'amoxicilline, à la tétracycline ou à l'association sulfaméthoxazole/triméthoprime sont retrouvées chez 96 % de ces isolats. De même, la prévalence d'entérocoques intestinaux antibiorésistants est de 83 %, dont 49 % d'isolats sont multirésistants. Dans la partie aval, selon les zones, 30 à 56 % des *E. coli* isolés des eaux de l'estuaire sont résistants à au moins un ATB, dont 11 % portent des IR (Tamtam *et al.* 2008 ; Laroche *et al.* 2009).

Servais et Passerat (2009) montrent que la prévalence d'*E. coli* résistants aux ATB est significativement plus importante dans les effluents de STEU que dans les échantillons de rivières. Dans les zones forestières, la prévalence de souches multirésistantes est la plus faible (< 1 %). Dans les zones agricoles, la prévalence de souches multirésistantes ne dépasse pas 10 %. Le MAR index[40], qui évalue la multirésistance dans des matrices environnementales (Krumperman 1983), a une valeur de 0,003 dans les zones forestières, de 0,019 dans les zones agricoles, de 0,082 dans l'eau de la Seine et ses affluents, de 0,093 pour les effluents de STEU et de 0,250 dans les eaux usées traitées d'une STEU à laquelle un hôpital est raccordé.

[40] Nombre d'ATB auquel un isolat est résistant sur le nombre total d'ATB testés. Cet index peut prendre des valeurs allant de 0 (l'isolat est sensible à tous les ATB testés) à 1 (l'isolat est résistant à tous les ATB testés).

Tableau XV. Abondance d'*E. coli* antibiorésistants dans l'eau de surface du bassin versant de la Seine (d'après (Laroche *et al.* 2009 ; Laroche *et al.* 2010 ; Petit *et al.* 2017) et projets GIP Seine-Aval et PANDORE).

		Rivière ordre 1 (tête de bassin)[a]		Rivière ordre 3 ou 4		Embouchure estuaire	
		Eau[a]	Sédiment[a, c]	Eau[d]	Sédiment[c, d]	Eau	Sédiment[c]
Nombre de campagnes		8	6	6	6	12	5
E. coli (UFC.L^{-1} ou UFC.g^{-1} (masse humide)		6.10^2 - 4.10^4	$8,7.10^0$ - 8.10^2	2.10^3 - 10^4	4.10^1 - $5,8.10^3$	2.10^1 - 5.10^3	6.10^0 - 2.10^1
Souches résistantes à *n* ATB (%) (min-max)	1-3	0 - 61[b]	2 - 19[b]	6,3 - 22[d]	0 - 8,5	10 - 50	NA[e]
	> 3	0 - 35[b]	0 - 26[b]	3 - 14[d]	0 - 14,5[d]	0 - 29	NA[e]
Souches portant *intI1* (%)		0 - 23[b]	0 - 7[b]	0 - 8[d]	0 - 13[d]	1 - 15	NA[e]

[a] valeurs maximales en période de haut débit (hautes eaux ou fort débit, périodes hivernales ou après un épisode pluvieux intense, avec débordement des fosses septiques) ; [b] valeurs maximales consécutives à une rupture de canalisation après un orage violent ; [c] sédiment superficiel et récent ; [d] valeurs minimales en période d'étiage (basses eaux) et valeurs maximales observées à proximité du rejet de STEU et/ou après évènements pluvieux ; [e] nombre insuffisant de souches isolées (n<10).

Dans le Doubs, les concentrations en *E. coli* totaux et producteurs de BLSE en amont et en aval de la STEU de Besançon confirment l'importance des rejets de STEU sur la contamination des rivières (Bréchet *et al.* 2014). En effet, la concentration en *E. coli* est de 3.10^3 UFC.L^{-1} en amont et de $1,4.10^5$ UFC.L^{-1} juste en aval du point de rejet de la STEU. Les concentrations des *E. coli* BLSE augmentent dans les mêmes proportions, passant de 20 UFC.L^{-1} en amont à 1 300 UFC.L^{-1} en aval de la STEU. Les concentrations en *P. aeruginosa* dans la rivière en amont de la STEU (30 UFC.L^{-1}) sont inférieures à celles en aval (130 UFC.L^{-1}) (Slekovec *et al.* 2012). Dans cette rivière, il a été isolé des souches de *P. aeruginosa* appartenant à des clones épidémiques diffusant à l'échelle mondiale (ST253, ST395), dont certaines sont multirésistantes aux ATB.

Sur le site pilote de SIPIBEL, le flux d'IR dans l'Arve est d'environ 10^7 copies *intI1*.L^{-1} au niveau du rejet avec une abondance relative toujours inférieure à 0,1 qui s'explique par un effet de dilution important lors du rejet des effluents dans le milieu récepteur (rivière). Les résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus en amont et en aval du rejet de la STEU de Limoges dans la Vienne (Stalder *et al.* 2014). Une étude comparative menée sur différents systèmes STEU-rivières (programme IRMISE[41]), montre que le flux d'IR rejetés dans l'Arve, le Rhône et le bassin du Genevois (dont l'Arve est un contributeur) est du même ordre de grandeur (10^{15} à 10^{16} copies *intI1* par jour).

Le long d'un continuum hôpital-STEU-rivières, la proportion de souches d'*E. coli* portant *intI1* et appartenant au phylogroupe A, est maximale dans les rejets du centre de soins et décroît tout au long du continuum (Oberlé *et al.* 2012). Sur ce même continuum, il a été observé au sein de la population d'entérocoques, appartenant majoritairement à l'espèce *Enterococcus faecium*, que la proportion de souches résistantes à l'ampicilline et à la ciprofloxacine est aussi

[41] Programme IRMISE Arve aval - Impact des rejets de micropolluants issus de stations d'épuration sur l'aval du bassin versant de l'Arve et la nappe du genevois (France-Suisse INTERREG 2012).

maximale dans les effluents du centre de soins. Elle diminue dans les effluents traités de la STEU (19 % et 17 %) pour atteindre 4 % et 5 % dans la rivière (Leclercq *et al.* 2013).

La proportion de souches résistantes à l'érythromycine est supérieure à 70 % tout au long du continuum mais seules les souches hospitalières présentent le plus haut niveau de résistance. Ainsi, la prévalence du gène *erm*(B) est de 75 % dans la population *E. faecium* des rejets hospitaliers et de seulement 6,7 % dans celle de la rivière (Risle).

L'abondance, la diversité et la prévalence de souches antibiorésistantes et pathogènes au sein de la population d'*E. coli* ont aussi été étudiées le long d'un réseau hydrologique rural (bassin versant de la Risle) (Petit *et al.* 2012), au regard de la contribution respective de la contamination humaine et animale. Deux campagnes d'échantillonnage, avec suivi de la masse d'eau, ont été réalisées dans des conditions de débits similaires pour deux périodes du cycle hydrologique (fin période estivale, fin période hivernale), le long d'un continuum fluvial (de 8 km). Ce continuum est caractérisé par deux gradients de densité opposés d'animaux (bovins et animaux sauvages) et de populations humaines. La proportion d'isolats d'*E. coli* résistants à au moins un ATB - parmi les 17 ATB d'intérêt clinique testés - variait de 5 % (7/148) sur le site amont (pâturage) à 27 % (53/190) sur le site urbain en aval (Risle). Cependant, sur le site en amont situé à proximité d'une zone forestière (présence de sangliers et de cerfs) à 4 km en aval de plusieurs exploitations de vaches laitières, 15 % (24/158) des isolats d'*E. coli* étaient résistants à au moins un ATB. L'abondance d'isolats d'*E. coli* multirésistants (*i.e.* résistant à plus de trois ATB appartenant à des classes différentes) augmente significativement ($p < 0,001$) entre le site de pâturage en amont et le site urbanisé à l'aval (Risle). Le long de ce continuum rural, la présence du gène *intI1* chez *E. coli* est aussi plus marquée sur le site urbanisé à l'aval (en moyenne 5,0 %) qu'à l'amont (en moyenne 1,0 %).

Dans le massif Jurassien, la contamination bactérienne et les caractéristiques physico-chimiques de l'eau de trois rivières (Doubs, Ain et Loue) et de 16 zones humides[42], on été suivies mensuellement sur une période d'un an. Les résultats montrent que les concentrations en *E. coli* BLSE sont plus élevées dans les rivières (≤ $1,3.10^4$ UFC.L^{-1}) que dans les zones humides (≤ 80 UFC.L^{-1}), et que les premières alimentent les deuxièmes en *E. coli* BLSE durant les périodes de forts débits hivernaux (Bréchet *et al.* 2014 ; Henriot *et al.* 2019). Les concentrations d'*E. coli* dans les rivières et dans les zones humides supposent plusieurs sources de contamination (rejet de STEU, eaux de lessivage des champs contaminés). Ces BRA se diluent à mesure que l'on s'éloigne de la source.

7.1.2.1.1.2 Périphytons

Une recherche d'intégrons dans des périphytons a été menée sur différents cours d'eau français.

Sur la Vienne, une étude menée de la tête du bassin versant jusqu'à la confluence avec la Loire montre que l'intégron *IntI1* est quantifiable dans les périphytons de la partie médiane et aval du bassin ainsi que dans les périphytons qui se développent au niveau de zones peu urbanisées dans la partie amont (Aubertheau *et al.* 2017). L'intégron *intI3* est en revanche faiblement présent, et l'intégron *intI*2 jamais détecté. Les auteurs observent une augmentation de la quantité d'intégrons (*intI1* et *intI3*) dans les périphytons exposés aux rejets de STEU, avec notamment un facteur d'enrichissement de l'ordre de 3 à 31 pour *intI1*.

[42] Zones humides - Terrains, exploités ou non, habituellement inondés ou gorgés d'eau douce, salée ou saumâtre de façon permanente ou temporaire, ou dont la végétation, quand elle existe, y est dominée par des plantes hygrophiles pendant au moins une partie de l'année.

En revanche, des niveaux d'*intI1* et *intI3* variant du simple au double ont été observés entre la Vienne et un de ses affluents (le Clain), démontrant l'hétérogénéité spatiale de leur occurrence à l'échelle d'un grand bassin versant (projet PANDORE[43]).

En Seine, l'abondance d'*intI1* a été suivie sur des supports artificiels de périphyton positionnés le long d'un transect présentant un important gradient d'anthropisation. L'intégron *intI1* est toujours détecté et son abondance augmente avec le degré d'anthropisation du bassin versant, les valeurs maximales étant observées en aval de Paris sur le site impacté par les rejets de la principale station d'épuration de la région parisienne (STEU de Seine-Aval à Achères), et cela quelle que soit la saison (Labadie *et al.* 2019). Une augmentation maximale d'un facteur de 6,5 d'*intI1* a été observée de l'amont à l'aval. Tout comme sur le site de la Vienne, *intI2* n'a jamais été détecté, et *intI3* est souvent présent mais à la limite de la quantification.

7.1.2.1.1.3 Sédiments

En Seine, ou le long d'une rivière urbanisée (Orge) de la région parisienne, *intI1* est toujours détecté dans les sédiments des zones les plus urbanisées, et sa concentration augmente à proximité des rejets de STEU (projet PANDORE) (Labadie *et al.* 2019), alors qu'elle diminue dans les sédiments prélevés plus à l'aval.

En revanche, dans les sédiments prélevés le long d'un affluent de la Seine (transect zone rurale amont - rejet à l'embouchure de la Seine), *intI1* est rarement détecté sauf à proximité des rejets d'une STEU (projet PANDORE) (tableau XVI). Des mesures de gènes de résistance (*sul1*, *sul2*, *erm*(B)) ont aussi été réalisées dans des carottes de sédiment prélevées en Loire amont et aval (projet Dynamics). Des abondances relatives de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} copies pour chaque gène ont ainsi été retrouvées dans les différentes couches sédimentaires récentes ou datant des années 1980. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la porosité de la carotte ou les modèles de datations ou la vitesse de sédimentation des sites d'étude.

Tableau XVI. Abondance de *intI1* dans des sédiments de surface (0-3 cm, quantification par qPCR et normalisation, copies *intI1*/ADNr16S) (d'après (Laroche *et al.* 2009 ; Laroche *et al.* 2010 ; Petit *et al.* 2017) et projets DYNAPAT, GIP Seine-aval, PANDORE, PIREN-Seine et Zootrans).

	Description de la zone prélevée				
	Rivière ordre 1 zone rurale activité pastorale (période pluvieuse ou de forts débits)	**Rivière ordre 4**	**Rivière urbaine**	**Transect Seine (amont – aval Paris)**	**Embouchure estuaire**
Copies *intI1* /ADNr 16S	10^{-3}	$2{,}3.10^{-3}$ - $4{,}7.10^{-3}$	DNQ - $2{,}5.10^{-2}$	DNQ - $1{,}89.10^{-1}$	10^{-3}

DNQ: détectable mais non quantifiable

L'impact des rejets de pisciculture sur les sédiments n'a fait l'objet que d'une seule étude française. Gordon *et al.* (2007) ont quantifié la proportion d'*Aeromonas* spp. résistants à trois ATB (oxytétracycline, acide oxolinique, florfénicol) dans les sédiments de surface de l'Elorn (Finistère) recevant les effluents de quatre piscicultures et d'une STEU urbaine située à l'aval des piscicultures. Les prélèvements ont été réalisés à deux saisons (octobre, mars) en amont, en aval au plus près des cinq points de rejet, et à une distance de 100 à 2 250 m des points de rejet. Alors que des proportions de souches résistantes à l'oxytétracycline et à l'acide oxolinique atteignent 33,5 et 99,8 %, respectivement, elles ne dépassent pas 1 % pour le florfénicol. La proportion de souches d'*Aeromonas* résistantes dépend de la localisation du

[43] PANDORE - Prédiction de l'antibiorésistance dans des zones anthropisées environnementales (Anses PNR EST 2017)

point de prélèvement et de la période d'échantillonnage. En octobre, le plus faible pourcentage de souches résistantes est observé à l'amont des piscicultures et de la STEU. Les rejets conduisent systématiquement à une augmentation de ce pourcentage qui décroît, dans la plupart des cas, dans les sédiments prélevés plus en aval. En mars, l'impact des rejets est moins marqué, des proportions élevées d'*Aeromonas* résistants aux deux ATB étant observées dans les sédiments en amont des rejets.

En raison de la variabilité des résultats entre les deux campagnes de prélèvements, de l'absence de mesure de flux d'*Aeromonas* et de typage génétique des souches, il est difficile de s'appuyer sur les résultats de cette étude pour estimer l'impact des piscicultures sur l'enrichissement des sédiments en BRA.

7.1.2.1.2 Eaux souterraines - Occurrence des bactéries résistantes aux antibiotiques d'origine fécale dans des hydrosystèmes karstiques

En France, quelques études se sont intéressées à la vulnérabilité des aquifères karstiques à la contamination par des BRA (*E. coli*). Ces travaux ont été menés sur deux hydrosystèmes karstiques contrastés (taille et niveau d'anthropisation du bassin versant), sites ateliers du service national d'observation (SNO karst, CNRS[44]).

Dans ces hydrosystèmes karstiques caractérisés par une infiltration rapide de l'eau de surface (voir § 5.1.2.1.2), les apports en BRA d'origine fécale dans l'aquifère (à la perte ou encore appelé zone d'engouffrement), s'expliquent, comme pour les cours d'eau en zone rurale, par le ruissellement ou le lessivage des sols lors d'événements pluvieux (Laroche *et al.* 2010 ; Ratajczak *et al.* 2010 ; Ribeiro *et al.* 2012).

Une étude de la diversité des populations sur la base de la distribution des phylogroupes montre que les apports en *E. coli* sont essentiellement d'origine bovine (appartenant au phylogroupe B1). Des *E. coli* d'origine humaine sont retrouvés uniquement lorsque l'intensité d'événements pluvieux sur un sol déjà saturé en eau provoque un dysfonctionnement des ANC (tableau XVI) (Petit *et al.* 2018). Le temps de transfert le long de l'hydrosystème karstique (jusqu'à la source) peut varier de 15 h (lors d'événements de crue majeure) à 30 h (en période sèche) (Fournier *et al.* 2007). La dilution et la perte de culturabilité à la sortie de l'hydrosystème karstique (source), sans pour autant exclure un piégeage au sein de l'hydrosystème, expliquent essentiellement la diminution de la densité en *E. coli* de 1 à 2 log. Au forage de cette ressource utilisée pour la production d'EDCH, les *E. coli* antibiorésistants ont rarement été détectés sauf lors d'événements pluvieux majeurs (tableau XVII).

Lors d'événements pluvieux, le profil phénotypique de résistance aux ATB des isolats d'*E. coli* témoigne d'une origine animale (résistance à la tétracycline et/ou au chloramphénicol) ou d'une origine humaine (résistance aux β-lactamines, au sulfaméthoxazole/triméthoprime). Des travaux menés sur un hydrosystème karstique voisin, dont le bassin versant est huit fois plus grand et plus urbanisé (trois STEU), confirment le déterminisme de la contamination d'un aquifère karstique (pluviométrie), avec des abondances en *E. coli* plus élevées à la source (jusque $1{,}4.10^4$ UFC.L^{-1}) en période pluvieuse. Dans ces conditions hydrologiques, la proportion de bactéries résistantes à au moins un ATB (sur 17 testés) est de 66,7 % au pic de crue. Aucun intégron n'a été détecté dans des isolats d'*E. coli* en période sèche alors que la proportion d'*E. coli* portant *intI1* varie de 1 à 18 % en période humide (Laroche *et al.* 2010).

[44] http://sokarst.org/

Tableau XVII. Contamination d'un hydrosystème karstique par des *E. coli* antibiorésistants pour différentes conditions hydrologiques et d'usage du bassin versant (Site Norville, SNO karst CNRS) (Petit *et al.* 2018) d'après (Laroche *et al.* 2010 ; Ratajczak *et al.* 2010).

Campagne de prélèvements		*E. coli*	Engouffrement	Source	Forage
Période sèche	Avec pâturage	UFC.L^{-1}	6,2 ± 0,3.10^{3}	5,5 ± 1,1.10^{2}	< 5
		Résistance aux ATB % (n/N)[a]	0 % (0/45)	5,7 % (2/35)	< 10
		Phylogroupe B1[b] (%)	86,7 %	77,1 %	-
	Sans pâturage	UFC.L^{-1}	9,8 ± 2,2.10^{2}	5,6 ± 0,9.10^{2}	< 5
		Résistance aux ATB % (n/N)	-[c]	-	-
		Phylogroupe B1 (%)	7,4 %	4,8 %	-
	Fortes pluies avec pâturage	UFC.L^{-1}	4,0 ± 0,3.10^{5}	2,5 ± 1,1.10^{4}	9,6 ± 3,3.10^{2}
		Résistance aux ATB % (n/N)	55,8 % (18/34)	35,7 % (5/14)	44,8 % (13/29)
		Phylogroupe B1 (%)	44 %	28.6 %	-
Période pluvieuse	Sans pâturage	UFC.L^{-1}	10^{3}	10^{3}	< 5
		Résistance aux ATB % (n/N)	0 (0/44)	0 (0/39)	0 (0/28)
		Phylogroupe B1 (%)	39 %	41,1 %	-
	Fortes pluies avec pâturage	UFC.L^{-1}	6 ± 0,3.10^{3}	10^{3}	< 5
		Résistance aux ATB % (n/N)	54 % (14/26)	41 % (11/27)	30 % (7/23)
		Phylogroupe B1 (%)	15 %	-	-

[a] N=nombre d'isolats d'*E. coli* testés ; n=nombre d'isolats d'*E. coli* résistants à ≥ 1 ATB ; [b] Phylogroupe associé au bétail ; [c] Données manquantes

7.1.2.1.3 Eaux côtières

Il y a peu de données sur l'ABR dans les eaux du littoral français.

En France métropolitaine, il n'existe aucune donnée sur les eaux côtières, à l'exclusion d'études concernant les denrées alimentaires d'origine marine (Manche, mer du Nord, océan Atlantique, mer Méditerranée). Le tableau XVIII fait la synthèse des données recueillies. Les données, souvent incomplètes, ne permettent pas de quantifier la proportion d'échantillons contaminés par des BRA, ni la concentration des BRA dans les prélèvements positifs. Les espèces retrouvées le plus souvent d'origine environnementale, présentent une résistance naturelle aux ATB.

Les premières conclusions indiqueraient une faible proportion des produits de la mer contaminés par des BRA, et une corrélation entre la contamination des échantillons avec la proximité des zones de rejet en bactéries d'origine fécale (ruissellement ; épandage ou STEU). Dans cet environnement, la faune sauvage (mouettes) serait un vecteur de propagation de BRA (Alves *et al.* 2014).

Tableau XVIII. Synthèse des données existantes sur la contamination des eaux côtières par les bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques en France et en Europe.

Programme ou référence	Lieu et dates d'échantillonnage	Échantillons prélevés (N)	Espèces animales contaminées (n)	Espèces bactériennes (n, résistance)	Remarques
Lopatek, Wieczorek et Osek (2018)	Produits de la pêche d'origine française commecialisés en Pologne	Poissons et coquillages (66)	Moules (1), Palourdes (5)	*Vibrio parahaemolyticus* (6, dont 5 ampicilline R et 3 streptomycine R)	-
ANTIBIOFISH	France, 2015-2018	Cabillaud, poissons plats, noix de Saint-Jacques		*Staphylococcus* sp. (2/2, R à ≥ 1 classe ATB), *Enteroroccus* sp. (2/7 sont multirésistants)	Proportion inconnue de produits péchés positifs
RECOMANCHE (CPER MARCO)	France, Manche - Estuaires de 4 rivières, 2018	Zones (5)	Chinchards	*Psychrobacter* (173, aucune n'est R aux ATB d'intérêt clinique)	-
Leonard *et al.* (2018)	Angleterre, 2016	Eaux de baignade (97)	-	11 % contiennent des *E. coli* bla_{CTX-M}	-
Blaak *et al.* (2014)	Pays-Bas, 2011-2012	Eau (27) sur 4 zones de baignade	-	66 % contiennent des *E. coli* BLSE	Concentration moyenne de 1,3 *E. coli* BLSE.100 mL^{-1}
Alves *et al.* (2014)	Portugal (Ile de Berlanga, réserve naturelle), 2011	Eau	-	6 % des 342 *E. coli* isolées sont C3G-R	Les mouettes sont également un vecteur de propagation de BRA.
Foti *et al.* (2009)	Italie (mer Tyrrhénienne), 2006-2007	Tortues Caouannes (19)	Tortues Caouannes	*P. vulgaris* (N = 14), *Citrobacter freundii* (N = 10), *Providencia rettgeri* (*N* = 7), *Enterobacter cloacae* (N = 7), *Pantoea* spp. (N = 4), *P. mirabilis* (N = 4), *P. aeruginosa* (N = 3), *Citrobacter brakii*, *Enterobacter sakazakii*, *E. coli*, *Morganella morgani*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas luteola* et *Shewanella putrefaciens* Tous les isolats sont résistants à au moins un ATB et 50 % sont résistants à au moins 9 ATB sur les 31 testés. Résistances observées : carbénicilline (100 %), céphalothine (92,6 %), oxytétracycline (81,3 %) (77,8 %), colistine (72,0 %), tétracycline (64,9 %), ampicilline (63,6 %), ticarcilline-acide clavulanique (52,9 %), loméfloxacine (51,9 %), amikacine (19 %), céfotaxime (9,1 %), imipénem (0 %)	Les zones d'identification de BRA concordaient avec des zones de contamination marine par des effluents contaminés
Alouache *et al.* (2012)	Algérie (mer Méditerranée, Alger), 2009	Eau en zones de baignade (4)	-	*P. aeruginosa* (15 R), *P. fluorescens* (7 R), *S. maltophilia* (4 R), *B. cepacia* (2 R), *Bordetella* sp. (1 R), *Pantoea* sp (1R), *A. baumannii* (1 R), *Chryseomonas luteola* (1 R), *Ochrobactrum anthropi* (1 R), *E. coli* (1 $bla_{CTX-M-15}$) Résistances observées : imipénem (14), céfotaxime (20)	Ne tient pas compte des R naturelles Proportion d'échantillons positifs à BRA inconnue
(Guyomard-Rabenirina *et al.* 2017)	France (Guadeloupe), 2012-2013	Eau de mer (12)	-	*E. coli* : aucune souche résistante aux C3G	-

7.1.2.1.4 Biote aquatique

Peu de travaux existent en France sur l'occurrence des BRA au sein du microbiote de la faune aquatique.

Récemment, Bollache *et al.* (2019) ont montré la présence d'isolats d'*E. coli* résistants au céfotaxime (*E. coli* CTX-R) et des *E. coli* BLSE dans le tractus digestif de poissons, l'eau et les périphytons de la rivière Ouche (Bourgogne). La prévalence d'*E. coli* totaux et d'*E. coli* CTX-R dans le tractus digestif des poissons varie de 0 à 92 % et de 0 à 85 %, respectivement, selon le site d'échantillonnage et l'espèce de poisson. Le régime alimentaire des poissons semble influencer fortement la prévalence d'*E. coli* totaux et les *E. coli* BLSE, notamment chez les poissons omnivores qui se nourrissent en broutant les périphytons eux-mêmes contaminés. Toutefois, les auteurs n'ont pas évalué la durée de survie des *E. coli* BLSE dans le tractus digestif des poissons.

Dans cette même étude, les *E. coli* CTX-R et les *E. coli* BLSE ont été isolés dans l'eau, les périphytons et les poissons, prélevés à proximité de la zone urbaine, à l'aval de la rivière. Les BLSE produites par les isolats appartenaient à la famille CTX-M (CTX-M groupes 1 et 9). Les isolats d'*E. coli* BLSE provenant de l'environnement appartenaient à des clones identiques à ceux des isolats provenant de huit effluents de STEU rejetés dans la rivière, notamment le clone ST131 fréquemment associé à l'Homme. La plupart des *E. coli* BLSE (97 %) était multirésistante et 53 % d'entre eux hébergeaient *intI1*. Dans cette étude, le rejet des eaux usées traitées de STEU est identifié comme la source majeure de contamination par des *E. coli* CTX-R et *E. coli* BLSE de l'environnement aquatique et des poissons.

7.1.2.2 Milieux terrestres

7.1.2.2.1 Sols

Les données françaises disponibles concernant la prévalence et les concentrations en BRA et GRA des milieux terrestres proviennent principalement d'études menées en France métropolitaine et dans les DROM (Guadeloupe et Guyane) sur des sols de forêt primaire (Guyane) et des sols agricoles prélevés sur des parcelles exploitées par des particuliers, ou sur des parcelles relevant de dispositifs expérimentaux de laboratoires académiques (sols du réseau SOERE-PRO)[45]. Sur les sols agricoles, les données disponibles ont été obtenues avant et après apport de PRO. Même si le niveau de contamination des échantillons de sols « contrôle » a été mesuré (figure 29 et 31), il n'est pas possible d'estimer précisément la prévalence et la teneur originelle en BRA et GRA dans ce type de sols dans la mesure où l'historique, et donc le niveau d'anthropisation, n'est pas connu. Outre ces travaux de recherche, l'étude de Demanèche *et al.* (2008) a plus spécifiquement abordé la problématique du transfert de GRA dits « exogènes » (*i.e.* introduits dans l'environnement) vers les populations bactériennes indigènes (*i.e.* initialement présentes dans l'environnement) et une autre menée par Denet *et al.* (2017) s'est intéressée au compartiment microfaune du sol au travers de l'analyse du microbiote des amibes libres (*i.e.* bactéries intra-amibiennes échappant à la lyse).

7.1.2.2.1.1 Quantification et caractérisation des bactéries résistantes aux antibiotiques

Les espèces bactériennes pour lesquelles les propriétés phénotypiques et/ou génétiques de résistance aux ATB ont été évaluées appartiennent à trois familles : *Enterobacteriaceae*

[45] Le SOERE PRO est un réseau de sites expérimentaux labellisé Système d'Observation et d'Expérimentation au long terme pour la Recherche en Environnement sur les effets du recyclage de produits résiduaires organiques (PRO) sur les écosystèmes cultivés.

(*E. coli*, *Enterobacter* spp.), *Pseudomonodaceae* (*P. aeruginosa*) et *Xanthomonadaceae* (*S. maltophilia*).

Les études menées sur *P. aeruginosa* (Deredjian *et al.* 2011 ; Youenou *et al.* 2015) et *S. maltophilia* (Deredjian *et al.* 2016) visaient à identifier des réservoirs terrestres de ces deux espèces pathogènes opportunistes. Les sols étudiés sont des sols agricoles (vignobles en Bourgogne) et quelques sols industriels contaminés par des hydrocarbures et des ETM en Lorraine et Ile-de-France. Ces études sont majoritairement ponctuelles avec un prélèvement unique. Seul un sol agricole, localisé dans les Yvelines, dispose d'un suivi de deux prélèvements annuels sur les mêmes parcelles et parfois sur plusieurs années consécutives. Les analyses d'ABR visent à rendre compte de la présence de résistances autres que celles caractérisant le phénotype dit sauvage de ces deux espèces. À l'époque où ces travaux ont été réalisés, étaient considérées pour définir le phénotype sauvage, la sensibilité à la colistine et les résistances à la minocycline et au sulfaméthoxazole/triméthoprime pour *P. aeruginosa*, et la résistance aux carbapénèmes pour *S. maltophilia*.

Ainsi, sur les 23 souches de *P. aeruginosa* isolées de sol (16 souches en France et 7 de collection internationales), 18 présentent un phénotype sauvage de résistance aux ATB. Parmi les cinq souches présentant des résistances, quatre résistent à la combinaison ticarcilline/acide clavulanique, et une à l'imipénème. Ces souches ont été isolées de sols français contaminés aux hydrocarbures. Toutes les souches de *S. maltophilia* isolées des sols français résistent (en plus de leur résistance naturelle aux carbapénèmes) à la ticarcilline ou à la pipéracilline. Certaines présentaient en plus une résistance à la ciprofloxacine, à la péfloxacine et/ou au céfépime.

Une étude s'est intéressée à la présence et à la diversité des bactéries présentes au sein du microbiote de différentes espèces d'amibes libres vivant dans les sols. Les deux espèces *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* ainsi que l'espèce *Burkholderia cenocepacia* ont été détectées dans des amibes isolées de sols (Denet *et al.* 2017). Les quelques isolats de *P. aeruginosa* et de *S. maltophilia* testés présentaient des phénotypes sauvages de résistance aux ATB (selon la définition précitée). Cependant, il est à noter que ces espèces n'ont été obtenues qu'à partir d'amibes isolées de sols non originaires de France (un sol agricole au Burkina Faso et un sol minier au Vietnam). L'unique sol français exploré dans cette étude, un sol de prairie dans les Alpes, n'a pas conduit à l'isolement de ces espèces à partir des amibes.

La prévalence d'*E. coli* porteurs de gènes $bla_{CTX\text{-}M}$ codant des BLSE a été recherchée dans des sols agricoles échantillonnés à proximité de trois fermes élevant des vaches laitières en Bourgogne (Hartmann *et al.* 2012). Plusieurs isolats porteurs du gène $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ ont été obtenus d'un sol cultivé et d'un sol sous prairie. Il est à noter que certains de ces isolats ont le même génotype (analyse REP-PCR) que des isolats retrouvés chez les animaux de ces fermes et que la résistance aux BLSE s'accompagne pour la majorité d'entre eux d'une résistance au sulfaméthoxazole/triméthoprime, et parfois d'une résistance à la ciprofloxacine et/ou au chloramphénicol. De même, le sol cultivé a pour caractéristique d'avoir été fertilisé avec le fumier de bovins de la ferme un an auparavant. Ceci suggère autant la dissémination de ces isolats *via* l'épandage que la persistance à long terme de ces isolats.

7.1.2.2.1.2 Détection et quantification par des approches indépendantes de la culture

Deux études (Demanèche *et al.* 2008 ; Nesme 2014) font référence à la détection de GRA dans les sols *via* une approche par métagénomique. La première mentionne la présence dans des sols agricoles de gènes bla_{TEM} à l'époque inconnus en clinique et portés par des espèces bactériennes non identifiées (Demanèche *et al.* 2008). La seconde s'est intéressée à la prévalence de l'ABR de sols forestiers de Guyane dans le parc national d'Amazonie à Trois-Sauts. Un échantillonnage sur 3 km avec un point de prélèvement tous les 600 m a été réalisé selon un transect allant du village amérindien à la forêt primaire. L'analyse métagénomique met en évidence que les gènes codant les pompes à efflux sont les plus abondants, suivis de ceux codant la résistance à la vancomycine, la bacitracine *via* un mécanisme d'efflux spécifique, les β-lactamines et les tétracyclines. Ces abondances dans les différents échantillons varient le long du transect mais ne sont pas corrélées à la distance au village et

donc au degré d'anthropisation. Une approche par qPCR ciblant un certain nombre de GRA (*bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$, *erm*(A), *tet*(G), *tet*(H), *cfiA/ccrA*, *sul1*) et les gènes *intI1* et IncP-*trfA* complète cette étude. Les résultats d'abondance de GRA sont rapportés en abondance relative du gène codant l'ARNr 16S et par référence à la valeur d'un sol « contrôle » (sol de Rothamstedt, GB). Tous les gènes ciblés ont été détectés à l'exception du gène *tet*(H) et leur abondance n'est pas corrélée à la distance au village. La majorité des gènes a une abondance équivalente à celle observée dans le sol témoin.

Les travaux de Hartmann *et al.* (2012) mentionnent également la recherche des gènes *bla*$_{CTX-M-1}$ ou *bla*$_{CTX-M-9}$ dans 120 échantillons de sols agricoles (sols nationaux du réseau RMQS[46]) et détectent ces gènes dans 20 % d'entre eux.

Au travers de la littérature grise (projets DAbrAmor, CEMABS et DABARES), il a été possible d'identifier d'autres travaux s'intéressant à la prévalence de gènes de mobilité *intI1* et *intI2* et de gènes de résistance aux sulfamides (*sul1*, *sul2*), aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrD*), aux β-lactamines (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M-1}$, *bla*$_{CTX-M-9}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$), et aux tétracyclines (*tet*(L), *tet*(B), *tet*(M), *tet*(W)) dans différents sols agricoles français de métropole et de Guadeloupe (voir § 7.2.2.1).

7.1.2.2.2 Rhizosphère et phyllosphère

Aucune donnée française relative à l'ABR dans la rhizosphère et la phyllosphère (surface des feuilles) n'est à ce jour disponible. Ces données sont également rares à l'échelle européenne ou mondiale, certaines sont abordées dans le § 7.2.2.5.

7.1.2.2.3 Faune sauvage

Peu d'études ont jusqu'à présent été menées sur le territoire métropolitain pour analyser le portage digestif de BRA ou détecter la présence de GRA, tels les gènes codant des BLSE et/ou des carbapénémases, dans la faune sauvage française. Une revue récente présente la synthèse des données mondiales parues jusqu'en 2015 (Vittecoq *et al.* 2016). Les trois groupes de bactéries les plus étudiés dans les 210 études recensées sont : *E. coli* (115 publications), *Salmonella* spp. (54 publications) et *Enterococcus* spp. (43 publications). Le régime alimentaire des hôtes influait sur le taux de portage des bactéries résistantes pour 10 des 35 études où ce facteur avait été pris en compte, dans le sens quasi univoque d'une plus forte prévalence de BRA chez les hôtes omnivores ou carnivores par rapport aux herbivores. Aucune différence significative n'était relevée pour 25 études. Le régime omnivore apparaît en lien avec les zones anthropisées avec un gradient de diversité fonction de l'anthropisation des milieux.

Deux articles de cette même équipe rapportent des études menées dans le sud de la France (Aberkane *et al.* 2017 ; Vittecoq *et al.* 2017). La première investiguait la présence de souches d'*E. coli* résistantes aux carbapénèmes chez deux espèces de goélands, l'une vivant en étroite association avec l'homme (*Larius michahellis*), l'autre se nourrissant en mer (*Chroicocephalus genei*) (Vittecoq *et al.* 2017). L'étude microbiologique et génétique a été réalisée sur, respectivement, 93 et 65 prélèvements rectaux de poussins âgés au maximum de quatre semaines. Le criblage sur milieu sélectif a permis de dépister 22 souches résistantes aux carbapénèmes : *bla*$_{VIM-1}$ a été retrouvé chez 18 des 93 goélands « anthropisés » alors qu'aucune souche résistante n'a été isolée de l'autre population. Il y avait une répartition polyclonale de la résistance, à savoir que le gène avait été introduit dans plusieurs clones retrouvés dans la population humaine et dans l'autre population de goélands. Vu l'aire de répartition de l'espèce omnivore vivant au contact des aires urbaines, il est donc pointé, au-

[46] RQMS : Réseau de Mesures de la Qualité des Sols. Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols : un outil de surveillance des sols à long terme.

delà du risque de dissémination d'un gène important dans la résistance aux carbapénèmes, l'importance de suivre l'ABR du portage bactérien chez les espèces animales établissant des passerelles entre vie sauvage et vie citadine, ceci afin de mieux cerner les caractéristiques de diffusion spatio-temporelle d'un GRA ou d'une BRA.

La persistance d'une résistance au sein d'une population bactérienne hébergée par ces mêmes espèces de goélands aux modes de vie très différents a été le sujet d'une étude longitudinale effectuée par un groupe multidisciplinaire (Aberkane *et al.* 2017). L'étude a comparé la prévalence du gène bla_{CMY-2} détecté en 2012 chez *P. mirabilis* dans les deux espèces de goélands, un an plus tard en absence de pression de sélection sous-jacente identifiée. Le taux de prévalence du gène y était en légère décroissance (26,1 % en 2013 contre 40 % en 2012) mais rendait encore compte, à lui seul, du déterminisme génétique de la résistance aux céphalosporines dans les souches de *P. mirabilis* isolées. Les mêmes clones étaient retrouvés d'une année sur l'autre, suggérant l'absence de coût biologique associé à cette résistance aux antibiotiques.

En Sud-Guyane, l'autarcie du peuple Amérindien des Wayampis est à l'exact opposé du mode de vie adopté en métropole. Ce particularisme est à la base d'une étude menée dans le temps et l'espace sur le suivi génétique d'entérobactéries résistantes (*Klebsiella* et *E. coli*) de fèces de petits rongeurs et marsupiaux divers, collectés à distance du village de Trois-Sauts (Grall *et al.* 2015). Les échanges limités avec l'extérieur et l'autosuffisance alimentaire de ce village en ont fait un modèle de choix pour délimiter la pression de sélection ATB qui s'exerce sur la population humaine et la faune sauvage environnante. Sachant que toutes les prescriptions médicales sont consignées, il a ainsi été facile de suivre l'évolution spatio-temporelle de la résistance à la ticarcilline en s'accrochant au devenir de l'enzyme TEM-1 sur un transect de trois kilomètres où s'éteignait la pression anthropique. Les résultats de l'étude ont montré qu'il n'y avait pas de dissémination de ce marqueur primaire de résistance dans l'environnement.

Les données françaises sont rares mais les travaux reposent sur une base méthodologique combinant la microbiologie et la génétique. À l'échelle de l'Europe, les pays nordiques et anglo-saxons appliquent ce même type de méthodologie sur les rennes, les renards, les petits rongeurs et les oiseaux (Furness *et al.* 2017 ; Mo *et al.* 2018). Les études effectuées dans le sud et l'est de l'Europe ne sont pas aussi robustes (Foti *et al.* 2017 ; Kmet, Cuvalova et Stanko 2018 ; Najdenski *et al.* 2018) et souffrent de la comparaison.

7.2 Devenir des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement

7.2.1 Milieux aquatiques

Globalement, l'abondance des BRA et des GRA dans l'environnement est fonction du niveau d'anthropisation du milieu (Servais et Passerat 2009). Cependant, une fois rejetés dans l'environnement, leur devenir spatio-temporel est rarement étudié. En effet, ceci demande une bonne connaissance du fonctionnement hydrologique du système et de la couverture du bassin versant. Toutefois, en France, des études s'appuyant sur une démarche interdisciplinaire, ont été menées, ou sont actuellement en cours sur des sites ateliers.

La dilution des rejets dans les rivières est un aléa important pour évaluer la persistance des BRA et GRA dans l'environnement en prélèvement direct. Ainsi, les études de Stalder *et al.* (2014) dans la Vienne ou de Buelow *et al.* (2020) dans l'Arve, rivière torrentielle, montrent l'effet dilution sur les concentrations et l'occurrence d'intégrons et de GRA, l'effet amont et aval d'un point de rejets est cependant qualitativement marqué. Les conclusions d'Aubertheau *et al.* (2017) sur les périphytons présents de la source à la confluence de la Vienne vont dans le même sens, avec cependant la présence quasi-permanente d'IR dans les périphytons prélevés à proximité de STEU en activité. De plus, à partir de l'estimation du flux d'*E. coli* le long d'un réseau hydrologique rural, il a été démontré que les phénomènes de dilution expliquaient la faible probabilité d'une contamination des sites aval par les sites amont (où des

E. coli producteurs de shigatoxines ont été isolés), et cela, y compris en période de fort débit. Ces résultats montrent que les rejets urbains sont les sources majeures d'apport en BRA et GRA dans les eaux, y compris en milieu rural sans exploitation animale intensive.

7.2.1.1 Influence de l'urbanisation

La contamination des hydrosystèmes de surface par les BRA d'origine fécale suit le même déterminisme que la contamination par les indicateurs bactériens de contamination fécale (Servais *et al.* 2009). Ainsi, en France, en condition normale de fonctionnement des systèmes d'assainissement, les principales sources de contamination des eaux de surfaces sont les eaux usées traités de STEU, dans les zones urbanisées, auxquels s'ajoutent les eaux de ruissellement des zones agricoles. Les sources de contaminations peuvent aussi être accidentelles, telles que les ruptures de canalisations, les débordements de STEU ou de poste de relèvement. Ces accidents, généralement liés à des évènements pluvieux importants vont être de plus en plus nombreux du fait du réchauffement climatique. Celui-ci va conduire à l'intensification des précipitations et un allongement des périodes sèches en Europe. Les projections montrent une augmentation (jusqu'à 35 %) des épisodes journaliers de fortes précipitations dans la plupart des régions européennes en hiver au 21^{e} siècle, avec ainsi un risque accru de contamination par les bactéries, BRA incluses.

L'abondance en BRA a été évaluée dans le cadre du programme PIREN-Seine[47] dans le bassin versant de la Seine, un des plus anthropisés d'Europe montrant qu'elle était fonction du degré d'urbanisation du bassin versant (Servais et Passerat 2009). 71 % des souches d'*E. coli* isolées d'eaux usées hospitalières résistent à au moins un antibiotique. Cette fréquence n'est plus que de 44 % dans les eaux usées domestiques, et tombe à 2 % dans les ruisseaux forestiers (§ 7.1) (Passerat *et al.* (2010). Sur l'ensemble du bassin versant, le MAR index (voir § 7.1.2.1.1) augmente en fonction du degré d'urbanisation (Servais et Passerat 2009).

Des résultats similaires ont été observés dans la partie aval, avec une abondance plus importante en *E. coli* résistants aux ATB, dans la zone urbanisée de l'estuaire, liée aux rejets de STEU (Laroche *et al.* 2009). Dans les sédiments de surface, la contamination par des BRA dépend à la fois de la contamination de l'eau et de la dynamique particulaire (Berthe *et al.* 2008 ; Vivant *et al.* 2019) (projet DYNAPAT[48]).

Dans les aquifères karstiques et les rivières d'ordre 1 (bassin versant de la Risle), la contamination par des BRA d'origine fécale dépend de l'usage des bassins versants, de la pluviométrie, et pour les aquifères karstiques, de la vitesse de transfert de l'eau (porosité de la matrice). Ainsi, dans un hydrosystème karstique à écoulement rapide, des *E. coli* résistants aux ATB ne sont détectés dans l'eau qu'après un orage en période de pâturage (Laroche *et al.* 2010 ; Ratajczak *et al.* 2010). Des *E. coli* résistants aux ATB sont aussi isolés de périphytons et du sédiment, mais ne semblent pas y persister sous leur forme cultivable (projet OAK)[49].

En rivière ou en estuaire, des BRA portant des IR contaminent les environnements aquatiques soumis à des rejets d'eaux usées traitées. Ainsi, dans les rivières rurales et dans les aquifères karstiques, alors que des *E. coli* résistants aux ATB sont détectés dans l'eau en période pluvieuse, les *E. coli* portant des intégrons sont rares. En revanche, la contamination par ces derniers est liée à une urbanisation du bassin versant et la contamination par des rejets

[47] https://www.piren-seine.fr/

[48] Projet DYNAPAT - Impact de la dynamique particulaire sur le devenir des bactéries pathogènes dans la zone du bouchon vaseux de l'estuaire de Seine (Programme Seine-Aval 5- GIP Seine-Aval 2013).

[49] Projet OAK - Observatoire de l'Antibiorésistance dans les aquifères Karstiques (PNR-EST Anses 2018).

humains *via* les rejets de STEU (Oberlé *et al.* 2012 ; Ribeiro *et al.* 2012 ; Petit *et al.* 2018). Ainsi, les *E. coli* résistants aux ATB et portant des IR sont plus abondants dans les zones de prélèvements des estuaires et des rivières urbaines à proximité des rejets de STEU (Laroche *et al.* 2009). Par exemple, dans le bassin versant de la Seine, l'eau, les sédiments et les périphytons du site le plus anthropisé de la rivière urbaine de l'Orge (dont bassin versant présente un fort gradient d'urbanisation) sont très contaminés par des *E. coli* portant des IR (projet PANDORE). De même, la prévalence d'*E. coli* CTX-R dont des *E. coli* BLSE dans l'eau, les périphytons et les poissons prélevés à l'aval de sites de l'Ouche augmente près des zones de rejets de STEU (Bollache *et al.* 2019).

De même, dans partie aval de l'estuaire de la Seine, l'abondance d'*E. coli* portant des IR est plus élevée en période de crue et s'explique par l'augmentation brutale des apports de l'agglomération parisienne. En revanche, les *E. coli* portant des IR sont moins abondants à l'embouchure en période d'étiage, et suivent la dynamique sédimentaire.

7.2.1.2 Modification de la structure des populations bactériennes dans les continuums

Le long du continuum hôpital-STEU-rivières, la proportion des isolats d'*E. faecium* appartenant au complexe clonal CC17, fréquemment responsable d'épidémies hospitalières, est maximale dans les effluents hospitaliers puis diminue le long du continuum. On observe donc une disparition préférentielle de souches d'*E. coli* ou d'*E. faecium* d'origine clinique au profit d'une sous-population probablement mieux adaptée à l'environnement aquatique (Leclercq *et al.* 2013). Une étude en microcosme a expliqué ces résultats par une survie plus courte de la majorité de ces souches d'*E. coli* multirésistantes aux ATB (< 4 jours) dans les eaux comparativement à celle des bactéries sensibles (> 14 jours) (Berthe *et al.* 2013).

De même, dans les zones humides du massif jurassien, les *E. coli* BLSE survivent moins bien que *E. coli* et *K. pneumoniae* totaux (Henriot *et al.* 2019). Ces zones peu anthropisées et distantes des sources de contamination peuvent toutefois contenir des *E. coli* BLSE, suggérant que ces isolats sont capables de survivre dans ces environnements très différents des intestins des mammifères (Martak *et al.* 2020).

Dans ces zones humides, l'étude de la structure de la population d'*E. coli* (*i.e.* distribution relative des phylogroupes au sein de la population d'*E.coli*) montre la prédominance des phylogroupes B1 et B2 (Martak *et al.* 2020). Toutefois, les isolats résistants aux C3G appartiennent majoritairement au phylogroupe A (39,6 %) et peu aux phylogroupes B1 et B2 (7,6 et 11,3 %, respectivement). La forte proportion d'isolats d'origine humaine (appartenant principalement au phylogroupe A) peut être attribuée aux eaux usées traitées urbaines et à l'épandage des boues d'épuration.

Le long d'un réseau hydrologique rural (bassin versant de la Risle), alors que l'abondance en *E. coli* ne varie pas significativement, on observe une importante modification de la structure de la population d'*E. coli* avec une abondance plus élevée des souches du phylogroupe B2 et d'*Escherichia* des lignées cryptiques[50] sur le site forestier (amont) et une prédominance des phylogroupes E et B1 caractéristiques d'une contamination d'origine bovine sur le site pâturé (amont). Inversement, sur les sites urbains à l'aval, les phylogroupes A, D et F sont plus abondants (Petit *et al.* 2012).

[50] Souches génétiquement divergentes d'*E. coli* mais indissociables d'*E. coli* par les méthodes usuelles (SM MALDI-TOF et MLST)

7.2.1.3 Sédiments

Une fois les BRA d'origine fécale rejetées dans les milieux aquatiques, leur devenir dépend non seulement de leur capacité à surmonter les stress, la prédation et la lyse virale, mais aussi de la dynamique particulaire. En effet, dans les rivières, George, Anzil et Servais (2004) ont montré, par un suivi de l'activité glucuronidase, que le pourcentage d'*E. coli* métaboliquement actives associées aux particules de taille supérieure à 5 µm augmentait avec la concentration de matériel particulaire en suspension dans la colonne d'eau. Dans le bassin de la Seine et son estuaire, il a été montré que les *E. coli* antibiorésistants se déposaient sur des zones de dépôts de sédiments, et que leur abondance augmentait en fonction du niveau d'anthropisation du bassin versant (projet PANDORE) (Labadie *et al.* 2019). En milieu estuarien, dans la zone maximale de turbidité en période de bas débit, les bactéries associées aux particules organo-minérales sédimentent sur les zones de dépôts (vasières), où elles perdent rapidement leur cultivabilité (Berthe *et al.* 2008).

La mesure de distribution spatiale de différents GRA (*sul1*, *sul2*, *tet*(B), *tet*(M), *tet*(W) and *qnrA*) dans le lac de Genève (Suisse) où sont rejetés les effluents de STEU montre que leurs concentrations décroissent exponentiellement à mesure que l'on s'éloigne de la source de contamination (rejets des STEU). Ainsi, la concentration globale des GRA était 200 fois plus faible au centre du lac (à ~ 7 km de la source de contamination) qu'à proximité du rejet. Cette distribution spatiale suggère que la contamination des sédiments du lac par les GRA est majoritairement lié à la sédimentation des particules des effluents, porteuses de BRA (Czekalski *et al.* 2015). Une mesure du même type dans le lac Michigan (USA) a montré que la proportion des GRA provenant des eaux usées traitées de STEU rejetées dans le lac diminue à mesure que l'on s'éloigne de la zone de rejet. Ainsi, les auteurs n'ont pas retrouvé de GRA provenant des STEU dans les sédiments à 100 et 200 km de la zone de rejet (Chu *et al.* 2018). Ces deux études montrent l'influence limitée des effluents de STEU à distance des zones de rejet.

7.2.2 Milieux terrestres

Il existe de nombreux travaux, la plupart menés par des équipes de recherche chinoises, qui décrivent le devenir de BRA et de GRA dans les milieux terrestres suite à l'épandage de fertilisants organiques issus de déchets d'origine animale, domestique ou urbaine, utilisés bruts ou transformés par compostage ou digestion. Les différents compartiments étudiés sont principalement le sol dit nu (*i.e.* hors de l'influence des racines), mais également la rhizosphère (le sol sous l'influence des racines), et plus récemment la phyllosphère (*i.e.* surface des feuilles) et la macrofaune (*i.e.* vers de terre). Les données françaises sont rares, ne concernent que l'analyse du sol nu et se basent sur des approches expérimentales, allant du terrain au microcosme, dont les limites sont reportées dans le tableau XIX. Les études de terrain permettent d'estimer le devenir des GRA en conditions réelles mais l'interprétation des données est limitée par le nombre important de facteurs environnementaux susceptibles d'impacter la persistance des GRA. Même si elles ne représentent pas les conditions réelles, les études menées en microcosmes, grâce aux conditions contrôlées, permettent de mieux comprendre l'impact de certains facteurs environnementaux sur le devenir des GRA. Les deux approches (*in situ* et laboratoire) sont donc complémentaires.

Tableau XIX. Avantages et inconvénients des études menées à différentes échelles.

Échelle	Caractéristiques	Limites des approches expérimentales
In situ sur terrain à grande échelle	Application des PRO en conditions réelles	Études ponctuelles en conditions non maîtrisées En général, absence de répétition Études multifactorielles rendant difficile l'évaluation du rôle des différents facteurs sur les concentrations en GRA.
In situ en parcelles expérimentales	Application des PRO à petite échelle, en conditions climatiques réelles	Problèmes de répétitions en raison des variations des facteurs environnementaux, surtout si études menées à long terme (ex : variation climatique interannuelle) Plus une difficulté qu'un inconvénient : déterminer la taille des parcelles qui sont en général de quelques m^2
Microcosmes	Conditions contrôlées : humidité, température, répétabilité	Ne prennent pas en compte les réelles données climatiques, apport de PRO éloigné de la réalité Interprétable uniquement dans les conditions de l'étude Temps d'étude court : en général 2 mois (or, la problématique de l'ABR devrait être traitée à long terme)

En France, les études ont été menées sur le terrain, sur des dispositifs expérimentaux et en microcosmes. En raison du faible nombre de données françaises, des travaux canadiens réalisés sur des parcelles expérimentales et une étude chinoise menée en microcosme sont également détaillés dans ce chapitre.

7.2.2.1 Études de terrain et sur dispositifs expérimentaux en France

Différents projets collaboratifs combinant des études de terrain (PRO et parcelles échantillonnées chez des particuliers) et des dispositifs expérimentaux du SOERE-PRO ont évalué l'impact de l'apport de différents types de PRO sur la dynamique de GRA et d'intégrons en France métropolitaine et en Guadeloupe. Ces études intègrent également la mesure des ATB dans les PRO et les sols.

7.3.1.1.1 En France métropolitaine

Une étude, dans le cadre du plan ECOANTIBIO, s'est focalisée sur les PRO d'origine bovine (lisier, fumier, compost de fumier) et a comparé sur plusieurs sites expérimentaux et chez des particuliers, répartis dans différentes zones climatiques françaises, des parcelles amendées à des parcelles témoins (tableau XX, figure 26).

Tableau XX. Caractéristiques des sites français analysés.

Ville (Site)	Couvert végétal	Amendements	Sol
1- Feucherolles (QualiAgro) 200 vaches laitières (Prim'Hosltein)	Rotation cultures	10 x fumier (depuis 1998)	Néoluvisol Sol limoneux lessivé, pH 6,9
2- Rennes (Efele) Vaches laitières	Rotation cultures	4 x fumier (depuis 2012)	Luvisol rédoxisol limon fin, pH 6,0
3- Colmar (PRO'spective) Vaches laitières	Rotation cultures	9 x fumier (depuis 2000)	Sol limoneux, calcaire, pH 8,3
4- Grignon (ICOS) Vaches laitières	Rotation cultures	9 x lisier (depuis 2004)	Luvisol Sol limon fin argileux, pH 7,6
5- Nouzilly (site expérimental) 65 vaches laitières (Prim'Holstein) + 100 vaches (génisses, taries, réformes)	Rotation cultures	3 (2 fumiers, 1 lisier) (depuis 2017)	Limon argileux
6- Marcenat (site INRAE) Vaches laitières	Prairies et pâturages fauchés	fumier ou compost de fumier (depuis 1967)	Andosol volcanique Altitude 1 100-1 250 m sol séchant
7- Crupies (Ferme particulier) 32 vaches laitières en agriculture biologique depuis 2006	Prairie permanente, rotation cultures	8 x fumier stocké en tas (depuis 2006)	
8- Grand Auverné (Ferme particulier) Élevage laitier traditionnel, 135 Prim'Holstein génisses et taries	Rotation cultures	lisier	
9-Versailleux (Ferme particulier) Élevage laitier traditionnel, 44 vaches	Rotation : prairie pâturée / céréales / maïs	18 x fumier stocké en tas (depuis 1961)	

L'historique d'épandage varie de 3 à 60 ans avec 3 à 18 apports cumulés selon les types de sols (tableau XX). Les apports de PRO s'effectuent à l'automne ou au printemps et sont de l'ordre de 15 à 50 tonnes de produit brut par hectare par épandage pour les fumiers en tas. Leurs fréquences sont variables allant de 3 épandages répartis sur 2 années pour le site de Nouzilly (site expérimental le plus récent) à tous les 3-4 ans pour le site de Versailleux. Les doses reflètent les pratiques en vigueur chez les agriculteurs français. En dehors du fumier composté de Marcenat, les fumiers sont stockés en tas plusieurs mois, soit sur une dalle béton, soit directement sur les parcelles.

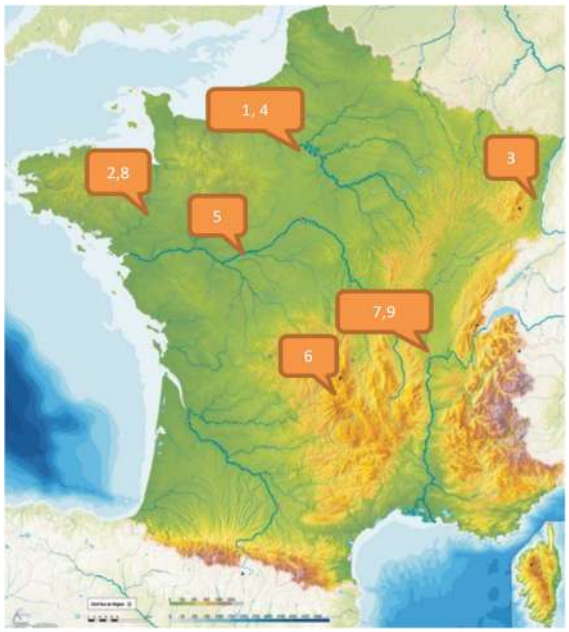


Figure 26. Répartition géographique des sites français étudiés dans le cadre du projet DABARES. Les chiffres renvoient aux sites décrits dans le tableau XX (plan ECOANTIBIO).

Les concentrations des GRA, des intégrons et des ATB sont mesurées 8 à 15 jours avant l'épandage afin d'apprécier l'effet à long terme d'amendements répétés et la résilience des communautés bactériennes. Les mesures d'abondance réalisées environ 1 mois après épandage estiment l'effet à court terme.

Dans cette expérimentation, les seuils de détection des gènes sont estimés à 10^3 copies par gramme d'échantillon (équivalent poids sec) pour les quantifications par ddPCR et à 1-5.10^4 copies, selon les gènes, pour les quantifications par qPCR. Les gènes *qnr (A, B* et *D)* n'ont pas été détectés dans les PRO et dans les sols témoins et amendés, quel que soit le site. Par contre, tous les PRO, y compris ceux utilisés par la ferme en agriculture biologique à Crupies, renfermaient les gènes *sul*, *tet* et *intI*. La figure 27 illustre l'abondance absolue de ces gènes pour quatre des neuf PRO.

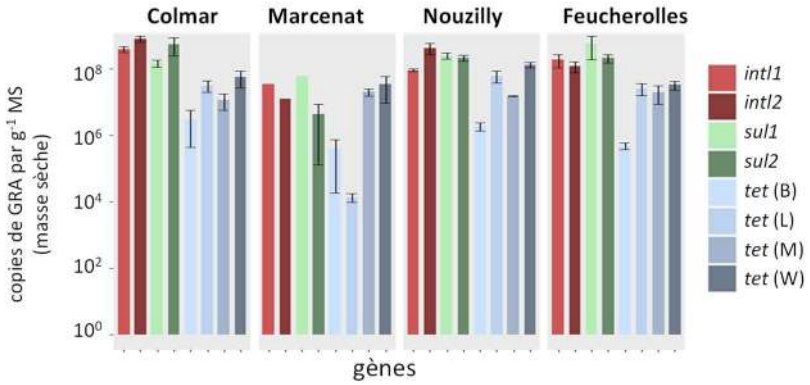


Figure 27. Abondance absolue de gènes de résistance aux antibiotiques et d'intégrons dans des PRO dérivés de fumiers ou de composts de fumier de bovins.
Ces résultats sont issus du projet DABARES du plan ECOANTIBIO.

Les parcelles amendées et quatre des parcelles témoins contiennent avant épandage entre 10^4 et 10^5 copies de gènes *sul*.g MS^{-1}. La comparaison des parcelles témoins et amendées avant épandage montre une légère augmentation de cette abondance sur sept sites sur le long terme (figure 28). Cependant, les abondances, souvent à la limite de la quantification, et

le faible nombre de répétitions par site, ne permettent pas de conclure à un impact significatif sur le long terme.

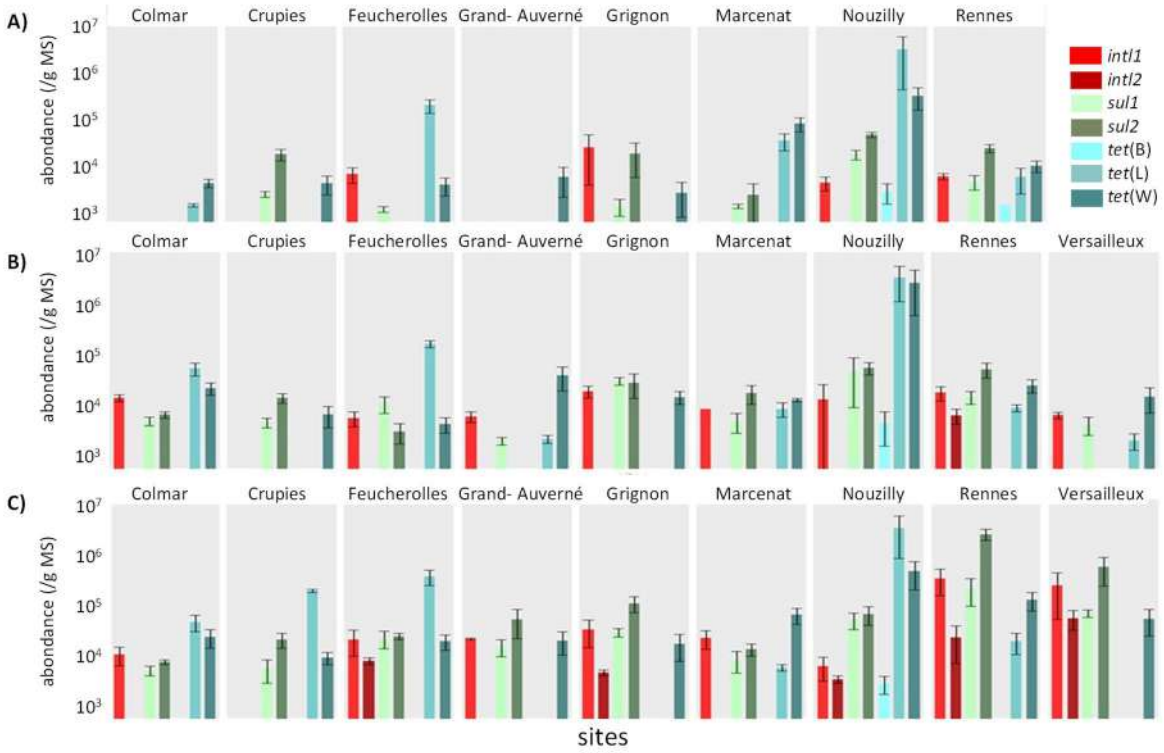


Figure 28. Abondance absolue de gènes de résistance aux antibiotiques et d'intégrons dans des sols agricoles de 9 sites fertilisés avec des produits résiduaires organiques d'origine bovine.

A : sols contrôles non amendés ; B : parcelles amendées avant épandage ; C : parcelles amendées 1 mois après épandage. Ces résultats sont issus du projet DABARES du plan ECOANTIBIO.

Après épandage, des augmentations de 1 à 2 log peuvent être observées, à l'exemple des parcelles amendées de Feucherolles, de Grand-Auverné, de Rennes et du site de Versailleux. Ainsi, l'effet à court terme se traduit parfois par une nette augmentation de l'abondance des gènes *sul*. Le gène *intI1* peut ne pas être détecté ni dans les parcelles témoins ni dans les parcelles amendées (Crupies) ou détecté uniquement dans les parcelles amendées avant et après épandage (Colmar, Marcenat et Grand-Auverné). Les concentrations de *intI1* varient de 5.10^3 à 5.10^4 copies.g MS^{-1} avant épandage et augmentent de 0,5 à 1,5 log après épandage (Versailleux et Rennes). La prévalence et l'abondance des gènes *tet* sont très variables. Ainsi, le gène *tet*(B) a rarement été détecté alors que le gène *tet*(W) est quasiment toujours détecté (de 5.10^3 à 10^5 copies.g MS^{-1}) dans les parcelles témoins et amendées de tous les sites. L'abondance du gène *tet*(L) est extrêmement variable : il est indétectable dans les parcelles témoins et amendées des sites de Crupies et Grignon, et atteint 10^6 copies.g MS^{-1} dans certaines parcelles (Nouzilly). Un enrichissement de ce gène a été observé entre les parcelles témoins et les parcelles amendées avant épandage (effet à long terme) pour le site de Colmar mais également entre les parcelles amendées avant et après épandage (effet court terme) pour les sites de Crupies, de Feucherolles et de Rennes.

Des données complémentaires sont disponibles pour le site de Feucherolles. L'impact sur la dynamique des GRA d'un apport de déchets d'origine urbaine appelé DVB (compost d'un mélange de boues de STEU et de déchets verts) a été comparé à celui de l'apport de fumier de bovins et au témoin non amendé. La figure 29 résume les données pour l'année 2013. Les gènes *sul1* et *sul2* ont été détectés à des niveaux élevés dans les deux amendements (jusqu'à $3,7.10^9$ copies de *sul1*.g^{-1} de fumier sec). Similairement, le gène *qnrD* a été détecté à des niveaux importants dans les deux amendements (9.10^6 *qnrD*.g^{-1} de fumier sec et 1.10^6.g^{-1} de

compost de boue de STEU sec). Les deux gènes *sul*, retrouvés dans tous les sols témoins, sont détectés à des niveaux plus élevés dans les sols amendés avec le DVB et à des niveaux encore plus élevés (différences significatives $p < 0,05$) dans les sols traités avec le fumier. Les gènes de résistance aux quinolones *qnrA* et *qnrD* ont été détectés dans les sols uniquement après l'apport de DVB. De façon inattendue, un GRA codant une BLSE ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$) a également été détecté à l'état de trace dans les deux amendements, dans le sol témoin et dans les sols après l'amendement.

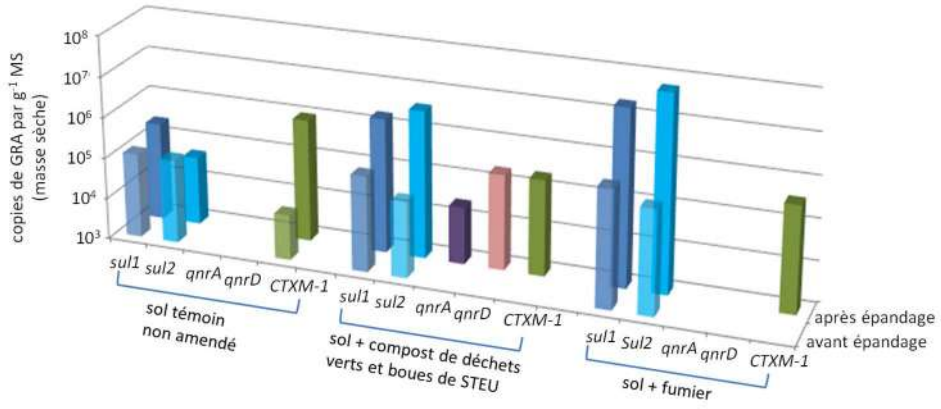


Figure 29. Abondance de gènes de résistance aux antibiotiques dans des sols du site de Feucherolles (Octobre 2013) avant et un mois après un épandage de produits résiduaires organiques [fumier ou compost de déchets verts et boues de stations de traitement des eaux usées (4 répétitions)].

Les tests statistiques ont été réalisés par une analyse ANOVA, mais ne sont pas représentés sur la figure.

Il se dégage des tendances de ces mesures de contamination par des GRA des sols suite à un épandage de fumier/lisier de bovins dans des conditions réalistes et correspondant aux pratiques des agriculteurs français.

Pour les GRA portés par une grande diversité d'espèces bactériennes, associés à l'Homme ou l'animal (*sul*, *tet, intI1*) :

- Ils sont présents dans toutes les parcelles amendées,
- Leurs concentrations augmentent en général de 1 à 2 log un mois après épandage,
- Leurs concentrations n'augmentent généralement pas sur le long terme dans les parcelles amendées malgré des apports répétés. Lorsqu'une augmentation est observée, elle est d'environ 0,5 log.

Pour les GRA et les intégrons mis en évidence plus récemment et avec une dissémination moindre au sein des espèces pathogènes ($bla_{CTX\text{-}M}$, *qnr*) :

- Les gènes *qnr* sont rares (< 10^3 copies.g^{-1} d'échantillon) dans toutes les parcelles
- Les gènes $bla_{CTX\text{-}M}$ sont détectés occasionnellement dans des parcelles témoins et amendées

Comme mentionné dans le tableau XXI, il convient de souligner les limites de ces études *in situ* conduites à l'échelle des territoires et se voulant le reflet de pratiques réalistes.

Ces mesures sont soumises à une variabilité occasionnée par des différences de :

- Zone géographique (*i.e.* effet climat),
- Topologie des parcelles (*i.e.* degré de la pente et conséquence sur le ruissellement),
- Nature du sol (*i.e.* variabilité texturale et structurale) et ses propriétés physiques et chimiques,

- Durée de l'historique d'épandage, de la saison à laquelle cet épandage est réalisé (printemps ou automne) ainsi que l'historique de couvert végétal,
- Caractéristiques de l'amendement (*i.e.* plus ou moins paillé) influençant sa dégradabilité et sa valeur nutritive pour les micro-organismes,
- À une échelle plus fine, de diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes des PRO et des sols.

7.3.1.1.2 En Guadeloupe

Une étude de terrain sur une parcelle en friche d'un particulier a été menée en Guadeloupe (projet ADEME – DABRAMOR) pour évaluer l'impact sur la dynamique des GRA et des intégrons de l'épandage répété de différents PRO à base de déchets animaux (fientes de volailles, crottin de chevaux), de déchets urbains (boues de STEU) et de déchets verts (figure 30).

Figure 30. Photo du dispositif expérimental en Guadeloupe.
Parcelle préalablement en friche et couverte d'herbacées sauvages au cours des 5 années antérieures à la mise en place du dispositif.

Les PRO sont des composts et, à l'exception des crottins, associent déchets animaux ou urbains à un mélange de déchets verts (palettes de bois, branches de palmier, herbacées sauvages, vinasse de canne à sucre). Le compost est fourni par le particulier ou par un industriel du compostage. Les composts ont été épandus en parallèle sur des cultures de concombres et de patates douces. Les GRA et les intégrons ont été recherchés dans les sols au cours de 3 sessions de culture pour l'épandage de composts de déchets verts ou d'origine animale (durée d'une session environ 6 mois et durée totale d'environ 18 mois) et un seul cycle pour l'apport de compost de boues de STEU (tableau XXI).

Tableau XXI. Description des successions d'épandage de composts de produits résiduaires organiques.

Parcelle	Culture		1er apport	2ème apport	3ème apport
P1	concombres	contrôle	aucun PRO	déchets verts	déchets verts
P1	patates douces				
P2	concombres	contrôle	crottin	crottin	fientes
P2	patates douces				
P3	concombres	contrôle	fientes	fumier de cheval	fientes
P3	patates douces				
P4	concombres	contrôle	fientes	fientes	fientes
P4	patates douces				
P5	concombres	contrôle			boues de STEU
P5	patates douces				
		T0	T1 T2	T3 T4	T5 T6

Sur la durée de l'expérimentation de 18 mois, 6 campagnes échantillonnages ont été réalisées :

- T0 : avant le 1er apport de PRO
- T1 : après le 1er apport de PRO
- T2 : après la récolte des légumes et avant le 2e apport
- T3 : après le 2e apport de PRO
- T4 : après la récolte des légumes et avant le 3e apport
- T5 : après le 3e apport de PRO
- T6 : après la récolte des légumes

Des mesures d'abondance ont été réalisées aux différents temps (T0 à T6) selon la méthodologie décrite précédemment pour le projet du plan ECOANTIBIO.

Les résultats (figure 31) montrent :

- L'absence de gènes *bla* et *qnr* dans les sols avant et après amendement malgré leur présence dans certains composts (*i.e.* 10^4 copies bla_{IMP}.g MS^{-1}) ou certains déchets avant compostage (10^6 copies bla_{CTX-M} .g MS^{-1} de fientes de volailles, et 5.10^5 - 10^7 copies *qnrA* et *qnrB*.g MS^{-1} de déchets verts).
- La présence dans le sol avant le début de l'expérimentation de 10^5 copies *intI1*.g MS^{-1} et de 10^6 copies *sul*2.g MS^{-1}, mais l'absence de *intI2 et sul1*.
- Un impact de l'épandage sur l'abondance des GRA et des intégrons avec une augmentation variable selon le compost considéré et le GRA, celle-ci semblant étroitement liée à l'abondance de ces gènes dans le compost. Ainsi, les parcelles P3 et P4, amendées 2 à 3 fois avec des composts de fientes, présentent les abondances en GRA et en intégrons les plus élevées, suivies des parcelles amendées en composts de déchets verts ou de crottins de chevaux.
- Un retour à l'état initial (absence de différence significative de l'abondance des gènes avec le T0) à l'issue des 18 mois de l'expérimentation (T6) pour tous les gènes cibles sauf dans le cas de la parcelle P4 (3 apports de composts de fientes de volailles).
- Pour un amendement donné, il a rarement été observé de différence significative d'abondance de gènes suivant le type de culture (concombres ou patates douces).

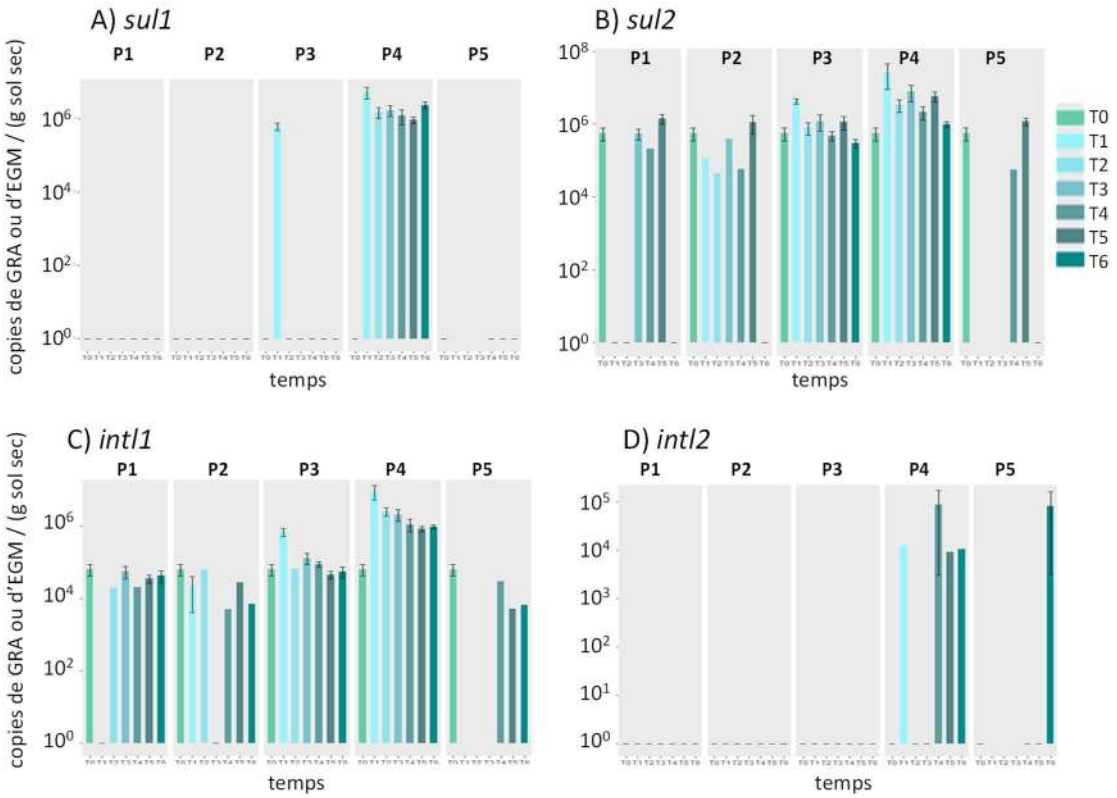


Figure 31. Abondance au cours du temps (T0 à T6) des gènes *sul* et *intI* dans les sols au cours de trois cycles de cultures maraichères et après un ou plusieurs épandages de produits résiduaires organiques (compost de déchets verts, de fientes de volailles/déchets verts, de crottins, et de boues de stations de traitement des eaux usées/déchets verts.

Se référer au tableau XXI pour l'historique des parcelles P1 à P5.

Ce projet a montré que tous les intrants et leurs dérivés compostés sont sources de GRA et d'intégrons. Plus les composts épandus sont chargés en ces gènes, plus leur abondance est élevée dans les sols après épandage. Seuls les apports répétés de PRO fortement chargés (composts de fientes) augmentent la durée de persistance de ces gènes dans les sols amendés.

7.2.2.2 Études sur dispositifs expérimentaux au Canada

Plusieurs expériences en Ontario (Canada) ont évalué la persistance de GRA, d'intégrons, de BRA et d'ATB dans le sol de parcelles expérimentales après l'apport de PRO d'origine fécale (Marti, Jofre et Balcazar 2013 ; Marti *et al.* 2014 ; Rahube *et al.* 2014 ; Lau *et al.* 2017 ; Tien *et al.* 2017 ; Murray *et al.* 2019). Cette région, caractérisée par la proximité des Grands Lacs possède un climat continental humide.

L'épandage de lisier de porcs ou de vaches laitières à la dose agronomique habituellement pratiquée, qui conduit à un apport de 10^7 à 10^{10} copies de gènes/kg de sol, a augmenté les concentrations de certains gènes cibles. Ainsi, les gènes *sul1*, *intI1* (figure 32), *erm*(B) et *strB* étaient significativement plus abondants dans le sol traité avec les PRO que dans les parcelles non traitées (Marti *et al.* 2014).

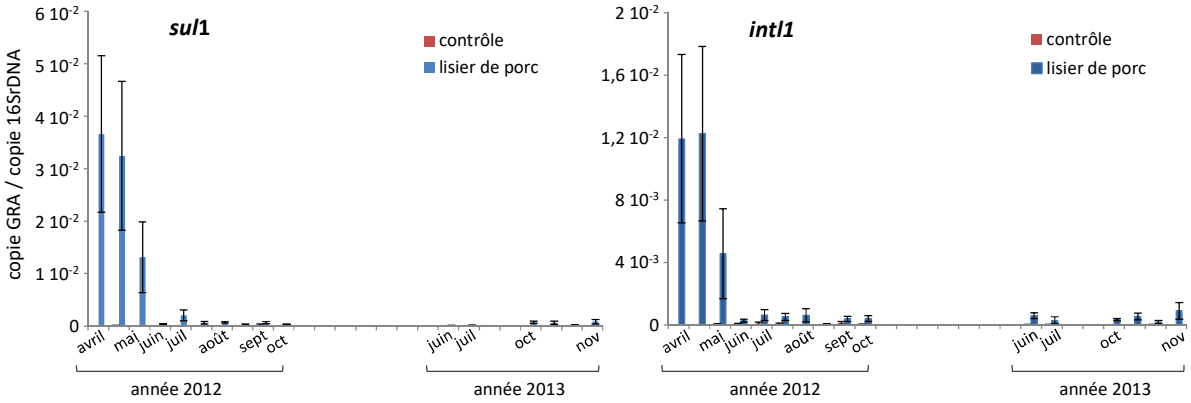


Figure 32. Abondance relative des gènes *sul1* et d'*intI1* dans le sol de parcelles sans amendement (contrôle) et avec amendement (après épandage de lisier de porcs au printemps 2012).

L'abondance du gène était significativement différente entre les échantillons de sols contrôles et amendés.

Le gène *intI1* est resté plus abondant dans les parcelles fertilisées que dans les parcelles témoins pendant au moins un an après l'épandage, alors que les indicateurs bactériens (*E. coli* et *Enterococcus* spp.) ont disparu en quelques semaines (Marti, Jofre et Balcazar 2013). Les résultats de ces études et d'autres données canadiennes non publiées montrent sans équivoque que les GRA et les intégrons sont présents à une concentration plus élevée pendant une ou plusieurs années après l'épandage de lisier ou de fumier d'animaux d'élevage (vaches laitières, porcs, volailles), ce qui est en accord avec la persistance de *intI1, intI2 et sul1* observée après les apports successifs de compost de fientes de volailles dans le sol des parcelles du projet DABRAMOR.

L'une des questions soulevées par ces études concerne l'origine de l'enrichissement des GRA après l'épandage : proviennent-ils uniquement des PRO et / ou de la multiplication des bactéries du sol, porteuses de ces gènes ? La croissance de ces dernières serait alors favorisée par l'apport des PRO qui, *via* l'apport de matière organique et d'éléments nutritifs, modifie la composition des communautés microbiennes du sol (Udikovic-Kolic *et al.* 2014).

Une expérience de terrain à long terme, initiée en 1998, a consisté à épandre du compost de lisier de porcs (CLP) ainsi que deux composts de déchets organiques d'origine non fécale (déchets alimentaires – CDA, ou déchets de jardin - CDJ) à des doses agronomiques identiques (Scott *et al.* 2018). Le sol a été échantillonné après l'épandage des composts pendant 10 ans (de 1999 à 2009), et les GRA ont été quantifiés par qPCR. Comparé au sol témoin non traité, l'apport des trois PRO a augmenté l'abondance de certains GRA (*sul1*, *strA*, *strB*) pendant les trois ans (CDJ, CDA) ou les cinq ans (CLP) qui ont suivi l'épandage (figure 33). En revanche, l'impact de l'épandage après 10 années n'est plus visible.

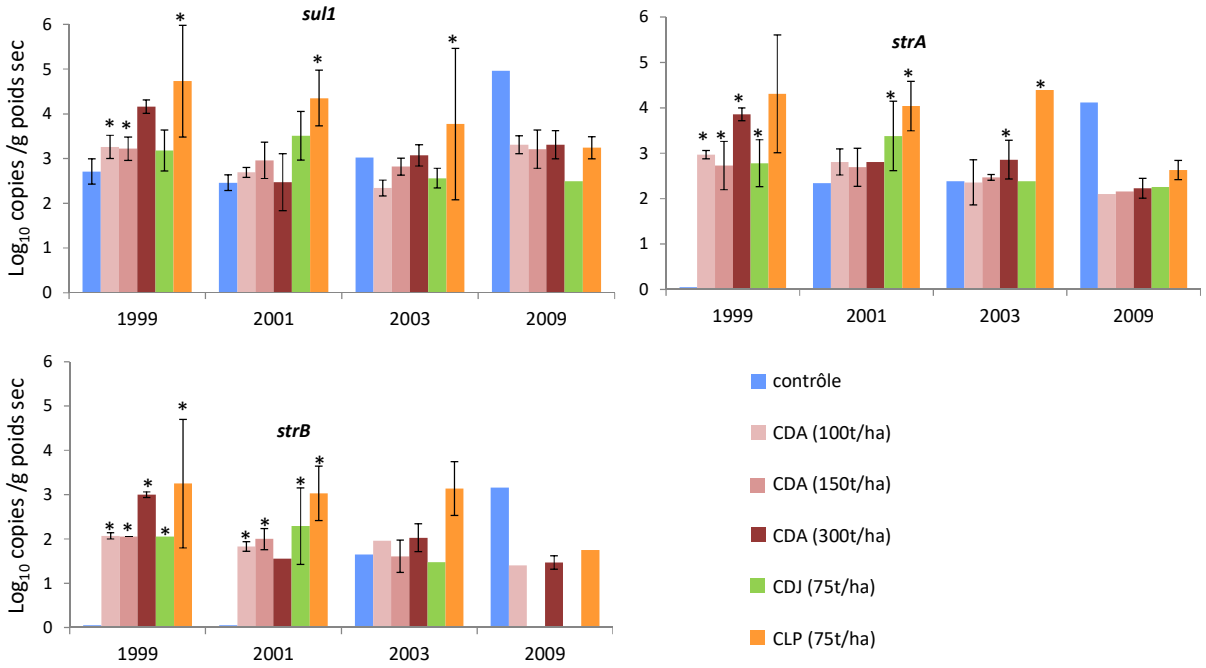


Figure 33. Concentrations en gènes *sul1, strA* et *strB* dans le sol témoin et dans les sols amendés avec du compost de lisier de porcs (CLP) de déchets alimentaires (CDA) et de déchets de jardin (CDJ).

Le symbole * indique une différence d'abondance significative entre l'abondance du GRA dans le sol contrôle et dans le sol après épandage (p<0,05). D'après Scott *et al.* (2018).

L'abondance des GRA était toujours supérieure dans le sol amendé avec le compost de lisier de porcs, comparativement aux sols amendés avec les deux autres types de composts, soulignant que l'origine du PRO (fécale / non fécale) a un impact sur la concentration en GRA du sol. Toutefois, l'épandage de PRO d'origine non fécale, en apportant de la matière organique, peut aussi conduire à augmenter la concentration en GRA portés par les bactéries du sol. Indépendamment de l'origine des déchets, cette étude a montré que la concentration en GRA du sol est influencée pendant au moins trois ans par l'apport de compost.

Il existe différentes possibilités de traitement des effluents d'élevage, notamment la digestion anaérobie, le compostage et la déshydratation. Par rapport au fumier de vaches laitières, le compostage réduit l'abondance des GRA de 2-3 log (Tien *et al.* 2017). Les municipalités disposent de plusieurs options pour traiter les boues d'épuration, notamment la digestion anaérobie, la digestion aérobie, la stabilisation à la chaux et le traitement thermique. La chaux ou la stabilisation thermique des boues a permis de réduire les concentrations des GRA de 1 à 5 log. Il est intéressant de noter que les traitements appliqués au fumier (compostage, digestion anaérobie, déshydratation) ou aux boues de STEU (digestion anaérobie, stabilisation à la chaux, traitement thermique) réduisent l'abondance des GRA mais n'influencent pas la cinétique de disparition des GRA dans le sol après épandage (Lau *et al.* 2017 ; Tien *et al.* 2017 ; Murray *et al.* 2019).

En conclusion, il existe plusieurs méthodes de traitement des PRO qui, en diminuant leur concentration en GRA, limitent le risque de transmission de ces GRA aux cultures ou aux ressources en eau.

7.2.2.3 Études en microcosmes

7.2.2.3.1 Études françaises

7.2.2.3.1.1 Dynamique des gènes sul dans des microcosmes de sol ayant reçu des doses croissantes de sulfaméthoxazole via un apport de produits résiduaires organiques

Cette expérimentation a été réalisée avec le sol du dispositif de QualiAgro prélevé dans la parcelle témoin. Similairement, les PRO utilisés (fumier et compost de boues de STEU/déchets verts) sont ceux épandus sur ce dispositif. Cette étude étudiait l'effet dose ATB sur la dynamique des gènes *sul*. Les microcosmes contenaient 200 g de sol tamisé et 6 mg de PRO. Les gènes *sul* sont présents en quantité importante dans les deux amendements. Lorsqu'il n'y a pas de nouvel apport de sulfaméthoxazole (SMX) dans le sol, la quantité de gènes *sul* diminue au cours du temps (figure 34). L'apport de doses croissantes de SMX a tendance à augmenter la quantité de gènes dans le sol plus particulièrement sur des temps d'exposition longs.

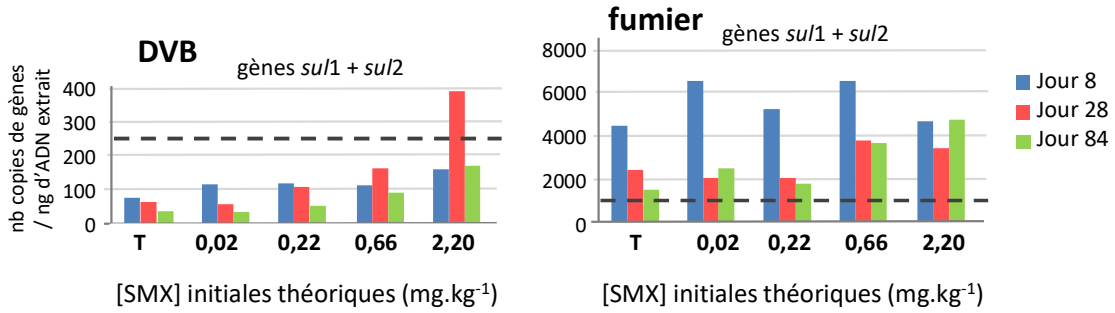


Figure 34. Évolution du nombre de copies des gènes *sul1* et *sul2* au cours du temps dans des microcosmes de sol amendés par du fumier ou un compost de boues et déchets verts (DVB) supplémentés par du sulfaméthoxazole (SMX) en doses croissantes.

La ligne pointillée représente la quantité de gènes *sul1* et *sul2* apportés par les amendements et présents dans le sol avant le début de l'expérience.

7.2.2.3.1.2 Dynamique des gènes de résistance aux antibiotiques dans un dispositif de colonne de sol exposé à un fumier contaminé par un cocktail antibiotiques/éléments traces métalliques

Cette expérimentation a été réalisée avec le sol du dispositif de Feucherolles prélevé dans la parcelle témoin et le PRO utilisé est le fumier épandu sur ce dispositif. La mise en place des colonnes est illustrée sur la figure 35. Cette étude étudiait l'effet dose/réponse de mélanges ATB/métaux apportés (au temps T0) *via* du fumier sur la dynamique des GRA, à moyen terme (3 mois). Les colonnes de 40 cm de haut et 15 cm de diamètre ont été remplies avec du sol prélevé sur deux « horizons » (horizon de labour correspondant à l'horizon d'incorporation du PRO, et horizon inférieur) et amendées au laboratoire avec du fumier dopé avec différentes doses d'ATB (sulfaméthoxazole, SMX, et ciprofloxacine, CIP) et de métaux (cuivre et zinc).

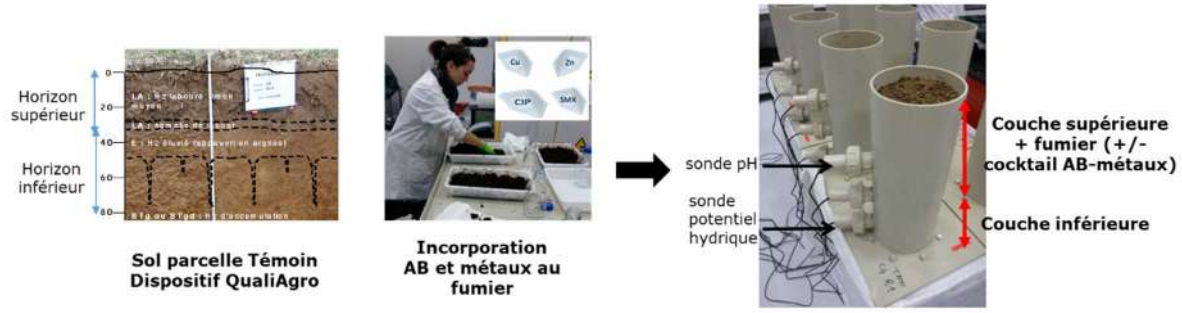


Figure 35. Dispositif « grandes colonnes » (H = 40 cm et diamètre = 15 cm) et principe général des expérimentations dose-réponse au laboratoire et avec contamination des produits résiduaires organiques (fumier) avant son mélange au sol, puis incorporation dans l'horizon de surface.

Les doses, apportées en une seule fois, sont récapitulées dans le tableau XXII. La dynamique des gènes *sul* et *qnr* a été suivie à 0, 7, et 100 jours en parallèle de celle des métaux et des ATB.

Tableau XXII. Quantités de contaminants apportés dans les contrôles (C et CM) et dans les essais (D1 à D4).

	Concentrations des contaminants (mg.kg^{-1} de sol sec)					
Contaminants	**C**	**CM**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**
Cuivre	0	100	100	100	100	100
Zinc	0	300	300	300	300	300
Sulfaméthoxazole	0	0	0,05	0,5	1	2
Ciprofloxacine	0	0	0,15	1,5	3	6
PEC[a] métaux	0	5X	5X	5X	5X	5X
PEC ATB	0	0	1X	10X	20X	40X

[a] PEC : predicted environmental concentration.

Les gènes *qnrA* et *qnrB* n'ont jamais été détectés ni dans le fumier, ni dans les sols. Le gène *qnrD* a été détecté dans le fumier à 7.10^3 copies.g MS^{-1} mais non détecté par la suite dans les colonnes de sol. Les gènes *sul1* et *sul2* sont présents à T0 dans les deux horizons du sol (~10^7 copies.g MS^{-1} dans l'horizon supérieur et 4.10^4 à 4.10^5 dans l'horizon inférieur) (figure 36). Ces deux GRA sont également abondants dans le fumier utilisé (~10^9 copies.g MS^{-1} pour *sul1* et *sul2*). Seule la concentration du gène *sul1* augmente après 100 jours d'amendement avec les PRO D3 (dans les deux horizons) et D4 (dans l'horizon supérieur). Les concentrations du gène *sul2* n'ont varié dans aucune des conditions testées (figure 36).

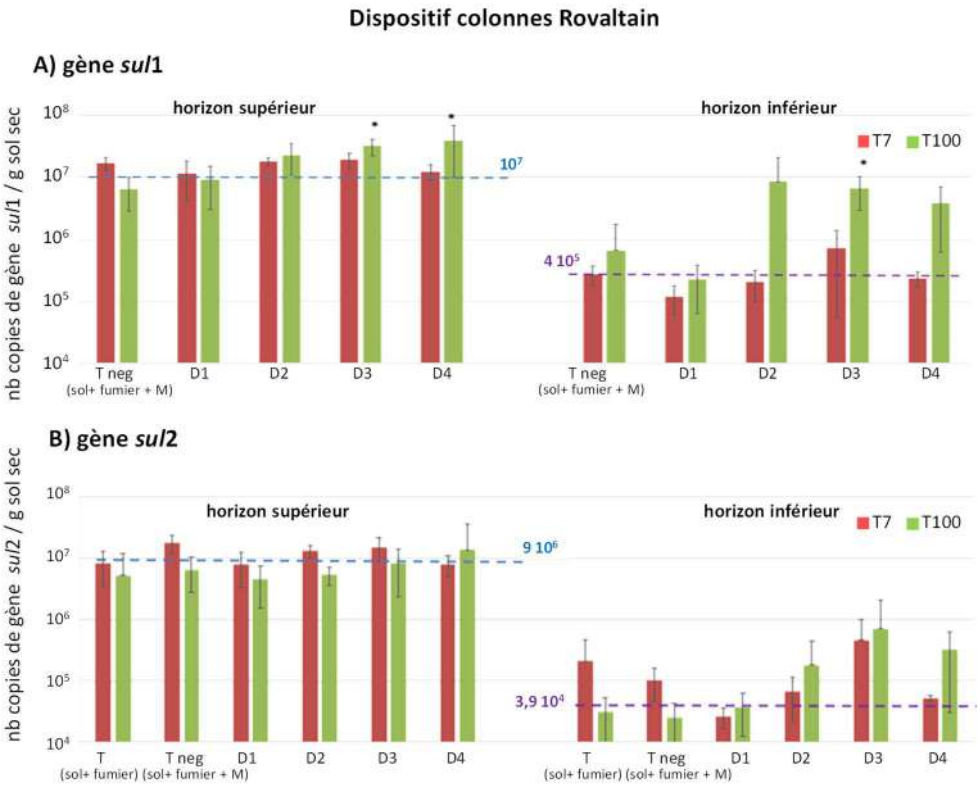


Figure 36. Abondance des gènes *sul1* (A) et *sul2* (B) dans les horizons supérieur et inférieur des colonnes de sol amendé par différentes doses de cocktails d'antibiotiques et d'éléments traces métalliques et à différents temps.

Les traitements significativement supérieurs au sol témoin sans ATB sont indiqués par une étoile. La composition des cocktails des essais D1 à D4 est décrite dans le tableau XXII. Les abondances initiales moyennes à T0 des deux gènes *sul* dans les sols après l'apport du fumier et du cocktail d'ATB/métaux sont représentées par une ligne horizontale pointillée.

Les écart-types reportés sur la figure 36 illustrent la variabilité des mesures et la fragilité des conclusions. Ainsi, l'apport de dose importante d'ATB (à partir 1 mg.kg^{-1} de SMX, 3 mg.kg^{-1} CIP, 100 mg.kg^{-1} Cu, 300 mg.kg^{-1} de Zn) augmente la prévalence des gènes *sul1* dans l'horizon supérieur et inférieur des colonnes 100 jours après l'application. L'effet n'a pas été mis en évidence à 7 jours. L'augmentation de la concentration du gène *sul1* dans l'horizon inférieur indiquerait une migration verticale des BRA et/ou de leurs GRA et/ou un enrichissement des populations bactériennes porteuses de ces GRA sous l'effet de la migration du SMX dans l'horizon inférieur. En effet, les dosages du SMX total et extractible dans les deux horizons au cours du temps ainsi que dans les percolats récupérés à T100 montrent l'importante mobilité du SMX et sa forte disponibilité. Une pression de sélection a pu ainsi s'exercer sur la communauté bactérienne de l'horizon inférieur et provoquer un enrichissement des populations porteuses des gènes *sul1*.

7.2.2.3.2 Étude des apports de lisier de porcs

Leclercq *et al.* (2016) ont étudié l'impact de l'apport ponctuel de lisier de porcs, sur une durée de 2 mois en conditions contrôlées (25°C, ratio sol/lisier de 100/5) sur l'évolution des communautés bactériennes et sur la dynamique de 25 GRA conférant une résistance aux tétracyclines, aux aminosides, aux amphénicols et aux sulfamides.

Sur les 25 GRA recherchés, 13 étaient quantifiables dans le sol. Immédiatement après l'apport du lisier (T0 de la cinétique), il a été observé dans ce mélange sol/lisier un enrichissement des GRA d'un facteur 30 à 10 000, selon les GRA. Les abondances mesurées au cours du temps

varient en fonction du GRA (figure 37) mais l'abondance relative de la majorité des gènes (10/13) demeure supérieure à celle du sol témoin deux mois après l'apport de lisier.

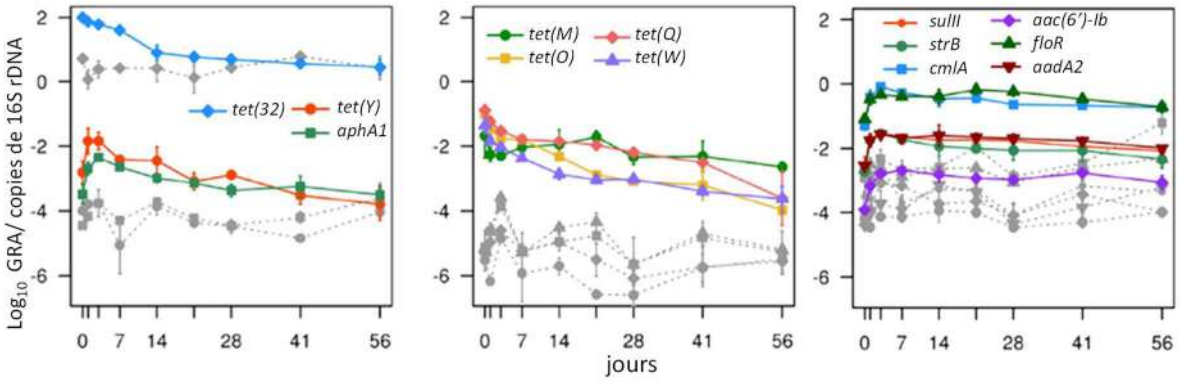


Figure 37. Évolution de l'abondance relative de 13 gènes de résistance aux antibiotiques dans un sol amendé avec du lisier de porcs (Leclercq *et al.* 2016).
En gris et pointillés : abondance relative des GRA dans le sol témoin.

La plupart des bactéries spécifiques du lisier ont disparu en 1 à 4 semaines. Seuls quelques taxons ont persisté, à l'exemple de deux *Clostridiales* qui ont été associées à la persistance des GRA *tet*(W) et *tet*(O) codant la résistance aux tétracyclines. Mais il est à noter que ces deux gènes étaient aussi associés à des bactéries du lisier qui n'ont pas persisté dans le sol.

L'apport de lisier a également conduit à la croissance de certaines espèces bactériennes *via* l'apport de nutriments. Ainsi, la dynamique des bactéries appartenant aux genres *Acinetobacter* et *Pseudomonas* et à l'ordre des *Methylococcales* était fortement liée à celles des GRA associés aux γ-protéobactéries (panel de droite, figure 37). Toutefois, les dynamiques similaires des OTU et des GRA peuvent refléter une simple croissance de ces OTU due à l'apport de matière organique sans qu'elles soient porteuses des GRA.

Cette étude montre que la persistance des GRA dans les sols après épandage est liée (i) à la survie de quelques bactéries originaires du lisier (dont les *Clostridiales*) et (ii) à l'enrichissement de certaines bactéries du sol portant des GRA à l'exemple des *Acinetobacteria* et des *Pseudomonas*.

7.2.2.4 Bilan des travaux menés

Il ressort des différentes études de terrain que le devenir des GRA dans les sols amendés dépend du type de GRA, de la nature du PRO et des conditions climatiques. Par ailleurs, le traitement du PRO (méthanisation, compostage ou stockage) en influençant la concentration des GRA peut également affecter leur devenir dans le sol.

L'effet des amendements sur les sols est très difficile à mesurer. La nature même des substrats solides explique une grande partie de la variabilité des mesures. Ainsi, des GRA peuvent avoir des cinétiques différentes après amendements des sols. L'accumulation de certains GRA dans les sols amendés n'est pas systématique et peut concerner les sols amendés de façon répétée avec des PRO très riches en GRA ou contenant de fortes concentrations d'ATB et ETM. Cet enrichissement peut être dû à la persistance dans le sol de bactéries apportées par les PRO, à la persistance des GRA sous forme d'ADN acellulaire (Yu *et al.* 2020), ou à une croissance de bactéries du sol, porteuses de GRA, se multipliant grâce à l'apport de matière organique et d'éléments nutritifs.

Les données obtenues en conditions contrôlées, avec une approche plus mécanistique, sont complémentaires de celles observées sur le terrain. Elles ont permis de montrer que les doses d'ATB les plus élevées ont conduit aux concentrations en GRA les plus fortes. Un effet cocktail (mélange d'ATB et de métaux à fortes concentrations) a été démontré sur l'abondance des gènes *sul1* dans des colonnes de sol. Par ailleurs, il a été mis en évidence une migration verticale d'ATB dans le sol qui pourrait expliquer l'augmentation de l'abondance de certains

GRA dans l'horizon inférieur. Il est toutefois possible que cette augmentation soit également due à la migration verticale des BRA et/ou des GRA associés.

En principe, les changements dans l'abondance des GRA accompagnant un « effet d'amorçage » dû à l'amendement organique ou à d'autres intrants (ex : rhizodéposition) se situeraient dans la « plage de fonctionnement normal » de l'abondance des GRA caractéristique de ces systèmes dynamiques. Des connaissances supplémentaires définissant cette plage de fonctionnement normal sont nécessaires pour établir une base de référence par rapport à laquelle les impacts anthropiques peuvent être évalués.

Les gènes présents dans les PRO sont véhiculés par des bactéries capables de se développer dans les conditions du tube digestif humain ou animal et qui ont été soumises à de multiples pressions de sélection. Ainsi, les bactéries des PRO sont plus susceptibles que les bactéries du sol de contenir des éléments génétiques conférant une résistance à plusieurs classes d'ATB et transférables entre des bactéries entériques commensales ou pathogènes. Ces hypothèses doivent être testées expérimentalement. La meilleure méthode actuellement disponible pour quantifier les GRA (ddPCR) a une limite de détection d'environ 10^3 copies.g^{-1} de sol (soit 10^6 copies.kg^{-1}). Un champ d'un hectare à une profondeur de 10 cm contient 10^6 kg de sol. Par conséquent, à l'échelle du champ, la limite de détection est de l'ordre de 10^{12} copies de gènes par ha. Cette concentration serait soumise à une concentration plusieurs fois supérieure lors d'un nouvel apport d'amendement organique. Il n'existe actuellement aucun cadre d'évaluation des risques qui indiquerait si cette limite de détection définie sur le plan opérationnel représente, ou pas, un seuil de risque acceptable.

7.2.2.5 Rhizosphère et phyllosphère

Il n'y a pas de donnée française relative à l'ABR dans la rhizosphère et la phyllosphère (surface des feuilles). Ces données sont également rares à l'échelle européenne ou mondiale.

Cependant, l'équipe de Smalla[51] en Allemagne a comparé la prévalence de gènes de résistance aux sulfamides dans le sol nu (hors de l'influence de la plante) et le sol rhizosphérique (sol sous influence de l'exsudation racinaire) (Jechalke *et al.* 2013 ; Kopmann *et al.* 2013). Ces travaux ont été menés en conditions contrôlées au laboratoire (étude en mésocosmes) et au champ sous couvert végétal de type maïs ou prairie pour évaluer l'effet d'un seul apport ou d'apports répétés (N=3) de lisier de porcs traités à la sulfadiazine. Le suivi de l'abondance relative des gènes *sul1* et *sul2* sur plusieurs mois a mis en évidence après 63 jours une abondance plus élevée de ces gènes dans le sol et la rhizosphère du maïs des mésocosmes amendés (un apport) en lisier que dans les mésocosmes non amendés. Cette augmentation est le fait d'un apport de gènes présents dans le lisier. Elle est cependant moindre dans la rhizosphère que dans le sol nu. L'étude au champ a confirmé ces observations. Ces différences entre sol nu et sol rhizosphérique résulteraient d'une exposition moindre à l'ATB compte tenu de sa dissipation plus importante dans la rhizosphère que dans le sol nu. Il est à noter que si la différence de prévalence en gène *sul* entre sol amendé et sol contrôle reste stable au cours du temps, celle-ci tend à augmenter dans la rhizosphère. Une combinaison de facteurs biotiques incluant des différences entre communautés bactériennes rhizosphériques et communautés du sol nu au niveau quantitatif (biomasse), qualitatif (diversité taxonomique) et métabolique (bactéries plus actives dans la rhizosphère), et de facteurs abiotiques contrôlant la biodisponibilité de la sulfadiazine, expliqueraient ces différences de dynamique spatiale et temporelle.

Une autre étude a mesuré l'effet d'un apport de fumier contaminé par des tétracyclines et quinolones sur l'abondance des gènes *tet*, *sul* et *intI1* dans le sol nu, le sol rhizosphérique, la

[51] Julius Kühn-Institut—Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Braunschweig, Germany

phyllosphère et les endophytes (intérieur des feuilles ou racine) de laitue et endives (Wang *et al.* 2015). À l'exception d'un des 12 GRA, aucune différence d'abondance n'a été observée au cours du temps (après 30 et 60 jours) entre l'abondance relative de ces gènes dans le sol nu et celle des gènes du sol rhizosphérique. L'effet de l'amendement sur l'abondance des gènes est variable selon le gène considéré, cette abondance pouvant demeurer stable, augmentée ou diminuée. Aucune corrélation n'a été trouvée entre les concentrations totales en ATB et les GRA. Les GRA et le gène *intI1* ont été détectés dans tous les compartiments végétaux mais cette détection est moins fréquente au niveau des endophytes de feuilles qu'au niveau de la phyllosphère et des endophytes racinaires.

7.3 Synthèse

Les BRA et GRA contaminent tous les compartiments récepteurs (sols, eaux, sédiments) à des concentrations qui dépendent de l'exposition de ces milieux (localisée et continue par les rejets de STEU ou intermittente et diffuse par les PRO et le ruissellement), et de leurs capacités de résilience, mettant en jeu des mécanismes de dilution, de dégradation, de prédation et de compétition, pouvant aboutir à la disparition ou la persistance des BRA et GRA.

- Les rejets de STEU sont la principale source de BRA et GRA dans les eaux de surface ; et l'épandage de PRO (boues de STEU et PRO d'origine animale) est la principale source de BRA et GRA dans les sols.
- Les concentrations en BRA et GRA d'origine allochtone diminuent dans l'espace à partir des points d'émission dans le milieu récepteur (observation de gradient amont/aval dans les cours d'eau), et dans le temps à l'échelle de plusieurs années dans les archives sédimentaires.
- Les bactéries d'origine fécale survivent difficilement dans l'environnement, et les BRA d'origine fécale plus difficilement encore.
- Les GRA peuvent persister plus longtemps dans l'environnement que les BRA. En effet, les GRA peuvent d'une part persister hors des cellules bactériennes et d'autre part être hébergés par un panel d'espèces bactériennes plus large que celles ciblées dans les études (majoritairement *E. coli* porteur de BLSE).

Les données françaises sont rares ou inexistantes pour certaines sources (PRO, rejets de pisciculture) et certains compartiments étudiés (aquifères souterrains, zones côtières, sols, rhizosphère, phyllosphère, faune sauvage). Ceci peut s'expliquer par l'absence d'études sur ces environnements ou par l'obtention de résultats négatifs non publiés.

7.3.1 Sources de contamination : eaux usées traitées et produits résiduaires organiques

- Les eaux usées brutes hospitalières sont plus concentrées en GRA que les eaux usées brutes domestiques. Par exemple, les eaux usées brutes hospitalières contiennent 10 fois plus de copies d'intégron de résistance *intI1* ($\approx 10^{11}$ copies.L^{-1}) que les eaux usées brutes urbaines. Toutefois, la diversité des GRA est plus importante dans les eaux usées brutes domestiques que dans les eaux usées brutes hospitalières.
- Les procédés de traitement appliqués aux eaux usées ou aux PRO réduisent dans les mêmes proportions les concentrations de bactéries résistantes ou sensibles aux antibiotiques, mais souvent sans les supprimer totalement.
    - Les STEU réduisent les concentrations en GRA et BRA initialement présents dans les eaux usées brutes avec des abattements qui restent faibles sans traitement spécifique (abattements des *E. coli* BLSE et des entérocoques résistants à la vancomycine de l'ordre de 1,5 et de 2,5 log, respectivement).
    - Dans les PRO, la persistance des BRA et des GRA dépend de l'espèce bactérienne ou du gène considéré ainsi que du type de traitement appliqué. Le compostage permet de réduire les concentrations en BRA (de 4 à 6 log) ainsi que certains GRA

alors que le simple stockage en fosse et la méthanisation mésophile ont un impact moindre.

- Selon les espèces et les gènes, les BRA et les GRA peuvent se retrouver dans les PRO traités, et par conséquent être disséminés dans le milieu terrestre et ses différents compartiments s'ils sont épandus aux champs.

7.3.2 Milieux aquatiques

La très grande majorité des BRA d'origine fécale retrouvées dans les milieux aquatiques provient de sources anthropiques :

- La présence de BRA et de GRA dans les milieux aquatiques dépend des émissions récurrentes de bactéries fécales par les rejets de STEU, du ruissellement à partir des zones agricoles amendées par des PRO, mais aussi du débordement des réseaux unitaires de collecte des eaux usées lors de fortes pluies.
- Il a été observé une disparition préférentielle de souches d'*E. coli* ou d'*E. faecium* résistantes aux antibiotiques d'origine clinique au profit d'une sous-population sensible, qui s'explique par une plus faible aptitude à survivre dans l'eau.
- Les concentrations en BRA dans les hydrosystèmes karstiques sont corrélées positivement à la pluviométrie et à l'occupation des sols (densité humaine et activité agricole).
- La variabilité spatiale de la contamination reflète le degré d'urbanisation. Comme pour les ATB, il existe un gradient en BRA et les GRA, à partir des points d'émission avec une diminution progressive à l'aval des rejets. Toutefois, ce phénomène de résilience du milieu, n'est plus observé dans des zones soumises à des apports continus et importants en BRA et GRA (ex : proximité immédiate des rejets de STEU).
- Les conséquences attendues du changement climatique en Europe : augmentation de la fréquence des évènements pluvieux extrêmes, allongement des périodes sèches/étiages, et augmentation des températures des cours d'eau, augmentent la vulnérabilité du milieu aquatique à une contamination par les bactéries, dont les BRA.

7.3.3 Milieux terrestres

Très peu d'études décrivent l'état de la contamination des sols par des BRA ou des GRA sur le territoire national. L'essentiel des études vise à évaluer le rôle de certaines pratiques agricoles sur la dissémination des BRA et GRA.

- Les observations, en adéquation avec celles faites dans d'autres pays, décrivent une présence généralisée de ces contaminants au sein des communautés bactériennes des quelques sols agricoles et forestiers étudiés, corroborant le statut de ces sols comme réservoir environnemental de BRA et GRA.
- La présence dans des sols agricoles d'*E. coli* porteurs de $bla_{\text{CTX-M-1}}$[52] est certainement due à l'épandage de fumier de bovins ou au pâturage de bovins, ainsi qu'à la survie à long terme de cette BRA dans les sols.
- La persistance des GRA est liée à la survie de bactéries provenant de la source de contamination, mais aussi de l'enrichissement de certaines bactéries du sol *via* l'apport d'éléments nutritifs par les PRO.
- Les traitements appliqués au fumier (compostage, digestion anaérobie, déshydratation) ou aux boues de STEU (digestion anaérobie, stabilisation à la chaux,

[52] $bla_{\text{CTX-M-1}}$ code une BLSE conférant une résistance aux céphalosporines de dernières générations

traitement thermique) peuvent réduire l'abondance des GRA, limitant ainsi le risque de transmission de ces GRA aux cultures ou aux ressources en eau.

- Les GRA peuvent persister au cours du temps dans les parcelles amendées lorsque les PRO épandus sont contaminés : leurs concentrations ne retrouvent pas systématiquement les valeurs basales après l'arrêt des amendements. La persistance des GRA dépend de nombreux facteurs tels que le climat, la topologie des parcelles amendées, la nature du sol, la fréquence d'épandage, les caractéristiques des PRO épandus ainsi que la composition des communautés bactériennes des sols.

7.3.4 Faune sauvage

- Les quelques travaux mesurant l'occurrence des BRA dans la faune sauvage aquatique ou terrestre montrent tous l'influence majeure du régime alimentaire des faunes considérées.
- Une étude a montré que la fréquence de détection d'*E. coli* résistants aux céphalosporines de 3^{e} génération est plus importante chez les poissons omnivores se nourrissant des périphytons eux-mêmes contaminés par des rejets de STEU.
- Les animaux sauvages terrestres omnivores ou carnivores sont plus souvent contaminés par les BRA que les herbivores. La fréquence du portage de BRA par des oiseaux marins augmente avec la proximité de l'Homme.
- Les quelques études consacrées aux produits de la mer montrent que ces derniers sont peu contaminés par les BRA et que leur contamination est corrélée à leur proximité des zones contaminées par des bactéries d'origine fécale, par ruissellement après épandage ou par des rejets de STEU.

8 Impact potentiel des sélecteurs sur l'antibiorésistance dans l'environnement

8.1 Impact potentiel des antibiotiques

Afin d'estimer l'impact potentiel des ATB sur l'ABR dans l'environnement des approches complémentaires sont utilisées : d'une part la comparaison des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques impliquant une réponse bactérienne avec les concentrations mesurées dans l'environnement, et d'autre part l'examen des conclusions des études scientifiques *in situ* portant sur la relation entre ATB et ABR dans l'environnement.

Ces différentes approches concernent principalement les milieux aquatiques. En effet, les milieux terrestres sont plus complexes et moins documentés pourtant les concentrations en ATB dans les sols amendés peuvent atteindre plusieurs dizaines de ng.g MS^{-1}.

8.1.1 Exposition à des antibiotiques naturels

Les ATB naturellement produits par les micro-organismes (voir § 3.1) sont souvent vus comme une arme permettant aux bactéries productrices de réguler les interactions microbiennes pour coloniser une niche écologique. Il n'existe que quelques exemples qui montrent la fonction écologique des composés antimicrobiens, comme par exemple la suppression de pathogènes des plantes par des composés produits notamment par le genre *Pseudomonas* (Raaijmakers et Mazzola 2012). Le plus souvent, les effets des ATB produits naturellement sont étudiés à des doses sublétales sur les communautés microbiennes. Ainsi, à de faibles concentrations, les ATB activent des voies métaboliques régulées par le *quorum-sensing*. De manière intéressante, certains médiateurs du *quorum-sensing* ont une activité antibiotique, suggérant que ces composés ont un rôle important en écologie microbienne. Il a été montré qu'à faibles doses, plusieurs ATB provoquent des changements métaboliques profonds à caractère adaptatif (Davies, Spiegelman et Yim 2006). Par ailleurs, intrinsèquement, les micro-organismes produisant des composés antimicrobiens disposent de systèmes pour s'en protéger, *via* des mécanismes spécifiques (modification du composé ou de la cible) ou non-spécifiques (pompe à efflux). Ainsi, chez *Streptomyces coelicolor*, les gènes de résistance codant l'actinorhodine (ATB naturel) sont contigus aux gènes conférant la résistance à ce même ATB (Tahlan *et al.* 2007). Pour autant, d'autres types de résistance existent, tel que la mutation de la cible, particulièrement documenté pour des micro-organismes résistants aux fluoroquinolones qui présentent plusieurs allèles des gènes codant les cibles des fluoroquinolones conférant différents niveaux de résistance et différents phénotypes métaboliques, ce qui suggère que ces variants ont été sélectionnés dans l'environnement sous différentes pressions de sélection (Allen *et al.* 2010). Toutefois, ces connaissances sont parcellaires et il est difficile d'évaluer *in situ* les quantités d'ATB naturels produites et l'impact de l'exposition à des ATB naturels sur l'émergence, la dispersion et le maintien des BRA et des GRA.

Le niveau de production et les concentrations *in situ* des ATB d'origine naturelle restent peu décrits. À l'échelle des milieux, l'essentiel des concentrations en ATB retrouvés dans l'environnement est d'origine anthropique (voir chapitre 6). Les ATB d'origine naturelle participent à l'équilibre des populations au sein des communautés bactériennes, alors que les ATB d'origine anthropique pourraient les mettre en péril.

8.1.2 Comparaison théorique des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques impliquant une réponse bactérienne avec les concentrations mesurées dans l'environnement

8.1.2.1 Méthodes

Pour estimer l'impact des ATB sur l'ABR dans l'environnement, le GT a comparé les concentrations en ATB mesurées dans l'environnement avec celles pour lesquelles des effets biologiques ont été démontrés *in vitro* (chapitre 4). Les concentrations en ATB induisant une réponse bactérienne n'étant disponibles que pour quatre classes pharmacologiques, la comparaison n'a pu être effectuée (figure 38) que pour les fluoroquinolones (a), les sulfamides (b), les macrolides (c), et les tétracyclines (d).

Les concentrations environnementales en ATB prises en compte sont celles mesurées par les équipes de recherche. Les résultats inférieurs à une limite analytique ont été substitués selon les modalités précédemment présentées (§ 6.1.1.1.3).

Le GT a choisi de limiter la comparaison aux phases dissoutes des matrices liquides (eaux usées traitées, eaux de surface et eaux souterraines) en raison des incertitudes fortes sur les autres matrices, liées :

- Aux différences d'unité entre les concentrations en ATB dans les matrices solides (en ng.g MS^{-1}) et les concentrations en ATB induisant une réponse bactérienne (en ng.L^{-1}).
- À la surestimation des concentrations exprimées en ng.g MS^{-1} par rapport à la concentration dans la matrice totale (en masse fraîche), en particulier pour les matrices dont la part de masse humide est importante comme les périphytons ou les sédiments. À titre d'exemple, la masse sèche d'un périphyton représente en moyenne 8 % de sa masse humide (Sládeček et Sládečková 1964), ainsi les concentrations ATB rapportées dans les études sont environ 10 fois plus importantes que dans la matrice avant analyse. Or, pour la plupart des échantillons, les données disponibles ne permettent pas de convertir les concentrations exprimées en ng.g MS^{-1} en ng.g^{-1} de masse fraîche.
- À la biodisponibilité des ATB qui est encore mal connue et n'est pas prise en compte dans la détermination des concentrations environnementales. Cette problématique est moins déterminante dans les phases dissoutes que dans les autres fractions et/ou dans les matrices solides (voir § 8.4.1).

Considérant que les ATB d'une même classe peuvent induire une réponse biologique à des concentrations similaires (ex : les CMI de la ciprofloxacine, de l'ofloxacine et de la norfloxacine se superposent vis-à-vis des souches sensibles de référence d'*E. coli* ou de *S. aureus*), le GT a utilisé les concentrations individuelles des ATB considérés, ainsi que la somme des ATB d'une même classe pour estimer l'effet additif.

8.1.2.2 Incertitudes de l'exercice

Il est nécessaire de souligner que ce travail de prédiction des effets des ATB sur les bactéries dans l'environnement est exploratoire et théorique puisqu'il ne reflète pas la complexité des phénomènes survenant dans l'environnement. Les résultats sont à interpréter en tenant compte des incertitudes suivantes :

- Concernant les concentrations sub-inhibitrices en ATB pouvant induire une réponse bactérienne :
  - Les plus faibles concentrations ayant un effet biologique ont été mesurées *in vitro,* le plus souvent lors d'une seule étude confrontant un ATB à une seule espèce bactérienne, en milieu de culture liquide riche (voir § 4.1).

- Les matrices environnementales sont multi-contaminées (ATB, ETM, biocides, autres contaminants chimiques ou médicaments) et regroupent plusieurs espèces bactériennes.
- Les températures environnementales sont très variables mais en moyenne annuelle plus froides qu'en conditions expérimentales au laboratoire.
- Les bactéries y survivent et/ou se développent en communauté, en phase liquide ou en biofilm, et ne sont pas systématiquement cultivables.
- Les concentrations prédites sans effet (PNEC), utilisées dans les évaluations des risques environnementaux de la contamination par les ATB, ne font pas toutes l'objet d'un consensus[53].

- Concernant les concentrations environnementales en ATB :
  - Les études publiées présentent majoritairement des concentrations en ATB dans des zones directement influencées par des sources de contamination. Les concentrations sont vraisemblablement plus faibles en moyenne à l'échelle nationale, en dehors des zones influencées par la contamination.
  - Les sommes d'ATB par classes pharmacologiques ont été calculées à partir des données disponibles. Le nombre d'ATB considérés est très variable en fonction des échantillons (ex : nombre de fluoroquinolones prises en compte dans les sommes pour les eaux de surface compris entre un et neuf).

8.1.2.3 Résultats sur la phase dissoute des matrices liquides

8.1.2.3.1 Fluoroquinolones

Les concentrations en fluoroquinolones mesurées en France dans la phase dissoute de certaines eaux usées traitées et des eaux de surface les plus contaminées sont du même ordre de grandeur que celles favorisant la croissance préférentielle des mutants résistants préexistants (figure 38a). De plus, les concentrations dans les eaux usées traitées les plus contaminées pourraient favoriser le THG, sélectionner des mutants et favoriser la mutagénèse. En France, les conditions pourraient donc être favorables à la résistance dans les eaux usées traitées et dans les eaux de surface les plus contaminées par les fluoroquinolones. À partir de données internationales, Chow, Ghaly et Gillings (2021) aboutissent à des conclusions comparables.

8.1.2.3.2 Sulfamides

Les concentrations en sulfamides mesurées en France dans les phases dissoutes des matrices liquides sont inférieures à celles décrite comme pouvant favoriser la résistance (figure 38b).

[53] Les valeurs de PNEC sont destinées à éviter la promotion de la résistance dans l'environnement en établissant des objectifs de rejet d'industrie pharmaceutique. Brièvement, la PNEC est égale à la CMI la plus basse rapportée pour l'ensemble des espèces pathogènes, divisée par un facteur de risque qui peut varier selon les auteurs pour une même molécule. Ainsi, la coalition privée *AMR Industry Alliance* utilise, à partir des travaux de Bengtsson-Palme et Larsson (2016), un facteur 10 pour calculer la PNEC-CMI de tous les ATB, alors que l'Agence européenne des médicaments (EMA) recommande des facteurs de risque ajustés (EMEA 2006 ; EMA 2018). Cela conduit parfois à des variations importantes : par exemple, la PNEC de la ciprofloxacine est estimée à 0,06 µg.L^{-1} par l'*AMR Industry Alliance* et à 0,0093 µg.L^{-1} par l'EMA. L'AMR Industry Alliance est une coalition du secteur privé rassemblant plus de 100 sociétés industrielles pharmaceutiques, de biotechnologie, et de diagnostic.

8.1.2.3.3 Macrolides

Les concentrations en macrolides mesurées en France dans les eaux usées traitées sont de l'ordre de la PNEC (figure 38c). Elles peuvent donc favoriser la dissémination de la résistance. Dans les eaux de surface, la concentration maximale en clarithromycine est proche de sa PNEC (Huschek *et al.* 2004) et les sommes maximales des concentrations en macrolides atteignent les PNEC (figure 38c). En France, les conditions pourraient donc être favorables à la résistance dans les eaux de surface les plus contaminées par les macrolides.

8.1.2.3.4 Tétracyclines

Les concentrations en tétracyclines mesurées en France dans les phases dissoutes des matrices liquides sont inférieures à celles décrites comme pouvant favoriser la résistance (figure 38d).

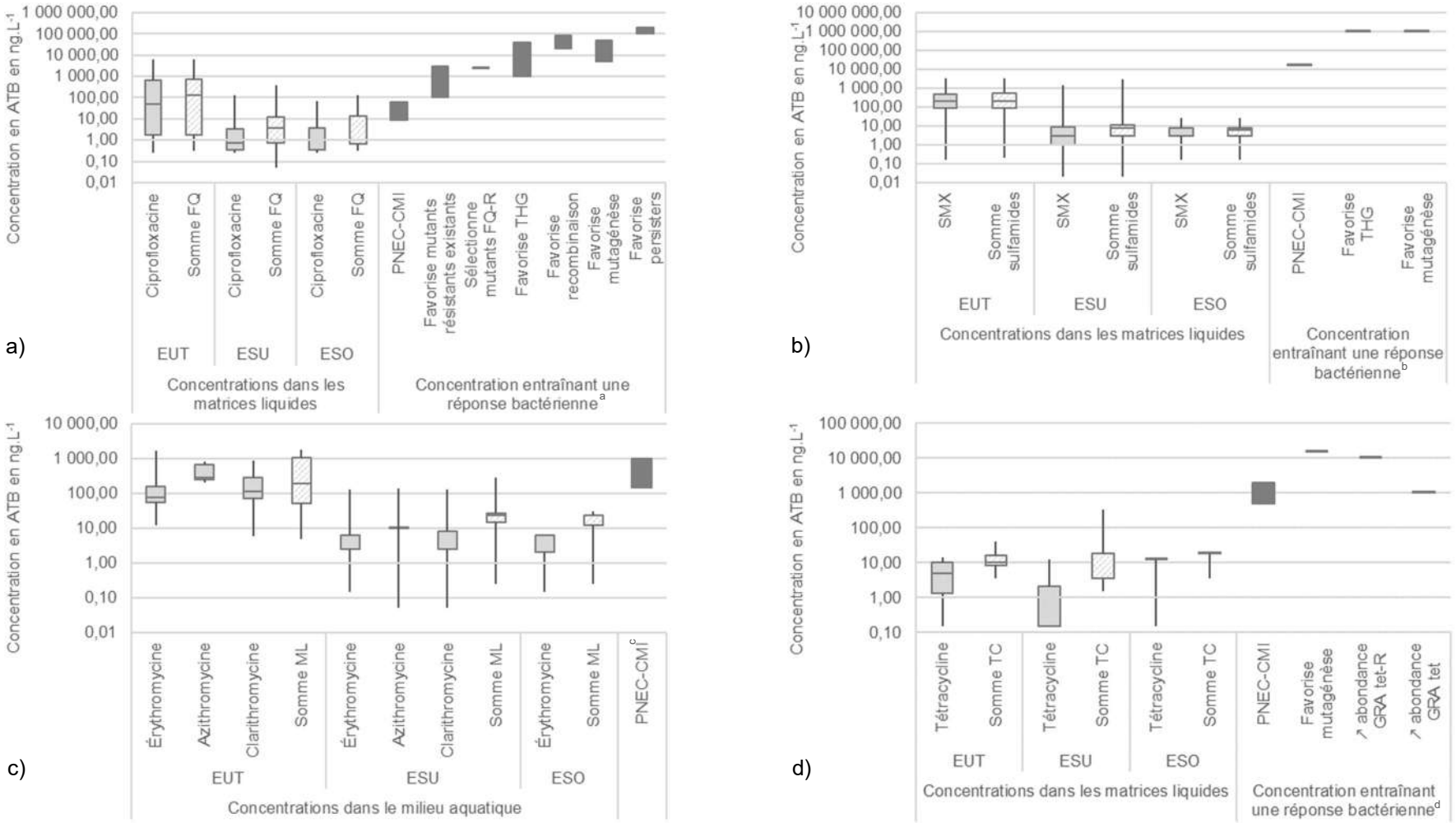


Figure 38. Concentrations en ATB dans la phase dissoute de différentes matrices environnementales liquides (en gris clair) et entraînant une réponse bactérienne (en gris foncé) pour les fluoroquinolones (a), les sulfamides (b), les macrolides (c) et les tétracyclines (d).

FQ=fluoroquinolones ; SMX=sulfaméthoxazole ; ML=macrolides ; TC=tétracyclines ; EUT=eaux usées traitées de STEU ; ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine. [a] (Beaber, Hochhut et Waldor 2003 ; Huschek *et al.* 2004 ; Lopez *et al.* 2007 ; Dörr, Lewis et Vulić 2009 ; Guerin *et al.* 2009 ; Baharoglu et Mazel 2011 ; Gullberg *et al.* 2011 ; Bengtsson-Palme et Larsson 2016) ; [b] (Thi *et al.* 2011 ; Bengtsson-Palme et Larsson 2016 ; Jutkina *et al.* 2018) ; [c] (Huschek *et al.* 2004 ; Bengtsson-Palme et Larsson 2016) ; [d] (Baharoglu et Mazel 2011 ; Bengtsson-Palme et Larsson 2016 ; Lundström *et al.* 2016).

8.1.3 Antibiotiques, résistance et environnement : études réalisées *in situ*

Les campagnes d'évaluation de la contamination environnementale par les micropolluants dans les eaux et les sols ont montré la présence d'ATB, notamment liée aux rejets urbains, associés à un mélange d'autres molécules émanant des activités humaines.

De nombreuses études se sont penchées sur de possibles corrélations entre la présence de cette contamination anthropique dans l'environnement et la présence de BRA ou de GRA dans ces mêmes milieux récepteurs. Certains auteurs ont proposé des corrélations positives entre les concentrations d'ATB et l'abondance de GRA dans certains environnements (rivières urbaines, effluents porcins) tandis que d'autres ont relevé des phénotypes de résistance sans pression de sélection évidente ou spécifique dans d'autres milieux (Li *et al.* 2020). Le projet FLASH visait à caractériser la relation entre la prescription d'ATB (usages vétérinaire et humain), l'abondance de BRA et la présence de molécules ATB dans l'eau, à l'échelle d'un continuum hydrologique rural et d'un continuum hospitalier (Petit *et al.* 2012). Les résultats montrent que la présence de souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* antibiorésistantes dans l'eau résulte de la pression de sélection exercée lors des traitements médicamenteux chez l'Homme et des pratiques d'élevage. Toutefois, il n'existe pas de relation simple entre les phénotypes de résistance des souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* isolées dans les eaux, la contamination en ATB du milieu et les prescriptions.

Les travaux réalisés par Aubertheau (Aubertheau-Laurent 2013 ; Aubertheau *et al.* 2017) sur différents sites du bassin versant de la Vienne (amont et aval de STEU) n'ont pas non plus révélé de corrélation entre les concentrations en ATB dans les périphytons de rivière et les concentrations en intégrons (*intI*). De même, les travaux menés par Oberlé (2012) ne montrent aucune corrélation entre le phénotype de résistance des *E. coli* isolés de l'eau et les concentrations en ATB mesurées dans le milieu, suggérant que la résistance a été acquise dans le tractus digestif de l'Homme sous antibiothérapie.

Ainsi, il est maintenant admis que la présence d'ATB, l'ABR et la persistance des GRA ne sont pas toujours liées. Leur relation s'avère certainement plus complexe du fait de la présence dans l'environnement de co-sélecteurs, de la complexité des mécanismes d'ABR et du résistome, d'interactions entre des combinaisons d'ATB (Brochado *et al.* 2018) et de la dynamique spatio-temporelle environnementale (Li *et al.* 2020).

L'analyse de près de 500 métagénomes a été menée dans des environnements contaminés ou non par des fèces. L'origine de la contamination a été évaluée par la méthode du crAssphage, un phage spécifique des fèces d'origine humaine (Ahmed *et al.* 2018). Il a ainsi été montré que l'abondance des GRA (dont *intI1* et des gènes d'éléments mobiles) était corrélée à la contamination fécale humaine (Karkman, Pärnänen et Larsson 2019). Ces résultats suggèrent que l'abondance des GRA dans l'environnement résulte davantage d'une contamination fécale du milieu que d'une sélection ou d'une dissémination de GRA. Seuls des sédiments contaminés par des rejets d'industries pharmaceutiques font exception. Dans ces environnements caractéristiques, très riches en GRA et très contaminés par des ATB, les GRA sont sélectionnés par les ATB et la contamination par des fèces d'origine humaine devient secondaire (Milaković *et al.* 2019).

Toutefois, cette description de l'environnement récepteur comme une décharge passive dans laquelle la résistance aux ATB disparait est remise en question par Chamosa *et al.* (2017). Ces auteurs décrivent l'acquisition de cassettes de résistance par des intégrons portés par des espèces environnementales, en l'absence de pression de sélection ATB et sans coût métabolique. Les résultats de l'étude récente de Lee *et al.* (2020) nuancent également cette vision de l'impact des activités anthropiques sur le résistome des rivières. Ainsi, les auteurs ont analysé le microbiome, le résistome et le mobilome des communautés microbiennes planctoniques le long d'un fleuve coréen couvrant un gradient d'activités humaines. Ils confirment que la contamination fécale permet la transmission des GRA au résistome environnemental. Ces GRA mobiles (plutôt que les bactéries fécales résistantes) prolifèrent dans les espèces environnementales proches des protéobactéries, cliniquement importantes.

Il n'en demeure pas moins vrai que, si la dynamique de l'acquisition de résistance et les facteurs qui y sont liés restent encore à clarifier, il est maintenant admis que l'environnement est une source

majeure de GRA. Si l'approche « One-Health » doit contribuer à associer les différents contributeurs Homme/animal/environnement à la connaissance de la dynamique de la résistance, il est encore nécessaire d'approfondir les modes d'évaluation quantitative des risques fondée sur la dimension écologique de la résistance et les processus qui y sont liés (Zhang *et al.* 2020).

8.2 Impact potentiel des éléments traces métalliques (ETM)

Les éléments traces métalliques ont des origine à la fois naturelles et anthropiques. Leur présence est considérée comme un facteur contribuant au maintien de BRA dans l'environnement (Baker-Austin *et al.* 2006 ; Seiler et Berendonk 2012 ; Wales et Davies 2015), l'hypothèse étant que le métal exercerait une pression de sélection favorable à la dissémination de l'ABR (voir § 3.5.1 et 4.1.2).

Cette hypothèse repose sur des études de génétique menées principalement *in vitro*. Elles ont montré que ces résistances associées s'expliquaient soit par la présence de gènes de résistance aux ETM et aux ATB sur un même support génétique (co-résistance), soit par l'existence de mécanismes communs de résistance (résistance croisée). Ces mécanismes peuvent être des modifications de perméabilité membranaire (ex : pompes à efflux), de co-régulation ou de co-expression comme l'activation de la réponse au stress par la polymixine B (*via* le facteur sigma RpoE) qui activent à la fois la résistance au zinc et à ce même ATB chez *E. coli* (Pal *et al.* 2017 ; Poole 2017).

8.2.1 Contamination de l'environnement

Le cuivre et le zinc font l'objet d'une surveillance dans le cadre de la DCE dans les eaux superficielles et souterraines. Dans les eaux de surface, les fréquences de quantification dépassent 70 % pour ces deux éléments (72,5 % pour le cuivre et 73,4 % pour le zinc), avec des concentrations moyennes de 1,6 $\mu g.L^{-1}$ pour le cuivre et de 8,3 $\mu g.L^{-1}$ pour le zinc. Les concentrations peuvent être ponctuellement très élevées, avec une concentration maximale de 18 600 $\mu g.L^{-1}$ pour le cuivre et 12 200 $\mu g.L^{-1}$ pour le zinc, montrant l'hétérogénéité des pressions selon les stations de mesures. La même variabilité existe pour les eaux souterraines. En se focalisant sur les stations de surveillances des Agences de l'eau, les concentrations moyennes sont de 3 $\mu g.L^{-1}$ pour le cuivre (N=32 231) et de 17,7 $\mu g.L^{-1}$ pour le zinc (N=32 243), avec des concentrations maximales de 3 830 $\mu g.L^{-1}$ (Cu) et 5 515 $\mu g.L^{-1}$ (Zn). En incluant le suivi des sites industriels, les concentrations augmentent fortement avec des concentrations moyennes de 19,5 $\mu g.L^{-1}$ pour le cuivre et de 452 $\mu g.L^{-1}$ pour le zinc.

De nombreuses données, résultant notamment du programme national RMQS, permettent d'avoir une cartographie de la concentration en ETM dans l'horizon superficiel des sols agricoles et forestiers français (Saby *et al.* 2011). Pour ce qui est du cuivre, les concentrations totales s'étendent de 1 à 508 $mg.kg^{-1}$ en métropole et de 27 à 156 $mg.kg^{-1}$ dans les Antilles. Les travaux de Hissinger (2017) indiquent des concentrations totales dans les sols de vignobles français peuvent atteindre jusqu'à 1 030 $mg.kg^{-1}$ et celle du Cu-EDTA (mesure chimique estimant le cuivre biodisponible) de 488 $mg.kg^{-1}$ en raison d'apports répétés pendant plusieurs décennies de bouillie bordelaise. À titre comparatif, les concentrations de cuivre dans les sols viticoles européens varient de 155 à 689 $mg.kg^{-1}$ (Ruyters *et al.* 2013). Concernant les concentrations en zinc dans les sols métropolitains, elles s'étendent entre 5 et 1 230 $mg.kg^{-1}$. Les fortes concentrations résultent d'activités humaines (mines, industries, épandages agricoles, trafic routier, toitures, etc.) avec près de 80 % des apports de zinc attribués aux déjections animales, du fait des compléments alimentaires utilisés dans les élevages bovins, porcins ou de volailles (SOeS 2015). Ces concentrations totales de métaux dans le sol peuvent ainsi dépasser les concentrations maximales de métaux actuellement autorisées dans le sol (jusqu'à 450 $mg.kg^{-1}$ pour le zinc et jusqu'à 200 $mg.kg^{-1}$ pour le cuivre) dans

le contexte de l'épandage de boues, fixées dans la directive 86/278/CEE relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture[54].

8.2.2 Co-sélection de résistance aux antibiotiques par les éléments traces métalliques dans l'environnement

De nombreuses études montrent une corrélation positive entre la présence d'ETM et la présence de populations co-résistantes aux ETM et aux ATB dans l'environnement (eau, sédiments, rejets de STEU, sols agricoles). Ces travaux reposent soit sur des approches phénotypique et génotypique de bactéries d'origine fécale (ou autochtones du milieu) (Henriques *et al.* 2016 ; Dickinson *et al.* 2019), soit sur des analyses génomiques à partir d'ADN totaux (Ji *et al.* 2012 ; Devarajan *et al.* 2015).

Au-delà de cette co-occurrence, les conclusions sur le rôle réel de la contamination métallique d'un environnement sur la dissémination de l'ABR sont délicates à tirer. Ainsi, Henriques *et al.* (2016) dans une étude sur les populations bactériennes épiphytes de plantes, observent une abondance plus élevée de bactéries co-résistantes aux ETM et aux ATB sur des sols contaminés par les ETM sans toutefois démontrer l'influence directe de cette contamination sur la prévalence du GRA au sein d'une même espèce bactérienne.

Certains ETM, comme le zinc et le cuivre, peuvent se complexer aux ATB pour renforcer leurs activités antimicrobiennes et favoriser l'émergence de souches co-résistantes (Poole 2017). Ce phénomène, essentiellement décrit chez des espèces bactériennes isolées de l'Homme, serait aussi possible dans l'environnement. Cependant, les études ayant mesuré l'effet cocktail des ATB et des ETM *in vitro* sont rares et ne montrent pas systématiquement un effet synergique. Ainsi, chez *E. coli*, la CMS de la tétracycline est abaissée de 20 % en présence de 50 µM d'arsénite (Gullberg *et al.* 2014) alors que celle de la ciprofloxacine est cinq fois plus élevée en présence de 1 mM de zinc (Vos *et al.* 2020).

Berg *et al.* (2010) ont montré qu'un sol contaminé par du cuivre hébergeait non seulement des communautés bactériennes plus résistantes au cuivre, mais également plus résistantes à la vancomycine et à la tétracycline, et aussi des isolats bactériens plus résistants au chloramphénicol et à l'acide nalidixique que les sols témoins. Zhao *et al.* (2019) ont testé une série de sols collectés aux alentours de Belfast (Irlande du Nord) et contaminés par le zinc (32 à 5550 $mg.kg^{-1}$) et le cuivre (19 à 954 $mg.kg^{-1}$) pour montrer que la concentration en zinc était corrélée positivement avec l'abondance de GRA et d'EGM, suggérant la co-sélection de résistances aux ATB par l'exposition à des ETM.

L'apport de la métagénomique a permis d'appréhender de façon plus globale cette problématique. Ainsi, une analyse 5 436 génomes issus de 39 phyla provenant de différents habitats (Homme, eau, sol) a démontré une co-occurrence importante de GRA et de gènes de résistance aux ETM dans les génomes de bactéries isolées de l'Homme (notamment les entérobactéries) et une co-occurrence modérée dans les génomes bactériens issus de l'eau ou des sols (Li, Xia et Zhang 2017). Les génomes des espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme contiennent plus de fragments d'ADN portant des gènes de résistances aux ATB et aux métaux, ayant pu être acquis par transfert horizontal de gènes. Les auteurs concluent que les co-transferts de gènes de résistances aux ATB et métaux sont plus importants chez l'Homme, notamment entre bactéries pathogènes et microbiote humain, et témoignent d'une histoire évolutive au sein de cet habitat où les bactéries sont exposées à la fois aux ATB et aux métaux.

Les données actuellement disponibles dans la bibliographie ne permettent pas d'évaluer l'impact potentiel de la présence d'ETM sur la dissémination de l'ABR dans l'environnement. Ainsi, dans la conclusion de sa revue, Pal *et al.* (2017), proposent de poursuivre les études pour évaluer la relation

[54] Directive n° 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

entre le niveau d'exposition aux ETM, notamment leur forme biodisponible, et la sélection ou le maintien de BRA dans différents environnements.

8.3 Impact potentiel des biocides

Un nombre croissant de travaux rapporte le potentiel des biocides à sélectionner *in vitro* chez les bactéries des co-résistances ou des résistances croisées à certains ATB. Des essais *in vitro* ont ainsi démontré qu'une exposition à différentes molécules biocides telles que les ammoniums quaternaires (QAC) pouvait réduire la sensibilité de différentes espèces bactériennes à des ATB tels que la tétracycline, l'ampicilline, le céfotaxime, la ceftazidime, la streptomycine, le chloramphénicol, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine ou le triméthoprime (Langsrud, Sundheim et Holck 2004 ; Soumet *et al.* 2012 ; Soumet *et al.* 2016 ; Sousa-Silva *et al.* 2018). De nombreux articles rapportent également le potentiel du triclosan à réduire la sensibilité bactérienne à différents ATB tels que la tétracycline, le chloramphénicol, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, l'érythromycine, le triméthoprime, la gentamicine, l'ampicilline ou l'amoxicilline (Chuanchuen *et al.* 2001 ; Braoudaki et Hilton 2004 ; Tkachenko *et al.* 2007 ; Copitch, Whitehead et Webber 2010 ; Christensen, Gram et Kastbjerg 2011 ; Webber *et al.* 2015 ; Wesgate, Grasha et Maillard 2016).

8.3.1 Contamination de l'environnement

Contrairement aux ATB utilisés uniquement en médecine vétérinaire et humaine, les biocides sont utilisés massivement dans de très nombreux secteurs, dont l'hôpital. Dans ce dernier, des concentrations importantes de biocides sont parfois détectées et peuvent représenter des zones à risque de sélection de BRA.

Les biocides se retrouvent dans l'environnement *via* les eaux usées traitées, les rejets industriels, les stations de traitement des déchets et les litières. Leur présence va dépendre de la quantité de biocides utilisée et de leur stabilité. Ainsi, les QAC sont faiblement biodégradables, même si des variations importantes peuvent être observées selon la molécule considérée. Les QAC étant les biocides les plus produits et utilisés, de nombreuses données sur les concentrations détectées dans l'environnement existent. Ainsi, Mulder *et al.* (2018) synthétisent des données sur les concentrations des composés d'ammoniums à chaînes linéaires d'alkylammoniums (QAAC), faisant partie de la famille des QAC, selon le site de prélèvement et la technique analytique employée. À partir des données dans les milieux aquatiques, les valeurs des quantités cumulées de QAAC (comprenant des dialkyl et trialkyl ammoniums quaternaires ainsi que le chlorure de benzalkonium) présentes dans les eaux de surface (principalement eaux de rivière) et dans les rejets industriels peuvent atteindre 19 $\mu g.L^{-1}$ et 4 920 $\mu g.L^{-1}$, respectivement (tableau XXIII). En sortie de STEU, les eaux usées traitées contiennent jusqu'à 24 $\mu g.L^{-1}$ et les boues d'épuration jusqu'à 1 850 ng.g MS^{-1}. Selon les études et les échantillons analysés, des variabilités de concentrations sont observées dans chacun des compartiments (tableau XXIII). Les niveaux de concentrations en QAAC sont également très variables dans les sédiments marins et de rivières. Les concentrations élevées s'expliquent par l'adsorption forte de ces molécules cationiques aux charges négatives portées par la surface des boues mais aussi des sédiments et des sols. Les sols peuvent recevoir des QAAC suite à l'épandage de PRO contaminés mais également *via* des pesticides dans lesquels les QAAC peuvent être présents comme adjuvants. Des concentrations allant jusqu'à quelques µg.g MS^{-1} ont été rapportées. Il est à noter que les données relatives aux devenir et transport de biocides dans les sols sont rares pour les QAAC.

Le triclosan a été utilisé pendant de nombreuses années pour ses propriétés biocides et dans de nombreux produits de consommation (dentifrice, conservateur cosmétique, spray, jouets, *etc.*). Du fait de cet usage important, le triclosan est souvent retrouvé dans l'environnement (tableau XXIII).

Toutefois, le triclosan n'a pas été approuvé en tant que substance biocide[55] et son usage dans les cosmétiques est actuellement règlementé[56].

Chen *et al.* (2011) ont montré que des concentrations de triclosan de l'ordre du ng.g MS^{-1} peuvent occasionnellement être quantifiées dans des sols irrigués avec des eaux usées traitées. À l'inverse, d'autres molécules biocides moins stables, comme les composés peroxydes, se dégradent très rapidement et ne persistent pas dans l'environnement.

Tableau XXIII. Concentrations dans différents compartiments de l'environnement du triclosan et des composés d'ammoniums quaternaires (QAC).

Matrice environnementale	Concentrations	
	QAC[a]	Triclosan[b]
Eaux de surface	1 - 19 µg.L^{-1}	1,4 - 40 000 ng.L^{-1}
Eaux usées de STEU		
Brutes	330 - 4 920 µg.L^{-1}	20 - 86 161 ng.L^{-1}
Traitées	0,6 - 24 µg.L^{-1}	23 - 5 370 ng.L^{-1}
Sédiments de		
Rivière, lacs	5 - 3 100 ng.g MS^{-1}	<100 - 53 000 ng.g MS^{-1}
Mer	0 - 46 ng.g MS^{-1}	0,02 - 35 ng.g MS^{-1}
Boues d'épuration	250 - 1850 ng.g MS^{-1}	580 - 15 600 ng.g MS^{-1}
Sols[c]	0 - 1500 ng.g MS^{-1}	0 - 1,8 ng.g MS^{-1}

[a] Données issues de la revue de Mulder *et al.* (2018) ; [b] du rapport SCENHIR (SCENHIR 2O1O) ; [c] Chen *et al.* (2011).

8.3.2 Co-sélection de résistance aux antibiotiques par les biocides dans l'environnement

Le rôle des biocides sur l'ABR dans l'environnement est difficile à démontrer directement étant donné sa complexité (milieu ouvert et multi-contaminé). L'analyse de la littérature révèle différents éléments supportant un lien potentiel entre les biocides et la résistance aux ATB dans l'environnement. Cependant, ces données résultent d'études *in vitro* en micro/mésocosmes en se plaçant dans des conditions standardisées et optimisant la mise en évidence des phénomènes recherchés (*i.e.* apport de bactéries donneuses et/ou receveuses pour rendre compte d'un transfert de gènes ; concentrations élevées pour favoriser la sélection et l'enrichissement de bactéries co-résistantes ; stimulation de la croissance bactérienne en milieu de culture riche).

Ainsi, une analyse de communautés microbiennes isolées de sédiments d'une rivière exposée pendant plusieurs années à différents niveaux d'un QAC (chlorure de benzalkonium : BAC), a révélé un enrichissement de la communauté microbienne en *Pseudomonas* capables de dégrader le BAC (Oh *et al.* 2013). Cette réorganisation de la communauté en réponse aux biocides était également accompagnée d'un enrichissement en gènes liés à différents processus cellulaires (pompes d'efflux, modification de l'enveloppe cellulaire, système de défense au stress oxydatif) et d'une plus grande résistance à la pénicilline G, à la tétracycline et à la ciprofloxacine (Tandukar *et al.* 2013). À l'inverse,

55 Décision d'exécution (UE) n° 2016/110 DE LA COMMISSION du 27 janvier 2016 n'approuvant pas le triclosan en tant que substance active existante destinée à être utilisée dans les produits biocides du type de produits 1

Décision d'exécution de la Commission du 24 avril 2014 concernant la non-approbation de certaines substances actives biocides en vertu du règlement (UE) no 528/2012 du Parlement européen et du Conseil (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

56 Règlement (UE) n° 358/2014 de la Commission du 9 avril 2014 modifiant les annexes II et V du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques

dans une étude récente d'une communauté microbienne issue d'eaux usées exposée au BAC, l'analyse métagénomique a montré que l'exposition au biocide réduisait l'abondance des GRA, dont les gènes d'efflux *qac* (Murray *et al.* 2019). Cependant, les durées d'exposition aux biocides étaient de seulement 6 jours en comparaison à plusieurs années pour les études citées plus haut. Différentes études ont également mis en évidence des corrélations entre la présence de certains GRA et les concentrations en triclosan dans des eaux usées (Carey et McNamara 2014).

Une analyse de 48 échantillons d'eau prélevés dans trois bassins versants a également montré la présence ubiquitaire du gène *qacEΔ1* dans l'ensemble des prélèvements et une corrélation de l'abondance de ce gène avec celle de sept GRA (Han *et al.* 2019). Une étude des bactéries cultivables isolées d'environnements contaminés par des QAC a mis en évidence des incidences plus élevées de la résistance aux QAC et des intégrons de classe 1 (Gaze *et al.* 2005).

Dans l'environnement aquatique, la co-sélection de bactéries résistantes aux ATB et aux biocides est peu renseignée. Une étude qui repose sur la caractérisation des phénotypes de résistances aux ATB et aux biocides des coliformes fécaux a été menée aux USA, dans l'eau de surface prélevée en amont et à proximité de rejet de STEU (Middleton et Salierno 2013). Les auteurs concluent qu'il existe une corrélation significative entre la résistance au triclosan et la multirésistance aux ATB chez des coliformes isolés, et que l'abondance de ces souches est corrélée à la distance du rejet de STEU. Ces souches résistantes au triclosan, appartiennent au genre *Citrobacter* et sont plus résistantes au chloramphénicol et à la nitrofurantoïne que les souches sensibles à ce biocide.

8.4 Déterminants de l'exposition bactérienne dans l'environnement

Les discordances observées entre les concentrations en ATB, ETM et biocides et la présence de BRA et/ou GRA montrent que l'exposition effective des bactéries aux sélecteurs est un élément primordial dans la sélection de la résistance.

8.4.1 Biodisponibilité et bioaccessibilité des antibiotiques

Généralement, seule une fraction d'un composé présent dans l'eau ou le sol parvient au contact proche des micro-organismes, puis au niveau de la cible (figure 39). En effet, la forme chimique (libre, associée ou complexée) d'un ATB a une importance fondamentale dans sa capacité à diffuser de l'extérieur vers l'intérieur d'une bactérie.

De plus, la pénétration des ATB et/ou de leurs complexes (avec des ligands) dans les cellules bactériennes est connue pour être différente pour les bactéries à Gram positif et à Gram négatif en raison de disparités dans la structure de leur paroi (Guzman, Dille et Godet 2012 ; Parija 2014). Ainsi, la membrane externe de bactéries à Gram négatif, chargée négativement, attire les complexes tétracycline-cations métalliques, ce qui entraîne leur accumulation dans le périplasme (Schnappinger et Hillen 1996). Dans la phase aqueuse de l'espace périplasmique, ces complexes se dissocient probablement pour libérer la forme libre de la tétracycline, qui diffuse à travers la membrane périplasmique interne des bactéries. Au contraire, on suppose que les formes libres et complexées de tétracycline traversent la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif en fonction de la force motrice médiée par la différence de pH (Nikaido et Thanassi 1993 ; Schnappinger et Hillen 1996). Certains travaux montrent que chez les bactéries à Gram positif, les complexes tétracycline-métal traversent la membrane bactérienne et ressortent de la cellule de la même manière. Ce mécanisme réduit les probabilités de développement d'une résistance chez les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif (Pulicharla *et al.* 2017). Cependant, l'interaction entre les bactéries et les complexes métalliques reste fortement liée à la constante de dissociation de chaque métal (Pulicharla *et al.* 2015a ; Pulicharla *et al.* 2015b).

8.4.1.1 *Via* les biofilms

Les ATB présents à l'extérieur du biofilm peuvent avoir une efficacité limitée par l'existence d'interactions électrostatiques entre l'ATB et la structure du biofilm. Ces interactions peuvent affecter la pénétration de l'ATB dans la matrice de substances extracellulaires. Ainsi, des interactions de ce type ont été mises en évidence entre les aminosides et les alginates polyanioniques composant les

exopolymères bactériens de biofilms modèles de *P. aeruginosa* (Nichols *et al.* 1989). Oubekka (2012) suggère aussi que les propriétés viscoélastiques des substances extracellulaires peuvent freiner la pénétration des ATB. Cette propriété est évoquée pour expliquer la résistance à la vancomycine de biofilms hypermucoïdes obtenus à partir de variants de *S. aureus* (Jefferson, Goldmann et Pier 2005). Néanmoins des études menées également en laboratoire ont montré que la structure des biofilms n'est pas un bouclier impénétrable à la diffusion des ATB et à leur interaction avec les cellules bactériennes. En revanche, même les ATB diffusant dans le biofilm peuvent s'avérer incapables, même à des concentrations thérapeutiques, d'éliminer les bactéries. Boudjemaa *et al.* (2016) suggèrent que la résistance ou tolérance du biofilm pourrait être liée à un changement physiologique impliquant des modifications structurelles de la membrane.

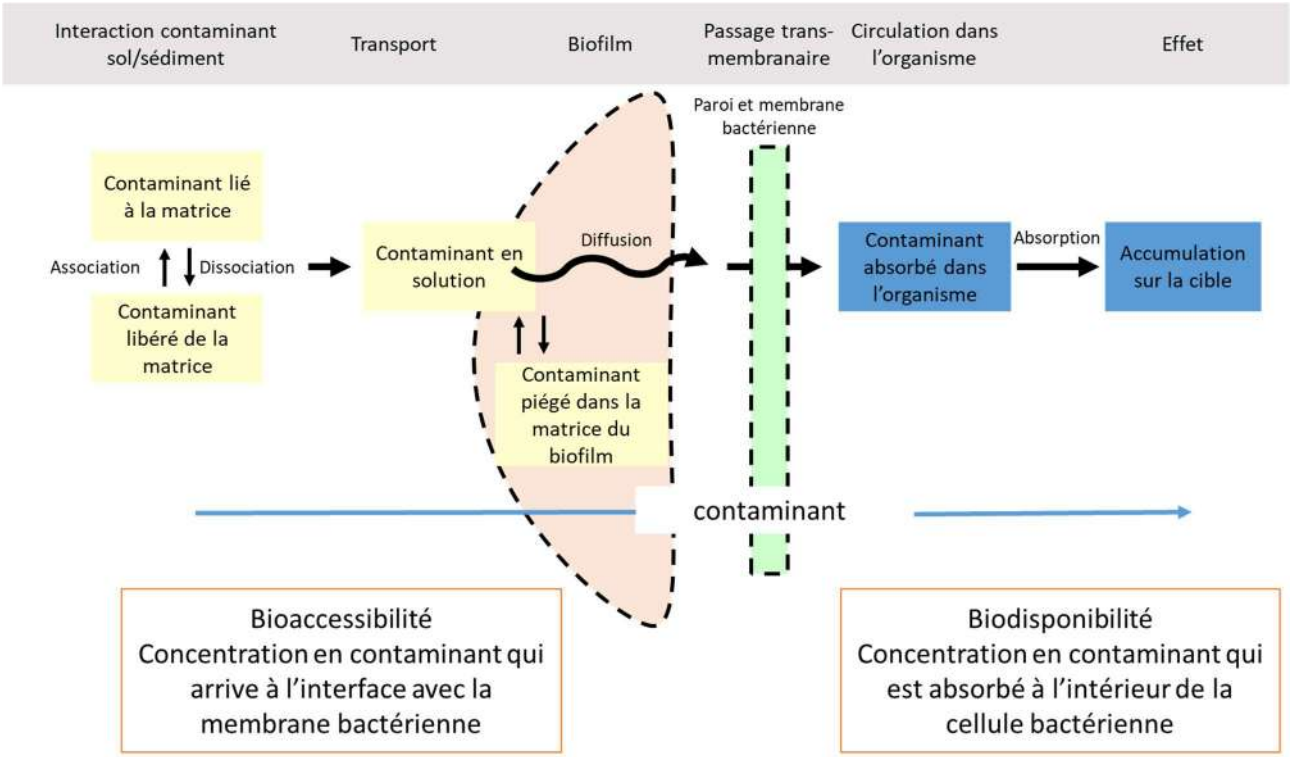


Figure 39. Concept de bioaccessibilité et de biodisponibilité des antibiotiques pour les bactéries dans les biofilms.

8.4.1.2 *Via* l'eau

Dans les milieux aquatiques, la biodisponibilité des ATB ionisables dépend directement de leur spéciation. En effet, un composé ATB peut se retrouver sous différentes formes chimiques en fonction de ses propriétés intrinsèques (pKa) et des conditions physico-chimiques du milieu (pH, salinité). Ainsi, la forme neutre de la tétracycline (zwitterion) est l'espèce qui pénètre le plus facilement dans les cellules d'*E. coli* (Zhang *et al.* 2014). Cependant, la présence de cations inorganiques divalents dans l'eau (notamment Mg^{2+} et Ca^{2+}, largement abondants dans les eaux naturelles) réduit la biodisponibilité de la tétracycline pour *E. coli* en formant des complexes stables tétracycline-métal (Werner, Arnold et McNeill 2006 ; Zhang *et al.* 2018). De plus, Chen *et al.* (2015) ont montré que la spéciation de la tétracycline est fortement influencée par son association avec les matières organiques dissoutes. De nombreux complexes peuvent ainsi se former entre les espèces cationiques ou zwitterioniques de la tétracycline et les sites déprotonés des matières organiques (principalement des groupes fonctionnels carboxyliques) (Gu *et al.* 2007). Certains complexes organiques tendent à augmenter de manière significative l'absorption de la tétracycline par *E. coli* et ainsi l'induction de la résistance. Cette tendance est corrélée au degré de complexation des cations métalliques par les ligands acides organiques dans l'ordre suivant : acide citrique > acide oxalique > acide malonique> acide succinique> acide acétique.

8.4.1.3 *Via* les sédiments

En l'état actuel des connaissances, la présence d'ATB a été démontrée dans les sédiments, les ATB les plus persistants ayant même été trouvés dans des archives sédimentaires. Cependant, la biodisponibilité et la bioaccessibilité des ATB n'ont pas été étudiées dans les sédiments.

8.4.1.4 *Via* les boues et les sols amendés

Les ATB qui résistent aux traitements dans les STEU et s'adsorbent sur la matière organique peuvent se concentrer dans les boues produites par les STEU. Les fluoroquinolones, mais également les biocides (ex : triclosan et triclocarban) sont retrouvés à des concentrations de l'ordre du ng.g MS^{-1} dans les boues de STEU. Les sulfamides, tétracyclines et macrolides sont moins concentrés dans ces boues (de l'ordre du ng.g MS^{-1}) (Sabourin *et al*. 2012). Cependant, les fluoroquinolones sont fortement adsorbées aux composantes du sol et ne sont probablement pas biodisponibles pour exercer une pression de sélection ATB sur les bactéries (Goulas *et al.* 2018b). À l'inverse, d'autres classes ATB comme les macrolides, sont moins fortement adsorbées et donc plus biodisponibles.

Comparé aux eaux de surface ou souterraines, le sol est une matrice extrêmement complexe dont les propriétés physico-chimiques (pH, teneur et nature de matières organiques, capacité d'échanges de cations) sont très variables. Ceci limite la possibilité de prédiction de la concentration d'ATB biodisponible conditionnant l'exposition des organismes vivants dans les sols (Menz *et al*. 2018 ; Sidhu *et al*. 2019). Pour les mêmes raisons, il est très difficile d'extrapoler à l'environnement terrestre des PNEC, déterminées *in vitro* en milieu liquide.

Par ailleurs, la phase solide du sol comporte des éléments particulaires minérales et organiques organisés en agrégats de tailles variées dans des proportions qui dépendent largement du pédoclimat, des types de sols et de leur usage. Ces éléments sont séparés par des vides (i.e. pores) d'origine abiotique (fente de rétractation) ou biotique (galerie de vers de terre) dans lesquels circulent l'eau et les solutés. Cette structuration conduit à une distribution hétérogène de la matière organique, des contaminants, des micro-organismes dont les bactéries, celles-ci pouvant coloniser les agrégats et les pores les plus petits ; cette hétérogénéité spatiale conduit à une exposition variable des cellules microbiennes aux contaminants (Nunan *et al.* 2001 ; Ranjard et Richaume 2001). La majorité des bactéries à la surface des agrégats et dans la macroporosité seront plus exposées à ces contaminants que celles localisées dans des microagrégats stables (Sessitsch *et al.* 2001). La structuration du sol est un paramètre essentiel conditionnant la bioaccessibilité des contaminants. Son rôle a été plus spécifiquement étudié dans des contextes (*i*) d'exposition aux contaminants métalliques (Kandeler *et al.* 2000 ; Ranjard *et al.* 2000) et aux pesticides (Poll *et al.* 2010 ; Pinheiro *et al.* 2015) et (*ii*) d'incorporation de la matière organique exogène après épandage de PRO (Sessitsch *et al.* 2001).

À ce jour, toutes les études sur l'ABR dans les sols ont été menées *via* des approches de déstructuration par homogénéisation des échantillons, négligeant les notions d'habitats microbiens et conduisant à des mesures de BRA ou GRA susceptibles de mener à des mésestimations des niveaux d'exposition à l'échelle des agrégats.

8.4.2 Microenvironnement bactérien

L'impact des activités anthropiques sur la biologie environnementale est généralement évalué à une échelle macroscopique. Par exemple, l'exposition chimique est évaluée à l'échelle de plusieurs grammes de sol ou de sédiment, ou d'un litre d'eau. Certaines études cherchent même à comprendre l'impact des eaux usées traitées des STEU à l'échelle d'un bassin versant. Pourtant, l'environnement dans lequel vivent les micro-organismes, étant donné leur taille, est à l'échelle du micromètre. Il est généralement admis que la majorité des bactéries, dans pratiquement tous les environnements, sont intégrées dans des biofilms (Costerton *et al.* 1995 ; Battin *et al.* 2016 ; Flemming et Wuertz 2019). À l'échelle microscopique, il existe dans les biofilms une extrême hétérogénéité d'architecture, de structure, de composition chimique et de composition de la communauté bactérienne (Flemming et Wingender 2010). Ainsi, les gradients de pH, d'oxygène et

d'autres accepteurs d'électrons et de nutriments organiques peuvent être abrupts et très dynamiques, créant ainsi des microenvironnements distincts. Les communautés bactériennes sont organisées dans ces microenvironnements pour coopérer, par exemple en échangeant des nutriments (Mattei *et al.* 2018). La composition des communautés microbiennes du biofilm est complexe et dynamique.

Ainsi, on peut affirmer que les principes de l'écologie microbienne n'ont pas été suffisamment pris en compte pour l'étude de la résistance aux ATB, notamment à l'échelle de ces microenvironnements (Banerji *et al.* 2019). En d'autres termes, les risques environnementaux ont été évalués sur la base de mesures réalisées sur des cellules microbiennes planctoniques, sans prendre en compte l'influence des attributs du microenvironnement dans lequel vivent en interactions les populations bactériennes. En particulier, ces microenvironnements surexposent-ils ou protègent-ils les bactéries de la contamination environnementale anthropique par les ATB ? Ces différences pourraient ainsi remettre en question le résultat d'une évaluation des risques environnementaux des ATB qui repose sur des mesures de contaminations à une échelle macroscopique. L'expérience dans le traitement des infections, par exemple associées aux implants ou aux cathéters, montre que les bactéries des biofilms peuvent être plusieurs centaines de fois plus résistantes aux ATB que les mêmes bactéries à l'état planctonique (Stewart et Costerton 2001). Plusieurs phénomènes peuvent contribuer à cette résistance accrue aux ATB. D'une part, la matrice du biofilm constitue une barrière physique à la pénétration des ATB. D'autre part, l'épuisement des nutriments dans ces microenvironnements conduit les bactéries à l'état VBNC ou de persistance, les rendant moins sensibles aux ATB (Fisher, Gollan et Helaine 2017 ; Ayrapetyan, Williams et Oliver 2018). Enfin, la coopération de la communauté pourrait intervenir, permettant à des bactéries sensibles aux β-lactamines de survivre à proximité d'individus produisant des β-lactamases qui détruisent ces ATB.

L'évolution de la résistance aux ATB au sein des communautés bactériennes de biofilms sera ainsi plus rapide qu'au sein des communautés planctoniques car le THG par conjugaison, par exemple, nécessite une proximité physique des bactéries. La pollution conjointe par les ATB et des microplastiques, servant de substrats pour la formation de biofilms, pourrait ainsi accélérer le développement de la résistance aux ATB dans l'environnement marin (Arias-Andres *et al.* 2018 ; Arias-Andres, Rojas-Jimenez et Grossart 2019).

8.4.3 Exposition à des mélanges de sélecteurs

Les environnements terrestres ou aquatiques sont des assemblages complexes d'une multitude de composés organiques et/ou minéraux, naturels ou anthropiques qui peuvent individuellement avoir, ou non, un effet sur les micro-organismes. Ces assemblages conduisent à une exposition multiple des communautés bactériennes. Certaines sources de contamination de l'environnement par les ATB sont également une source de contamination par les ETM et/ou les biocides (ex : eaux usées traitées, boues de STEU, PRO). Ainsi, l'exposition bactérienne conjointe aux ATB (§ 8.1), aux ETM (§ 8.2) et aux biocides (§ 8.3) pourrait porter à conséquence sur l'apparition et/ou le maintien de l'ABR *via* des mécanismes de co-sélection (§ 4.1.2). Le mélange de ces contaminants pourrait provoquer un effet « cocktail » additif, synergique ou antagoniste par rapport à l'ensemble des effets individuels attendus. Si un effet cumulé peut être craint, les rares études menées *in vitro* sur les effets cocktails (notamment des ATB et des ETM) ne montrent pas systématiquement un effet synergique. Ce questionnement est néanmoins encore exploratoire dans le cadre de l'ABR. Aussi, cette notion de mélange de molécules est une question cruciale pour estimer le risque de sélection et d'émergence de pathogènes résistants aux ATB dans l'environnement. La transposition des données « mélange » obtenues *in vitro* à l'environnement reste très complexe, variable, et hasardeuse. En effet, les expérimentations *in vitro* sont nécessairement simplifiée pour être reproductibles : elles opposent une espèce bactérienne à un polluant unique en condition contrôlée.

8.5 Synthèse

La comparaison théorique des concentrations en ATB mesurées dans l'environnement en France avec celles pour lesquelles des effets biologiques ont été démontrés *in vitro* a été effectuée pour quatre classes pharmacologiques (fluoroquinolones, sulfamides, macrolides et tétracyclines) dans la phase dissoute des matrices liquides étudiées. Les conclusions de cet exercice sont les suivantes :

- La somme des concentrations en fluoroquinolones et en macrolides dans les eaux usées traitées de STEU ou dans les rivières les plus contaminées pourraient favoriser la dissémination de l'ABR.
- La somme des concentrations en sulfamides et en tétracyclines dans les phases dissoutes des matrices liquides sont inférieures à celles décrites comme pouvant favoriser la dissémination de l'ABR.

Ces conclusions fournissent une indication sur les classes pharmacologiques les plus susceptibles de favoriser la dissémination de l'ABR dans l'environnement. Elles sont toutefois à interpréter avec précaution puisque les données utilisées et les modalités de l'exercice ne permettent pas de tenir compte de nombreuses incertitudes, dont celles liées aux déterminants de l'exposition bactérienne dans l'environnement suivantes :

- Seule une fraction d'un composé présent dans l'eau ou le sol parvient au contact proche des micro-organismes (notion de bioaccessibilité), puis au niveau de la cible (notion de biodisponibilité) :
  - La bioaccessibilité exprime une contrainte dans le temps et/ou dans l'espace, liée à habitat, et est à prendre en compte en particulier dans les matrices complexes telles que les sols ou les biofilms.
  - La biodisponibilité dépend de la forme (chimique) du composé. Elle est fonction des conditions dans le milieu et de ses interactions avec la matrice environnante.
- Les environnements terrestres ou aquatiques sont potentiellement multicontaminés par les ATB, ETM, et biocides.
  - Les mécanismes de co-sélection permettent d'envisager que la multicontamination par les ATB, les ETM et les biocides pourrait favoriser l'apparition et le maintien de l'ABR. Cet effet cocktail (synergique, additif ou antagoniste) est cependant difficile à anticiper. Si un effet cumulé peut être craint, les rares études menées *in vitro* (notamment des ATB et des ETM) ne montrent pas systématiquement un effet synergique ou additif.
  - Bien que des études *in situ* mettent en évidence une corrélation positive entre la présence d'ETM ou de biocides dans l'environnement et la présence de BRA ou de GRA, les données actuellement disponibles ne permettent pas d'évaluer l'impact potentiel de leur présence sur la dissémination de l'ABR dans l'environnement.
  - Les environnements proches des rejets de STEU ou les sols agricoles amendés par des PRO sont contaminés en permanence par des BRA, des GRA, des ATB, des ETM et des biocides, et hébergent également des espèces bactériennes autochtones potentiellement sources de GRA.
- L'impact des activités anthropiques sur la biologie environnementale est généralement évalué à une échelle macroscopique. Pourtant, l'environnement dans lequel vivent les micro-organismes, étant donné leur taille, est à l'échelle du micromètre. Ainsi, les principes de l'écologie microbienne n'ont pas été suffisamment pris en compte pour l'étude de la résistance aux ATB, notamment à l'échelle de ces microenvironnements.

L'impact des sélecteurs dans l'environnement a principalement été étudié dans les matrices liquides. En effet, dans les matrices solides, la biodisponibilité et la bioaccessibilité des ATB sont difficilement quantifiables. À ce jour, toutes les études sur l'ABR dans les sols ont été menées *via* des approches de déstructuration par homogénéisation des échantillons, négligeant les notions d'habitats microbiens et conduisant à des mesures de BRA ou GRA susceptibles de mésestimer les niveaux d'exposition à l'échelle des agrégats.

Par ailleurs, il est généralement admis que la majorité des bactéries, dans pratiquement tous les environnements, sont intégrées dans des biofilms.

- Les biofilms peuvent être d'une extrême hétérogénéité de structure, de composition chimique et de composition de la communauté bactérienne. Les gradients de pH, d'oxygène et d'autres accepteurs d'électrons et de nutriments organiques peuvent être abrupts et très dynamiques, créant ainsi des microenvironnements distincts.
- Les bactéries vivant dans des biofilms peuvent être plus résistantes aux ATB que les mêmes bactéries à l'état planctonique. En effet,
  - La matrice du biofilm constitue une barrière physique à la pénétration des ATB ;
  - L'épuisement des nutriments dans ces microenvironnements conduit les bactéries à l'état VBNC ou de persistance, ce qui peut les rendre moins sensibles aux ATB ;
  - La coopération de la communauté pourrait intervenir, permettant par exemple à des bactéries sensibles aux β-lactamines de survivre à proximité d'individus produisant des β-lactamases qui détruisent ces ATB ;
  - L'évolution de la résistance aux ATB au sein des communautés bactériennes de biofilms serait plus rapide qu'au sein des communautés planctoniques car le transfert horizontal de gènes par conjugaison, par exemple, nécessite une proximité physique des bactéries.

État des connaissances sur l'impact des sélecteurs sur l'ABR

Les connaissances sur l'impact des sélecteurs sur l'ABR dans l'environnement sont encore parcellaires. Toutefois, sur la base des études menées *in situ* et de l'analyse des informations précédemment exposées, les conclusions suivantes peuvent être énoncées :

- Concernant l'émergence de nouvelles BRA porteuses de GRA environnementaux
  - L'environnement héberge des communautés microbiennes complexes contenant un grand répertoire de GRA.
  - Les activités anthropiques favorisent la diversification des GRA et leur dissémination dans des espèces bactériennes phylogénétiquement éloignées.
  - Les conditions favorisant l'émergence dans les milieux récepteurs, aquatique ou terrestre, de souches bactériennes pathogènes porteuses de nouveaux GRA d'origine environnementale ou clinique sont résumées dans la figure 40.
  - Cette probabilité d'émergence augmente avec l'intensité de la contamination de l'environnement par les bactéries pathogènes et par les agents sélecteurs.

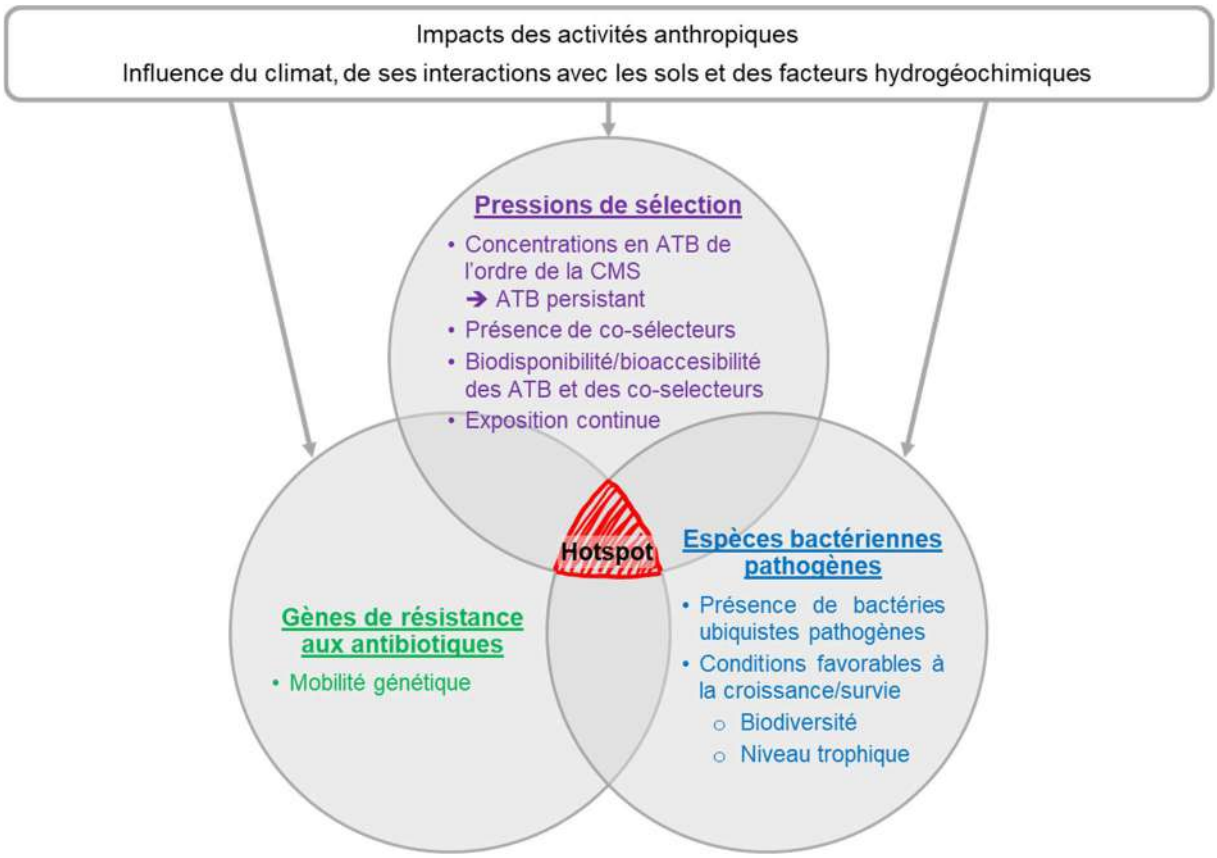


Figure 40. Conditions environnementales favorables au transfert de gènes de résistance aux antibiotiques vers des espèces bactériennes pathogènes.

- Concernant les BRA
  - Seuls les ATB les plus persistants sont détectés dans l'environnement. Ainsi, un environnement contaminé par une BRA ne contient pas, ou plus nécessairement les ATB auxquels elle est résistante (ex : β-lactamines).
  - L'absence de corrélation entre la présence d'*E. coli* et d'*Enterococcus* spp. antibiorésistants dans l'eau et les concentrations en ATB mesurées dans le milieu suggère que la résistance a été acquise dans le tractus digestif des individus sous antibiothérapie (Homme et/ou animal) et non dans l'environnement.
  - Dans les environnements peu ou pas contaminés par des sélecteurs, les BRA d'origine humaine ne se maintiennent pas et/ou sont diluées. Dans ces conditions, la sélection des BRA semble être un mécanisme minoritaire dans la dissémination environnementale de la résistance aux ATB.
- Concernant les GRA
  - Certains auteurs ont observé des corrélations positives entre les concentrations d'ATB et l'abondance de GRA dans certains environnements. Cependant, hormis dans les rejets d'industrie pharmaceutique qui se concentrent principalement en Asie, l'abondance des GRA est corrélée à la contamination fécale plutôt qu'à une sélection par les ATB.
  - Les EGM portent souvent conjointement des gènes de résistance aux ATB, aux ETM et aux biocides. Ainsi, la pression de sélection exercée par un de ces sélecteurs favorise le maintien de l'EGM complet et donc de la résistance aux ATB, aux ETM et aux biocides.
  - La transmission de GRA mobiles à des espèces environnementales a été mise en évidence en l'absence de pression de sélection ATB et sans coût métabolique en conditions de laboratoire, ce qui ne peut exclure l'existence d'un tel transfert dans l'environnement. Ainsi, la contamination fécale permettrait la transmission des GRA au résistome environnemental.

En France, la présence d'ATB n'est pas suffisante pour favoriser la survie des BRA et la persistance des GRA dans l'environnement. La présence de co-sélecteur(s), la diversité des communautés bactériennes et l'hétérogénéité des milieux sont autant de facteurs influençant leurs dynamiques spatio-temporelles.

9 Recommandations

9.1 Préambule

L'état de la contamination de l'environnement par les ATB, BRA et GRA et de ses causes possibles, effectué dans cette expertise, est à repositionner dans le contexte sanitaire, environnemental et socio-économique **français**, dans lequel :

- L'accès aux soins est facilité pour une majeure partie de la population ;
- La prescription d'ATB est réglementée ;
- La production nationale de substances actives d'ATB est pratiquement inexistante ;
- Les systèmes de collecte et d'assainissement collectif des eaux usées sont largement répandus sur le territoire ;
- Les procédés d'hygiénisation des PRO avant leur valorisation agricole se développent.

En France, les milieux aquatiques (eaux et sédiments) semblent jusqu'ici en mesure de dissiper, ou pour le moins de diluer, les apports anthropiques actuels en ATB, BRA et GRA. L'introduction de BRA et/ou de GRA est aujourd'hui rendue possible en tout point de la planète par les flux continus internationaux (personnes, animaux, denrées). Par ailleurs, les connaissances sur le pouvoir sélecteur dans l'environnement de l'ensemble des contaminants (incluant les ATB, les ETM et les biocides), de leurs seuils d'action et de leurs effets combinés restent encore parcellaires. De plus, les capacités de dissipation des écosystèmes dépendent d'équilibres naturels soumis à de nouvelles pressions. Ainsi, au regard des connaissances déjà acquises, il convient d'anticiper les potentielles évolutions liées en particulier :

- Au changement climatique engagé qui modifiera les régimes de précipitation, le niveau des cours d'eau, le ruissellement, la contamination des milieux et l'atténuation des contaminations par la dilution, pouvant mettre en péril les capacités de résilience des écosystèmes récepteurs ;
- Au développement de nouvelles pratiques (réutilisation des eaux usées traitées, recharge artificielle de nappes, stockages d'eau) qui pourraient augmenter la pression anthropique sur l'environnement et ainsi dépasser la capacité de résilience des milieux récepteurs ;
- Au développement de l'industrie pharmaceutique nationale. Une relocalisation sur le territoire français de la fabrication des substances actives, actuellement centralisée dans quelques pays, surtout asiatiques (Chine et Inde), est souhaité au niveau gouvernemental[57]. Dans cette optique, il convient d'assurer que la régulation des rejets de cette industrie en France et en Europe tienne compte de l'impact des ATB sur l'évolution de la résistance aux ATB dans les communautés bactériennes de l'environnement.

9.2 Recommandations pour améliorer le suivi de la contamination environnementale par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance

Les données exposées, notamment aux chapitres 6 et 7, démontrent un socle déjà important de connaissances sur le suivi de la contamination environnementale par les ATB, les BRA et les GRA. Cependant, considérant les difficultés rencontrées pour dresser un bilan des données de contamination de l'environnement, résultant notamment de la diversité des paramètres mesurés et

[57] https://www.politico.eu/article/europe-still-coming-up-short-on-drug-supplies

du caractère parcellaire, ponctuel et hétérogène des données à disposition, le GT estime capital d'optimiser et de pérenniser les acquisitions de données.

9.2.1 Recommandations sur le déploiement d'indicateurs de contamination environnementale

Si le GT promeut une recherche exhaustive dans l'environnement des ATB et de leurs produits de transformation, des BRA, des GRA, de leurs relations et de leur expression, par tous les moyens analytiques actuellement en développement, il recommande en complément le déploiement d'indicateurs pour suivre la contamination de l'environnement par les ATB, BRA et GRA. Ces indicateurs permettront une comparaison spatio-temporelle de la dynamique de la contamination environnementale entre les études, mais également dans les différents compartiments. Un indicateur universel étant difficilement concevable, le GT s'oriente vers la prise en compte de la combinaison de plusieurs indicateurs pour rendre compte de situations environnementales complexes.

Le GT recommande que ces indicateurs soient systématiquement suivis dans l'ensemble des études, en complément des paramètres mesurés pour répondre à l'objectif de l'étude ou à la question scientifique, en tenant compte des recommandations de suivis formulées dans le paragraphe 9.2.2 ci-dessous.

L'acquisition de données pour ces paramètres permettra de valider ou non leur statut d'indicateurs et de préciser, à terme, leurs conditions d'utilisation. Cette liste minimale pourra être complétée ou simplifiée par l'acquisition de nouvelles connaissances (voir § 9.3).

9.2.1.1 Indicateurs de contamination environnementale par les antibiotiques

Le suivi des résidus d'ATB permet d'évaluer l'imprégnation des milieux et d'identifier des « hotspots », mais il n'est pas suffisant pour suivre la pression de sélection qu'ils pourraient exercer sur le milieu. Néanmoins, il s'avère nécessaire de disposer, pour une liste minimale de substances actives, de données fiables reposant sur des suivis réguliers sur le long terme, afin d'évaluer les évolutions de la contamination des milieux. Ainsi, considérant :

- Les utilisations d'ATB en médecine humaine et vétérinaire,
- Les données de contamination actuellement disponibles,
- La disponibilité et l'accessibilité des méthodes analytiques (facilité de mise en œuvre, coût, méthodes uniformisées),
- Les ATB suivis dans le cadre de la surveillance existante des milieux aquatiques,
- La dégradation rapide de certaines classes d'ATB dans l'environnement, comme par exemple les pénicillines ;

Les indicateurs de contamination suivants sont proposés :

- **Fluoroquinolones : ciprofloxacine,**
- **Macrolides : érythromycine, clarithromycine et/ou azithromycine,**
- **Sulfamides : sulfaméthoxazole et sulfaméthazine.**

Ces substances actives doivent être suivies à la fois dans les phases dissoutes et particulaires des eaux de surface et souterraines, les sols, les sédiments, les effluents de STEU et les PRO.

Pour ces suivis, des méthodes d'analyse éprouvées et respectant les standards de la normalisation nationale et/ou internationale devront être utilisées, quand ils existent, afin de pouvoir comparer les résultats issus de différentes études.

9.2.1.2 Indicateurs de contamination environnementale par les bactéries résistantes aux antibiotiques et gènes de résistance aux antibiotiques

Considérant :

- Les données d'épidémiologie clinique humaine et vétérinaire,
- Les données de contamination actuellement disponibles,
- La disponibilité et l'accessibilité des méthodes analytiques (facilité de mise en œuvre, coût, méthodes uniformisées),
- Les travaux internationaux (JPI-AMR 2019 ; Groupe AGISAR de l'OMS ; EU) qui pointent le besoin de définir des BRA et des GRA indicateurs de contamination communs chez l'Homme, les animaux et dans l'environnement,
- Les indicateurs proposés par d'autres organismes impliqués ;

Le GT propose les indicateurs de contamination listés dans le tableau XXIV en précisant les modalités de quantification et d'expression des résultats (valeurs absolues et relatives) à utiliser.

Tableau XXIV. Proposition d'indicateurs et modalités de quantification et d'expression des résultats.

Indicateur proposé	Méthode de détermination	Résultats et unités	Intérêts	Limites
***E. coli* résistant aux céphalosporines de 3e génération ou *E. coli* BLSE[a]**	Culture sur milieux sélectifs	- Valeur absolue (CFU.L^{-1}) de préférence - Valeur relative par rapport à la concentration d'*E. coli* totaux	- Suivi relativement simple - Indicateurs de vulnérabilité du milieu - Présents dans les sols, eaux, sédiments - Évaluent l'impact anthropique sur l'ABR dans l'environnement - Identifient des hotspots et/ou des périodes à risque de contamination par les BRA d'origine anthropique - Indicateurs utilisés en médecine humaine et vétérinaire	- Ne permettent pas de décrire de nouvelles BRA - Perdent rapidement leur cultivabilité dans l'environnement - Pas de suivi du devenir spatio-temporel à grande échelle
***intI1* ou *sul1*[b]**	qPCR	- Abondance relative (copie de gènes/ADNr 16S) - Nombre de copies.L^{-1} pour les matrices liquides - Nombre de copies.g MS^{-1} pour les matrices solides	- Suivi relativement simple - Informent sur la dynamique de résistance globale - Indicateurs de pression anthropique - Peuvent être couplés avec la recherche de GRA pour apprécier la dynamique de transfert	- N'identifient pas les GRA présents - Méthode non standardisée - Problème possible d'inhibiteurs d'extraction et/ou d'amplification dans certaines matrices environnementales contaminées

[a] Ces deux paramètres se recouvrent partiellement. Actuellement, la résistance aux céphalosporines de 3e génération chez *E. coli* est majoritairement médiée par la production de BLSE ; [b] La mesure de ces deux paramètres est équivalente car *intI1* et *sul1* sont systématiquement présents sur les intégrons de classe 1.

9.2.2 Recommandations sur les stratégies de suivi des antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques de la résistance dans l'environnement

Les études descriptives de la contamination environnementale par les ATB, les BRA et/ou les GRA sont nombreuses, mais la plupart ne concerne qu'un compartiment à la fois, et repose sur des campagnes de prélèvements ponctuels (réalisés avec des méthodes d'échantillonnage propres à

chaque étude), dans des écosystèmes très variables. Les valeurs générées sont donc difficilement comparables entre les compartiments ou entre les études pour un même compartiment.

Afin de faciliter la comparaison spatio-temporelle de la contamination environnementale par les ATB, BRA et GRA, le GT recommande une harmonisation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse afin de permettre la comparaison des paramètres de suivi et des indicateurs.

La communauté scientifique devra participer, quand des manques sont identifiés, à l'établissement ou l'amélioration de protocoles standardisés d'échantillonnage, de préparation, et de conservation des échantillons environnementaux (sols, sédiments, eaux) et des sources de ATB, BRA et GRA (effluents, PRO).

Le GT recommande que les futurs plans d'échantillonnage soient dimensionnés pour :

- Suivre la diffusion spatiale et temporelle des ATB, BRA et GRA afin de connaître leur devenir dans les milieux récepteurs ;
- Évaluer la variabilité dans le temps des concentrations en ATB, BRA et GRA dans les milieux récepteurs (ex : rivières, lacs) sur des sites pilotes et/ou sites ateliers instrumentés et représentatifs de la diversité géographique du territoire français.

Plus généralement, le GT recommande de favoriser la mutualisation et la comparaison des données acquises sur différents sites et milieux, aux différentes échelles spatiales (*i.e.* transfert sol-nappe, bassin versant) au travers de :

- La création et/ou le renforcement de réseaux de suivi pérennes, représentatifs des différents compartiments de l'environnement et des sources d'ATB, BRA et GRA. Ces données temporelles fiables permettraient d'identifier les tendances évolutives, et de mesurer les effets des politiques publiques visant à réduire la consommation d'ATB en France ;
- La bancarisation systématique des données (y compris des résultats négatifs), particulièrement sur ces réseaux pérennes. Elle pourrait se faire à l'échelle nationale, mais aussi internationale.
- L'usage de contrôles internes et de techniques standardisées, quand ils existent, ou à défaut de procédures garantissant la qualité et la comparabilité des données et des métadonnées associées.
- Un rapprochement des différents outils de surveillance réglementaire (environnementaux et sanitaires) pour mutualiser les efforts.

9.3 Recommandations pour consolider et approfondir les connaissances actuelles

9.3.1 Besoins de recherche sur la contamination de l'environnement par les antibiotiques

Le GT a mis en évidence des besoins dans trois axes principaux concernant le suivi des ATB dans l'environnement :

- *Élargissement du nombre de substances étudiées.* Les connaissances actuelles portent essentiellement sur un nombre assez restreint de substances actives, les autres n'ayant pas de standard ou étant plus complexes à analyser. Ce manque d'informations biaise fortement la connaissance de la réelle contamination des écosystèmes.
    - Des efforts spécifiques de développements méthodologiques doivent être entrepris notamment concernant :
        - Des classes à usage important pour lesquelles peu de données sont disponibles comme les streptogramines,
        - Des classes ATB de dernier recours comme les carbapénèmes ou les polymyxines,
        - Les produits de dégradation de substances actives.

  - L'utilisation des méthodes qualitatives d'analyses non ciblées de type « screening » et les méthodes de traitement de données associées sont à considérer pour identifier de nouvelles molécules d'intérêt.
- *Élargissement des matrices étudiées.* Des études spécifiques sur la fraction particulaire des matrices liquides (matières en suspension) ainsi que sur les sédiments et les périphytons doivent être envisagées.
- *Élargissement des connaissances sur l'exposition réelle des bactéries aux ATB.* Les études actuelles quantifient principalement les concentrations totales en ATB. Des études spécifiques permettant de mieux caractériser la partition entre les fractions et de définir la biodisponibilité des ATB et leurs interactions avec les constituants du milieu sont essentielles. Dans ce cadre, des études sont à mener au niveau des microenvironnements bactériens.

9.3.2 Besoins d'acquisition de données de contamination par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance

Le GT estime qu'il est important d'évaluer plus précisément les contributions relatives des multiples sources de contamination, et de documenter les niveaux de contamination d'autres compartiments récepteurs. Outre la poursuite de l'acquisition de données sur les sources majeures de contamination (effluents de STEU, PRO) et les compartiments déjà suivis (milieu aquatique continental), le GT recommande d'étudier la contamination par les ATB, BRA et GRA des environnements suivants :

- *La pisciculture,* en tant que source potentielle de contamination directe dans les compartiments aquatiques.
- *Les eaux côtières* pour lesquelles la contamination par les ATB, les BRA et les GRA est actuellement presque inconnue, bien que des projets soient en cours sur ce sujet.
- *Les milieux terrestres* pour lesquels la contamination en France par les ATB, les BRA et les GRA est presque inconnue concernant :
  - Les sols urbains, périurbains et agroforestiers,
  - Les sites et sols pollués,
  - La rhizosphère et la phyllosphère,
  - Les micro et macrofaunes qui peuvent à la fois constituer des « hotspots » et jouer un rôle de vecteurs de dissémination (vers de terre, arthropodes, *etc.*).
- Et, finalement, toutes *les sources de contamination* pour lesquelles l'absence de donnée n'a pas permis de statuer sur l'existence et/ou l'importance d'un impact sur la contamination globale : assainissement non collectif, sites producteurs de principes actifs ATB ou de médicaments contenant des ATB, anciens sites d'enfouissement de déchets et biodéchets issus des composteurs de proximité.

9.3.3 Besoins de développement de nouvelles technologies d'acquisition et de traitement des données

L'expertise menée par le GT et sa synthèse ont aussi permis de pointer des besoins scientifiques et techniques qui pourraient ouvrir de vastes champs de connaissances pour approfondir l'étude de l'ABR :

- *Étude de l'expression des GRA* sous pression anthropique par métatranscriptomique.
- *Développement d'outils numériques de traitement de masse de données* (ex : « machine learning » et « deep learning » basés sur l'intelligence artificielle) pour analyser l'ensemble des données de surveillance de l'environnement et évaluer le risque de maintien de la résistance en fonction de l'exposition aux ATB, GRA et BRA au regard des différents sites et différentes situations.

- *Développement de modèles* de compréhension des interactions et des transferts d'ATB, BRA et GRA dans l'environnement *et d'outils numériques prédictifs* qui permettraient d'anticiper de potentielles évolutions : scénarios de changements climatiques, effet des changements de pratiques d'usages de l'eau, effet des leviers d'actions.

Cette meilleure compréhension de la dynamique de l'ABR dans l'environnement doit permettre d'identifier les liens entre les compartiments et les leviers d'atténuation de la dissémination de l'ABR dans l'environnement, et de développer des stratégies limitant cette dissémination.

9.3.4 Besoins de recherche sur les paramètres favorisant la dissémination environnementale des bactéries résistantes aux antibiotiques et des supports génétiques correspondants

La connaissance de la persistance puis de la dissémination des BRA et GRA dans l'environnement est le premier prérequis à l'étude de la transmission éventuelle des GRA à des espèces bactériennes pathogènes. Le GT recommande que des efforts de recherche soient engagés sur les axes majeurs suivants :

- *Déterminer les concentrations sub-inhibitrices d'ATB, seuls ou en mélange, favorisant la persistance, la dissémination, la sélection et l'émergence de l'ABR* :
  - *In vitro* dans des milieux complexes,
  - Par des expérimentations à différentes échelles (biofilms, mésocosmes, parcelles au champ).
- *Identifier les mécanismes et conditions qui permettent la persistance et la dissémination environnementale des BRA et GRA*. Des questionnements demeurent notamment sur :
  - Le « *fitness* » des BRA (voir § 3.6) par rapport à leurs parents sensibles, ainsi que le « *fitness* » des BRA dans différentes niches écologiques au sein d'écosystèmes complexes ;
  - Le coût biologique du maintien des GRA dans les BRA à l'échelle de populations et de communautés microbiennes ;
  - Les bactéries à l'état de « *persisters* » (voir § 3.2).
- *Identifier les mécanismes et conditions qui favorisent le transfert de GRA dans l'environnement.* Le transfert de GRA à des bactéries pathogènes dans l'environnement a jusqu'à lors été documenté *a posteriori*. Des études sont nécessaires pour tenter de prévoir de telles émergences. Elles viseraient à :
  - Identifier les EGM favorisant le recrutement des GRA à partir d'espèces bactériennes environnementales et leur mobilité vers les espèces pathogènes. Ceci nécessitera d'identifier l'environnement génétique des GRA et des espèces porteuses des GRA par l'utilisation de nouveaux outils tels que la métagénomique et la reconstruction de plasmide à partir de données de séquençage ;
  - Identifier de nouveaux GRA dans l'environnement et déterminer leur aptitude et leurs conditions de transfert ;
  - Caractériser plus exhaustivement la composition taxonomique des communautés bactériennes de niches écologiques pertinentes (ex : rhizosphère, masses d'eau) pour rendre compte de la dissémination des GRA entre espèces bactériennes et identifier les espèces bactériennes pathogènes potentiellement réceptrices de ces GRA.
- *Documenter le profil de résistance aux ATB et l'expression des GRA des genres ou espèces bactériens ubiquistes pathogènes* (ex : *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*), dont les caractères culturaux (chimioorganotrophie, température de croissance) seraient favorables aux transferts de BRA ou GRA de l'écosystème naturel (eau, sol, faune et flore) à l'Homme, et inversement. L'objectif est de disposer à terme d'un panel de bactéries sentinelles, indicatrices d'une pression de sélection dans l'environnement.

9.3.5 Besoins de recherche sur l'évaluation des capacités maximales de résilience des écosystèmes contaminés de façon continu

Dans le contexte actuel de changement climatique et d'évolution des pratiques évoqués dans le préambule, l'étude de la résilience des milieux récepteurs (faisant intervenir des mécanismes de survie, dilution, prédation) est un axe de recherche à développer. Pour appréhender le devenir des ATB, BRA et GRA, et le rôle des co-sélecteurs (ETM, biocides, pesticides et autres), le GT recommande que l'observation *in situ* s'accompagne d'approches en modèles expérimentaux (microcosmes, mésocosmes et parcelles expérimentales). Ces études devront permettre d'anticiper :

- La réponse des milieux face à divers stress abiotiques (présences de résidus d'ATB, crues/orages) ;
- Les effets de nouvelles pratiques (réutilisation des eaux usées, recharge artificielle de nappes, stockage d'eau) ;
- Les impacts du changement climatique, dont la multiplication des évènements extrêmes et la modification des températures ;
- Les points de rupture de la résilience des écosystèmes récepteurs et des fonctions écosystémiques qu'ils soutiennent, au-delà desquels la récupération écologique des milieux récepteurs ne serait plus possible.

Les approches proposées seront nécessairement multidisciplinaires et rassembleront des scientifiques issus de la microbiologie fondamentale, environnementale et clinique, des vétérinaires, des médecins, des pharmaciens, des chimistes, mais également des mathématiciens, informaticiens et des spécialistes des sciences sociales. Leurs résultats pourront orienter les priorités de recherche et d'investissement permettant de réduire la contamination de l'environnement par les ATB, BRA et GRA.

10 Bibliographie

10.1 Publications

Aberkane, S., F. Compain, D. Decre, A. Pantel, M. Vittecoq, J. Solassol, N. Bouzinbi, H. Jean-Pierre et S. Godreuil. 2017. "Persistence of *bla*$_{CMY-2}$-producing *Proteus mirabilis* in two gull colonies at a 1-year interval in Southern France." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 9: 138-140. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.005.

Acar, J. F. et G. Moulin. 2012. "Antimicrobial resistance: A complex issue." *Revue Scientifique et Technique* 31 (1): 23-31. https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2098.

Ademe. 2016. *Épandage.* https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/fiche-technique-epandage-201608.pdf.

Adhikari, B. K., A. Trémier et S. Barrington. 2012. "Performance of five Montreal West Island home composters." *Environmental Technology* 33 (21): 2383-2393. https://doi.org/10.1080/09593330.2012.670267.

Adhikari, B. K., A. Trémier, J. Martinez et S. Barrington. 2012a. "Home composting of organic waste – part 1: Effect of home composter design." *International Journal of Environmental Technology and Management* 15 (3-6): 417-437. https://doi.org/10.1504/ijetm.2012.049238.

Adhikari, B. K., A. Trémier, J. Martinez et S. Barrington. 2012b. "Home composting of organic waste – part 2: Effect of management practices." *International Journal of Environmental Technology and Management* 15 (3-6): 438-464. https://doi.org/10.1504/ijetm.2012.049239.

Ahmed, W., A. Lobos, J. Senkbeil, J. Peraud, J. Gallard et V. J. Harwood. 2018. "Evaluation of the novel crAssphage marker for sewage pollution tracking in storm drain outfalls in Tampa, Florida." *Water Research* 131: 142-150. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.011.

Alexy, R., T. Kümpel et K. Kümmerer. 2004. "Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test." *Chemosphere* 57 (6): 505-512. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.024.

Algros, E. et M.-J. Jourdain. 2007. *Contamination potentielle des échantillons de stations d'épuration (eaux brutes, eaux traitées, boues) et effluents d'élevage par des molécules pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire.* IRH Environnement.

Allen, H. K., J. Donato, H. H. Wang, K. A. Cloud-Hansen, J. Davies et J. Handelsman. 2010. "Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments." *Nature Reviews Microbiology* 8: 251. https://doi.org/10.1038/nrmicro2312.

Almeida, A., A. L. Mitchell, M. Boland, S. C. Forster, G. B. Gloor, A. Tarkowska, T. D. Lawley et R. D. Finn. 2019. "A new genomic blueprint of the human gut microbiota." *Nature* 568 (7753): 499-504. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1.

Alotaibi, S. M. I., A. Ayibiekea, A. F. Pedersen, L. Jakobsen, M. Pinholt, H. Gumpert, A. M. Hammerum, H. Westh et H. Ingmer. 2017. "Susceptibility of vancomycin-resistant and -sensitive *Enterococcus faecium* obtained from Danish hospitals to benzalkonium chloride, chlorhexidine and hydrogen peroxide biocides." *Journal of Medical Microbiology* 66 (12): 1744-1751. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000642.

Alouache, S., M. Kada, Y. Messai, V. Estepa, C. Torres et R. Bakour. 2012. "Antibiotic resistance and extended-spectrum β-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria)." *Microbes and environments* 27 (1): 80-86. https://doi.org/10.1264/jsme2.me11266.

Alvarez-Ortega, C., J. Olivares et J. L. Martínez. 2013. "RND multidrug efflux pumps: What are they good for?" *Frontiers in Microbiology* 4: 7-7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00007.

Alves, M. S., A. Pereira, S. M. Araújo, B. B. Castro, A. C. M. Correia et I. Henriques. 2014. "Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes." *Frontiers in Microbiology* 5: 426-426. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00426.

Alygizakis, N. A., P. Gago-Ferrero, V. L. Borova, A. Pavlidou, I. Hatzianestis et N. S. Thomaidis. 2016. "Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater." *Science of The Total Environment* 541: 1097-1105. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.145.

Ambrosini, A., R. de Souza et L. M. P. Passaglia. 2016. "Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity." *Plant and Soil* 400 (1): 193-207. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2727-7.

Aminot, Y., K. Le Menach, P. Pardon, H. Etcheber et H. Budzinski. 2016. "Inputs and seasonal removal of pharmaceuticals in the estuarine Garonne River." *Marine Chemistry* 185: 3-11. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2016.05.010.

Aminov, R. I. 2009. "The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature." *Environmental Microbiology* 11 (12): 2970-2988. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x.

An, X.-L., Q.-L. Chen, D. Zhu, Y.-G. Zhu, M. R. Gillings et J.-Q. Su. 2018. "Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and the genetic diversity of integron gene cassettes." *Applied and Environmental Microbiology* 84 (9): e02766-17. https://doi.org/10.1128/aem.02766-17.

Andersson, D. I. et D. Hughes. 2014. "Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics." *Nature Reviews Microbiology* 12: 465. https://doi.org/10.1038/nrmicro3270.

Angeles, L. F., R. A. Mullen, I. J. Huang, C. Wilson, W. Khunjar, H. I. Sirotkin, A. E. McElroy et D. S. Aga. 2020. "Assessing pharmaceutical removal and reduction in toxicity provided by advanced wastewater treatment systems." *Environmental Science: Water Research and Technology* 6 (1): 62-77. https://doi.org/10.1039/C9EW00559E.

Anses. 2018. *Note d'AST de l'Anses portant sur le projet de règlement relatif à la réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation agricole adopté par la Commission européenne le 28 mai 2018 (saisine n°2018-SA-0198).* Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Maisons-Alfort). https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2018SA0198.pdf.

Anses. 2019. *Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2018.* Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Agence nationale du médicament vétérinaire (Fougères, France). https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2018.pdf.

Ansm. 2016. *Liste des antibiotiques critiques - Actualisation 2015.* Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé https://www.ansm.sante.fr/content/download/85395/1077521/version/1/file/ATBC-antibiotiques-critiques-actualisation2015.pdf.

Ansm. 2017. *L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2015.* Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/188a6b5cf9cde90848ae9e3419bc3d3f.pdf.

Ansm. 2019. "Répertoire des spécialités pharmaceutiques." Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Consulté le 28 mai 2019. http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/index.php#result.

Aquaref. 2017. *Opérations d'échantillonnage de sédiments en milieu continental (cours d'eau et plan d'eau) dans le cadre des programmes de surveillance DCE - Recommandations techniques - Edition 2017.* https://www.aquaref.fr/system/files/AQUAREF_2017_Guide_Echantillonnage_SED_VF.pdf.

Arias-Andres, M., U. Klümper, K. Rojas-Jimenez et H.-P. Grossart. 2018. "Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems." *Environmental Pollution* 237: 253-261. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.058.

Arias-Andres, M., K. Rojas-Jimenez et H.-P. Grossart. 2019. "Collateral effects of microplastic pollution on aquatic microorganisms: An ecological perspective." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112: 234-240. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.041.

Arnaud, I. et V. Jarlier. 2018. *Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin : résultats 2016.* Santé publique France (Saint-Maurice). https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/186701/2319813.

Artz, R. R. E. et K. Killham. 2002. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in private drinking water wells: influences of protozoan grazing and elevated copper concentrations." *FEMS Microbiology Letters* 216 (1): 117-122. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11424.x.

Assemblée générale des Nations Unies. 2016. Résolution adoptée par l'Assemblée généralele 5 octobre 2016 - 71/3. Déclaration politique issue de la réunion de haut niveau de l'Assemblée générale sur la résistance aux agents antimicrobiens.

Assemblée générale des Nations Unies. 2019. Suite donnée à la déclaration politique issue de la réunion de haut niveau de l'Assemblée générale sur la résistance aux agents antimicrobiens - Rapport du Secrétaire général.

Assises de l'eau. 2019. *Un nouveau pacte pour faire face au changement climatique.* https://agriculture.gouv.fr/cloture-des-assises-de-leau-un-nouveau-pacte-pour-faire-face-au-changement-climatique.

Aubertheau-Laurent, E. 2013. "Évaluation de l'état de contamination des bassins versants par les résidus de médicaments : utilisation des biofilms épilithiques comme marqueur d'imprégnation du milieu." Thèse de doctorat, Chimie et microbiologie de l'eau, Université de Poitiers.

Aubertheau, E., T. Stalder, L. Mondamert, M.-C. Ploy, C. Dagot et J. Labanowski. 2017. "Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance." *Science of The Total Environment* 579: 1387-1398. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136.

Awad, Y. M., Y. S. Ok, A. D. Igalavithana, Y. H. Lee, Y.-K. Sonn, A. R. A. Usman, M. I. Al-Wabel et S. S. Lee. 2016. "Sulphamethazine in poultry manure changes carbon and nitrogen mineralisation in soils." *Chemistry and Ecology* 32 (10): 899-918. https://doi.org/10.1080/02757540.2016.1216104.

Ayrapetyan, M., T. Williams et J. D. Oliver. 2018. "Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells." *Journal of Bacteriology* 200 (20): e00249-18. https://doi.org/10.1128/jb.00249-18.

Azimi, S., S. Guérin, E. Garcia-Gonzalez, P. Candido, G. Couturier, M. Joyeux, G. Lavison et V. Rocher. 2018. "Pharmaceuticals in Seine water and wastewater treatment plant outfalls: the Paris conurbation case." *Techniques Sciences Méthodes* 6: 45-58. https://doi.org/10.1051/tsm/20186p45.

Baharoglu, Z. et D. Mazel. 2011. "*Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: A route towards multiresistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (5): 2438-2441. https://doi.org/10.1128/aac.01549-10.

Baharoglu, Z. et D. Mazel. 2014. "SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions." *FEMS Microbiology Reviews* 38 (6): 1126-1145. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077.

Bai, X., C. Xi et J. Wu. 2016. "Survival of *Helicobacter pylori* in the wastewater treatment process and the receiving river in Michigan, USA." *Journal of Water and Health* 14 (4): 692-698. https://doi.org/10.2166/wh.2016.259.

Bakalowicz, M. 1999. *Guide technique n°3 : Connaissance et gestion des ressources en eaux souterraines dans les régions karstiques - Notes et guides techniques du SDAGE Rhône-Méditerranée-Corse.* Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse. https://www.corse.eaufrance.fr/sites/siecorse/files/content/migrate_documents/guide-tech-3.pdf.

Bakalowicz, M. 2005. "Karst groundwater: A challenge for new resources." *Hydrogeology Journal* 13 (1): 148-160. https://doi.org/10.1007/s10040-004-0402-9.

Baker-Austin, C., M. S. Wright, R. Stepanauskas et J. V. McArthur. 2006. "Co-selection of antibiotic and metal resistance." *Trends Microbiol* 14 (4): 176-82. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006.

Baker, D. R. et B. Kasprzyk-Hordern. 2013. "Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments." *Science of The Total Environment* 454-455: 442-456. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.043.

Balaban, N. Q., S. Helaine, K. Lewis, M. Ackermann, B. Aldridge, D. I. Andersson, M. P. Brynildsen, D. Bumann, A. Camilli, J. J. Collins, C. Dehio, S. Fortune, J.-M. Ghigo, W.-D. Hardt, A. Harms, M. Heinemann, D. T. Hung, U. Jenal, B. R. Levin, J. Michiels, G. Storz, M.-W. Tan, T. Tenson, L. Van Melderen et A. Zinkernagel. 2019. "Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence." *Nature Reviews Microbiology*. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3.

Balcázar, J. L. 2018. "How do bacteriophages promote antibiotic resistance in the environment?" *Clinical Microbiology and Infection* 24 (5): 447-449. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.010.

Banerji, A., M. Jahne, M. Herrmann, N. Brinkman et S. Keely. 2019. "Bringing community ecology to bear on the issue of antimicrobial resistance." *Frontiers in Microbiology* 10 (2626). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02626.

Banque mondiale. 2019. "Indicateurs." Consulté le 27/06/2019. https://donnees.banquemondiale.org/indicateur.

Baquero, F., C. Alvarez-Ortega et J. L. Martinez. 2009. "Ecology and evolution of antibiotic resistance." *Environmental Microbiology Reports* 1 (6): 469-476. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00053.x.

Barraud, O. et M. C. Ploy. 2011. "Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise au point." *Journal des Anti-infectieux* 13 (3): 133-144. https://doi.org/10.1016/j.antinf.2011.03.001.

Barrios, R. E., H. K. Khuntia, S. L. Bartelt-Hunt, J. E. Gilley, A. M. Schmidt, D. D. Snow et X. Li. 2020. "Fate and transport of antibiotics and antibiotic resistance genes in runoff and soil as affected by the timing of swine manure slurry application." *Science of The Total Environment* 712: 136505. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136505.

Batt, A. L., I. B. Bruce et D. S. Aga. 2006. "Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges." *Environmental Pollution* 2006 v.142 no.2 (no. 2): pp. 295-302. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.010.

Battaglioli, E. J., G. A. Baisa, A. E. Weeks, R. A. Schroll, A. J. Hryckowian et R. A. Welch. 2011. "Isolation of generalized transducing bacteriophages for uropathogenic strains of *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (18): 6630-6635. https://doi.org/10.1128/AEM.05307-11.

Battin, T. J., K. Besemer, M. M. Bengtsson, A. M. Romani et A. I. Packmann. 2016. "The ecology and biogeochemistry of stream biofilms." *Nature Reviews Microbiology* 14 (4): 251-263. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15.

Beaber, J. W., B. Hochhut et M. K. Waldor. 2003. "SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes." *Nature* 427: 72. https://doi.org/10.1038/nature02241.

Bengtsson-Palme, J., E. Kristiansson et D. G. J. Larsson. 2018. "Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance." *FEMS microbiology reviews* 42 (1): fux053. https://doi.org/10.1093/femsre/fux053.

Bengtsson-Palme, J. et D. G. J. Larsson. 2016. "Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation." *Environment International* 86: 140-149. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015.

Berendonk, T. U., C. M. Manaia, C. Merlin, D. Fatta-Kassinos, E. Cytryn, F. Walsh, H. Bürgmann, H. Sørum, M. Norström, M.-N. Pons, N. Kreuzinger, P. Huovinen, S. Stefani, T. Schwartz, V. Kisand, F. Baquero et J. L. Martinez. 2015. "Tackling antibiotic resistance: The environmental framework." *Nature Reviews Microbiology* 13: 310. https://doi.org/10.1038/nrmicro3439.

Berendsen, B. J. A., J. Lahr, C. Nibbeling, L. J. M. Jansen, I. E. A. Bongers, E. L. Wipfler et M. G. M. van de Schans. 2018. "The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage." *Chemosphere* 204: 267-276. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.042.

Berg, G., A. Krechel, M. Ditz, R. A. Sikora, A. Ulrich et J. Hallmann. 2005. "Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi." *FEMS Microbiology Ecology* 51 (2): 215-229. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.006.

Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock et K. Smalla. 2002. "Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different Verticillium host plants." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (7): 3328-3338. https://doi.org/10.1128/aem.68.7.3328-3338.2002.

Berg, J., M. K. Thorsen, P. E. Holm, J. Jensen, O. Nybroe et K. K. Brandt. 2010. "Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay." *Environmental Science and Technology* 44 (22): 8724-8728. https://doi.org/10.1021/es101798r.

Berthe, T., M. Ratajczak, O. Clermont, E. Denamur et F. Petit. 2013. "Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (15): 4684-4693. https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13.

Berthe, T., A. Touron, J. Leloup, J. Deloffre et F. Petit. 2008. "Faecal-indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France)." *Marine Pollution Bulletin* 57 (1): 59-67. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.10.013.

Bhullar, K., N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E. D. Banks, M. D. Johnston, H. A. Barton et G. D. Wright. 2012. "Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome." *PLoS One* 7 (4): e34953. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953.

Bibbal, D., M. Kérourédan, E. Loukiadis, F. Scheutz, E. Oswald et H. Brugère. 2014. "Slaughterhouse effluent discharges into rivers not responsible for environmental occurrence of enteroaggregative *Escherichia coli*." *Veterinary Microbiology* 168 (2): 451-454. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.042.

Bibbal, D., E. Loukiadis, M. Kérourédan, N. Arpaillange, V. Dupouy, P. L. Toutain, E. Oswald, A. Bousquet-Melou et H. Brugère. 2009. "Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains carrying virulence genes isolated in wastewater of slaughterhouses in France." Third Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, Tours.

Bin, G., X. Cao, Y. Dong, Y. Luo et L. Q. Ma. 2011. "Colloid deposition and release in soils and their association with heavy metals." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41 (4): 336-372. https://doi.org/10.1080/10643380902871464.

Blaak, H., A. H. A. M. van Hoek, C. Veenman, A. E. Docters van Leeuwen, G. Lynch, W. M. van Overbeek et A. M. de Roda Husman. 2014. "Extended spectrum β-lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment." *International Journal of Food Microbiology* 168-169: 8-16. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006.

Blackwell, P. A., P. Kay, R. Ashauer et A. B. A. Boxall. 2009. "Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils." *Chemosphere* 75 (1): 13-19. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.070.

Blanch, A. R., J. L. Caplin, A. Iversen, I. Kühn, A. Manero, H. D. Taylor et X. Vilanova. 2003. "Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions." *Journal of Applied Microbiology* 94 (6): 994-1002. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01919.x.

Blázquez, J., A. Couce, J. Rodríguez-Beltrán et A. Rodríguez-Rojas. 2012. "Antimicrobials as promoters of genetic variation." *Current Opinion in Microbiology* 15 (5): 561-569. https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.07.007.

Bollache, L., E. Bardet, G. Depret, S. Motreuil, C. Neuwirth, J. Moreau et A. Hartmann. 2019. "Dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* in freshwater fishes from a French watershed (Burgundy)." *Frontiers in Microbiology* 9 (3239). https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03239.

Bonnet, R. 2004. "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48 (1): 1-14. https://doi.org/10.1128/aac.48.1.1-14.2004.

Boreen, A. L., W. A. Arnold et K. McNeill. 2004. "Photochemical fate of sulfa drugs in then aquatic environment: Sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups." *Environmental Science and Technology* 38 (14): 3933-3940. https://doi.org/10.1021/es0353053.

Borjesson, S., O. Dienues, P. Å. Jarnheimer, B. Olsen, A. Matussek et P. E. Lindgren. 2009. "Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides, β-lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR." *International Journal of Environmental Health Research* 19 (3): 219-230. https://doi.org/10.1080/09603120802449593.

Boudjemaa, R., R. Briandet, M. Revest, C. Jacqueline, J. Caillon, M. P. Fontaine-Aupart et K. Steenkeste. 2016. "New insight into daptomycin bioavailability and localization in Staphylococcus aureus biofilms by dynamic fluorescence imaging." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (8): 4983-4990. https://doi.org/10.1128/AAC.00735-16.

Bourdat-Deschamps, M., S. Ferhi, N. Bernet, F. Feder, O. Crouzet, D. Patureau, D. Montenach, G. D. Moussard, V. Mercier, P. Benoit et S. Houot. 2017. "Fate and impacts of pharmaceuticals and personal care products after repeated applications of organic waste products in long-term field experiments." *Science of The Total Environment* 607-608: 271-280. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.240.

Boy-Roura, M., J. Mas-Pla, M. Petrovic, M. Gros, D. Soler, D. Brusi et A. Menció. 2018. "Towards the understanding of antibiotic occurrence and transport in groundwater: Findings from the Baix Fluvià alluvial aquifer (NE Catalonia, Spain)." *Science of The Total Environment* 612: 1387-1406. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.012.

Braoudaki, M. et A. C. Hilton. 2004. "Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* k-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157." *FEMS Microbiology Letters* 235 (2): 305-309.

Braschi, I., S. Blasioli, C. Fellet, R. Lorenzini, A. Garelli, M. Pori et D. Giacomini. 2013. "Persistence and degradation of new β-lactam antibiotics in the soil and water environment." *Chemosphere* 93 (1): 152-9. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.016.

Bréchet, C., J. Plantin, M. Sauget, M. Thouverez, D. Talon, P. Cholley, C. Guyeux, D. Hocquet et X. Bertrand. 2014. "Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β-lactamase–producing *Escherichia coli* into the environment." *Clinical Infectious Diseases* 58 (12): 1658-1665. https://doi.org/10.1093/cid/ciu190.

BRGM. 2008. *Procédures d'échantillonnage des eaux souterraines en vue d'une analyse microbiologique - État de l'Art.* Bureau de recherches géologiques et minières. http://infoterre.brgm.fr/rapports//RP-56405-FR.pdf.

Brochado, A. R., A. Telzerow, J. Bobonis, M. Banzhaf, A. Mateus, J. Selkrig, E. Huth, S. Bassler, J. Zamarreño Beas, M. Zietek, N. Ng, S. Foerster, B. Ezraty, B. Py, F. Barras, M. M. Savitski, P. Bork, S. Göttig et A. Typas. 2018. "Species-specific activity of antibacterial drug combinations." *Nature* 559 (7713): 259-263. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0278-9.

Bronowski, C., C. E. James et C. Winstanley. 2014. "Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*." *FEMS Microbiology Letters* 356 (1): 8-19. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12488.

Brown, D. L. 2010. "Use of passive samplers to evaluate pharmaceutical fate in surface waters." Thèse de doctorat, Université du Nébraska (USA).

Bruchet, A., S. Robert, M. Esperanza, M. L. Janex-Habibi, C. Miege, M. Coquery, H. L. N. Budzinski et K. Lemenach. 2011. "Natural attenuation of priority and emerging contaminants during river bank filtration and artificial recharge." *Journal Europeen d'Hydrologie* 42: 123-133. https://doi.org/10.1051/wqual/2012004.

Buelow, E., J. R. Bayjanov, E. Majoor, R. J. Willems, M. J. Bonten, H. Schmitt et W. van Schaik. 2018. "Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system." *FEMS Microbiology Ecology* 94 (7). https://doi.org/10.1093/femsec/fiy087.

Buelow, E., A. Rico, M. Gaschet, J. Lourenço, S. P. Kennedy, L. Wiest, M.-C. Ploy et C. 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: 100045. https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100045.

Buffet-Bataillon, S., P. Tattevin, J. Y. Maillard, M. Bonnaure-Mallet et A. Jolivet-Gougeon. 2016. "Efflux pump induction by quaternary ammonium compounds and fluoroquinolone resistance in bacteria." *Future Microbiol* 11 (1): 81-92. https://doi.org/10.2217/fmb.15.131.

Calero-Cáceres, W. et J. L. Balcázar. 2019. "Antibiotic resistance genes in bacteriophages from diverse marine habitats." *Science of The Total Environment* 654: 452-455. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.166.

Camilleri, J., R. Baudot, L. Wiest, E. Vulliet, C. Cren-Olivé et G. Daniele. 2015. "Multiresidue fully automated online SPE-HPLC-MS/MS method for the quantification of endocrine-disrupting and pharmaceutical compounds at trace level in surface water." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95 (1): 67-81. https://doi.org/10.1080/03067319.2014.983494.

Campardon, M., S. Loubier et S. Morardet. 2012. *L'irrigation en France. État des lieux 2010 et évolution.* Convention BSE-IRSTEA. http://irsteadoc.irstea.fr/exl-php/docs/PUB_DOC/30702/2012/ly2012-pub00037209__PDF.txt.

Canteón, R. 2009. "Antibiotic resistance genes from the environment: A perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting." *Clinical Microbiology and Infection* 15: 20-25. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x.

Cantón, R., J. M. González-Alba et J. C. Galán. 2012. "CTX-M enzymes: Origin and diffusion." *Frontiers in Microbiology* 3: 110-110. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110.

Capdeville, M.-J. 2011. "Études des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits "émergents" dans les systèmes aquatiques." Thèse de doctorat, Chimie analytique et environnement, Université de Bordeaux 1.

Caplin, J. L., G. W. Hanlon et H. D. Taylor. 2008. "Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England." *Environmental Microbiology* 10 (4): 885-892. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01507.x.

Carattoli, A. 2013. "Plasmids and the spread of resistance." *International Journal of Medical Microbiology* 303 (6): 298-304. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001.

Carey, D. E. et P. J. McNamara. 2014. "The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment." *Frontiers in Microbiology* 5 (DEC). https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00780.

Carlet, J. et P. Le Coz. 2015. *Propositions du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques - Tous ensemble, sauvons les antibiotiques.* https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_antibiotiques.pdf.

Cassini, A., L. D. Högberg, D. Plachouras, A. Quattrocchi, A. Hoxha, G. S. Simonsen, M. Colomb-Cotinat, M. E. Kretzschmar, B. Devleesschauwer, M. Cecchini, D. A. Ouakrim, T. C. Oliveira, M. J. Struelens, C. Suetens, D. L. Monnet, R. Strauss, K. Mertens, T. Struyf, B. Catry, K. Latour, I. N. Ivanov, E. G. Dobreva, A. Tambic Andraševic, S. Soprek, A. Budimir, N. Paphitou, H. Žemlicková, S. Schytte Olsen, U. Wolff Sönksen, P. Märtin, M. Ivanova, O. Lyytikäinen, J. Jalava, B. Coignard, T. Eckmanns, M. Abu Sin, S. Haller, G. L. Daikos, A. Gikas, S. Tsiodras, F. Kontopidou, Á. Tóth, Á. Hajdu, Ó. Guólaugsson, K. G. Kristinsson, S. Murchan, K. Burns, P. Pezzotti, C. Gagliotti, U. Dumpis, A. Liuimiene, M. Perrin, M. A. Borg, S. C. de Greeff, J. C. M. Monen, M. B. G. Koek, P. Elstrøm, D. Zabicka, A. Deptula, W. Hryniewicz, M. Caniça, P. J. Nogueira, P. A. Fernandes, V. Manageiro, G. A. Popescu, R. I. Serban, E. Schréterová, S. Litvová, M. Štefkovicová, J. Kolman, I. Klavs, A. Korošec, B. Aracil, A. Asensio, M. Pérez-Vázquez, H. Billström, S. Larsson, J. S. Reilly, A. Johnson et S. Hopkins. 2019. "Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis." *The Lancet Infectious Diseases* 19 (1): 56-66. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4.

Cavé, L., E. Brothier, D. Abrouk, P. S. Bouda, E. Hien et S. Nazaret. 2016. "Efficiency and sensitivity of the digital droplet PCR for the quantification of antibiotic resistance genes in soils and organic residues." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (24): 10597-10608. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7950-5.

Cetecioglu, Z., B. Ince, S. Azman, N. Gokcek, N. Coskun et O. Ince. 2013. "Determination of anaerobic and anoxic biodegradation capacity of sulfamethoxazole and the effects on mixed microbial culture." Dans *Biodegradation - Engineering and Technology*, édité par Rolando Chamy.

Cha, J. M., S. Yang et K. H. Carlson. 2006. "Trace determination of β-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1115 (1): 46-57. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.086.

Chamosa, L. S., V. E. Alvarez, M. Nardelli, M. P. Quiroga, M. H. Cassini et D. Centron. 2017. "Lateral antimicrobial resistance genetic transfer is active in the open environment." *Scientific Reports* 7 (1): 513. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00600-2.

Changing Markets. 2017. *Traçabilité des antibiotiques en France - Antibiorésistance, impacts environnementaux et sanitaires d'antibiotiques en provenance d'Inde.* http://changingmarkets.org/wp-content/uploads/2017/04/Marche_des_antibiotiques_France.pdf.

Chantemesse, B., L. Betelli, S. Solanas, F. Vienney, L. Bollache, A. Hartmann et M. Rochelet. 2017. "A nitrocefin-based amperometric assay for the rapid quantification of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewaters." *Water Research* 109: 375-381. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.066.

Charuaud, L., E. Jardé, A. Jaffrézic, M. Liotaud, Q. Goyat, F. Mercier et B. Le Bot. 2019. "Veterinary pharmaceutical residues in water resources and tap water in an intensive husbandry area in France." *Science of The Total Environment* 664: 605-615. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.303.

Charuaud, L., E. Jardé et B. Le Bot. 2019. *Rapport final du projet EXPO-VETO : Résidus de médicaments vétérinaires dans les eaux destinées à la consommation humaine : cas de bassins versants bretons.* https://professionnels.afbiodiversite.fr/sites/default/files/2019-08/Rapport%20final%20du%20projet%20EXPO%20VETO%20%C3%A0%20destination%20de%20l%27AFB.pdf.

Chen, F., G.-G. Ying, L.-X. Kong, L. Wang, J.-L. Zhao, L.-J. Zhou et L.-J. Zhang. 2011. "Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China." *Environmental Pollution* 159 (6): 1490-1498. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.016.

Chen, J., X. Jiang, T. Tong, S. Miao, J. Huang et S. Xie. 2019. "Sulfadiazine degradation in soils: Dynamics, functional gene, antibiotic resistance genes and microbial community." *Science of The Total Environment* 691: 1072-1081. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.230.

Chen, J. et S. Xie. 2018. "Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms." *Science of The Total Environment* 640-641: 1465-1477. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.016.

Chen, Z., Y. Zhang, Y. Gao, S. A. Boyd, D. Zhu et H. Li. 2015. "Influence of dissolved organic matter on tetracycline bioavailability to an antibiotic-resistant bacterium." *Environmental Science and Technology* 49 (18): 10903-10910. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02158.

Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, M.-L. Dillmann et H. Brüssow. 2004. "Phage-host interaction: An ecological perspective." *Journal of Bacteriology* 186 (12): 3677-3686. https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3677-3686.2004.

Chiffre, A., F. Degiorgi, A. Buleté, L. Spinner et P. M. 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: 25427-25441. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7751-5.

Chiou, C. 2002. "Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems." édité par John Wiley & Sons, 257.

Chonova, T., F. Keck, J. Labanowski, B. Montuelle, F. Rimet et A. Bouchez. 2016. "Separate treatment of hospital and urban wastewaters: A real scale comparison of effluents and their effect on microbial communities." *Science of The Total Environment* 542: 965-975. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.161.

Chonova, T., J. Labanowski, B. Cournoyer, C. Chardon, F. Keck, E. Laurent, L. Mondamert, V. Vasselon, L. Wiest et A. Bouchez. 2018. "River biofilm community changes related to pharmaceutical loads emitted by a wastewater treatment plant." *Environmental Science and Pollution Research* 25: 9254-9264. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0024-0.

Chow, L. K. M., T. M. Ghaly et M. R. Gillings. 2021. "A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment." *Journal of Environmental Sciences* 99: 21-27. https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.05.030.

Christensen, E. G., L. Gram et V. G. Kastbjerg. 2011. "Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (9): 4064-4071. https://doi.org/10.1128/aac.00460-11.

Christian, T., R. J. Schneider, H. A. Färber, D. Skutlarek, M. T. Meyer et H. E. Goldbach. 2003. "Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters." *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31 (1): 36-44. https://doi.org/10.1002/aheh.200390014.

Chu, B. T. T., M. L. Petrovich, A. Chaudhary, D. Wright, B. Murphy, G. Wells et R. Poretsky. 2018. "Metagenomics reveals the impact of wastewater treatment plants on the dispersal of microorganisms and genes in aquatic sediments." *Applied and Environmental Microbiology* 84 (5): e02168-17. https://doi.org/10.1128/aem.02168-17.

Chuanchuen, R., K. L. Beinlich, T. T. Hoang, A. Becker, R. R. Karkhoffschweizer et H. P. Schweizer. 2001. "Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: Exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxb mutants overexpressing mexcd-oprj." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (2): 428-432.

Coetsier, C. M., S. Spinelli, L. Lin, B. Roig et E. Touraud. 2009. "Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs?" *Environment International* 35: 787-792. https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.008.

Colavecchio, A., B. Cadieux, A. Lo et L. D. Goodridge. 2017. "Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the *Enterobacteriaceae* family - A review." *Frontiers in Microbiology* 8: 1108-1108. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108.

Collignon, P., J. J. Beggs, T. R. Walsh, S. Gandra et R. Laxminarayan. 2018. "Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: A univariate and multivariable analysis." *The Lancet Planetary Health* 2 (9): e398-e405. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4.

Colomb-Cotinat, M., J. Lacoste, B. Coignard, S. Vaux, C. Brun-Buisson et V. Jarlie. Juin 2015 2015. *Morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France en 2012 - Étude Burden BMR.* Institut de veille sanitaire (Saint-Maurice). http://avibep.org/wp-content/uploads/2019/09/Etude-Burden-BMR.pdf.

Colombo, S., S. Arioli, E. Neri, G. Della Scala, G. Gargari et D. Mora. 2017. "Viromes as genetic reservoir for the microbial communities in aquatic environments: A focus on antimicrobial-resistance genes." *Frontiers in Microbiology* 8: 1095-1095. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01095.

Combalbert, S., J. Capdeville, A. M. Pourcher, H. Budzinski, P. Dabert, N. Bernet et G. Hernandez-Raquet. 2010. "Impact des systèmes de traitement du lisier dans le transfert des perturbateurs endocriniens et des antibiotiques vers l'environnement naturel." 42èmes Journées de la Recherche Porcine, Paris, France.

Comité interministériel pour la santé. 2016. Feuille de route interministérielle de maîtrise de l'antibiorésistance.

Commission Européenne. 2017. Plan d'action européen fondé sur le principe « Une seule santé » pour combattre la résistance aux antimicrobiens.

Copitch, J. L., R. N. Whitehead et M. A. Webber. 2010. "Prevalence of decreased susceptibility to triclosan in *Salmonella enterica* isolates from animals and humans and association with multiple drug resistance." *International journal of antimicrobial agents* 36 (3): 247-251.

Cordero, O. X., H. Wildschutte, B. Kirkup, S. Proehl, L. Ngo, F. Hussain, F. Le Roux, T. Mincer et M. F. Polz. 2012. "Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance." *Science* 337 (6099): 1228-1231. https://doi.org/10.1126/science.1219385.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber et H. M. Lappin-Scott. 1995. "Microbials biofilms." *Annual Review of Microbiology* 49 (1): 711-745. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

Cotinet, P., D. Heddadj, A. M. Pourcher, P. Dabert, P. Y. Communal, A. Jadas-Hécart, R. Maurice et I. Kempf. 2011. "Projet ANR " EVALUFQ-VOL " : Impact de l'épandage de fumier de volailles sur les transferts de bactéries et d'antibiotiques vers le milieu aquatique." 9èmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, France.

Crofts, T. S., B. Wang, A. Spivak, T. A. Gianoulis, K. J. Forsberg, M. K. Gibson, L. A. Johnsky, S. M. Broomall, C. N. Rosenzweig, E. W. Skowronski, H. S. Gibbons, M. O. A. Sommer et G. Dantas. 2018. "Shared strategies for β-lactam catabolism in the soil microbiome." *Nature Chemical Biology* 14 (6): 556-564. https://doi.org/10.1038/s41589-018-0052-1.

Curtis, T. P., W. T. Sloan et J. W. Scannell. 2002. "Estimating prokaryotic diversity and its limits." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10494-10499. https://doi.org/10.1073/pnas.142680199.

Czekalski, N., R. Sigdel, J. Birtel, B. Matthews et H. Bürgmann. 2015. "Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes." *Environment International* 81: 45-55. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005.

D'Angelo, E. et D. Starnes. 2016. "Desorption kinetics of ciprofloxacin in municipal biosolids determined by diffusion gradient in thin films." *Chemosphere* 164: 215-224. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.101.

D'Costa, V. M., C. E. King, L. Kalan, M. Morar, W. W. L. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G. B. Golding, H. N. Poinar et G. D. Wright. 2011. "Antibiotic resistance is ancient." *Nature* 477: 457. https://doi.org/10.1038/nature10388.

Da Re, S., F. Garnier, E. Guérin, S. Campoy, F. Denis et M.-C. Ploy. 2009. "The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression." *EMBO reports* 10 (8): 929-933. https://doi.org/10.1038/embor.2009.99.

Da Re, S. et M.-C. Ploy. 2012. "Antibiotiques et réponse SOS bactérienne." *Médecine/Sciences* 28 (2): 179-184. https://doi.org/10.1051/medsci/2012282016.

Dantas, G. et M. O. A. Sommer. 2012. "Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes." *Current Opinion in Microbiology* 15 (5): 577-582. https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.07.004.

Data.gouv.fr. 2019. CORINE Land Cover - Occupation des sols en France.

Davies, J. et K. S. Ryan. 2012. "Introducing the parvome: Bioactive compounds in the microbial world." *ACS Chemical Biology* 7 (2): 252-259. https://doi.org/10.1021/cb200337h.

Davies, J., G. B. Spiegelman et G. Yim. 2006. "The world of subinhibitory antibiotic concentrations." *Current Opinion in Microbiology* 9 (5): 445-453. https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006.

de Been, M., V. F. Lanza, M. de Toro, J. Scharringa, W. Dohmen, Y. Du, J. Hu, Y. Lei, N. Li, A. Tooming-Klunderud, D. J. J. Heederik, A. C. Fluit, M. J. M. Bonten, R. J. L. Willems, F. de la Cruz et W. van Schaik. 2014. "Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages." *PLoS Genetics* 10 (12): e1004776-e1004776. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004776.

Demanèche, S., H. Sanguin, J. Poté, E. Navarro, D. Bernillon, P. Mavingui, W. Wildi, T. M. Vogel et P. Simonet. 2008. "Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (10): 3957-3962. https://doi.org/10.1073/pnas.0800072105.

Denet, E., B. Coupat-Goutaland, S. Nazaret, M. Pélandakis et S. Favre-Bonté. 2017. "Diversity of free-living *amoebae* in soils and their associated human opportunistic bacteria." *Parasitology Research* 116 (11): 3151-3162. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5632-6.

Deredjian, A., N. Alliot, L. Blanchard, E. Brothier, M. Anane, P. Cambier, C. Jolivet, M. N. Khelil, S. Nazaret, N. Saby, J. Thioulouse et S. Favre-Bonte. 2016. "Occurrence of *Stenotrophomonas maltophilia* in agricultural soils and antibiotic resistance properties." *Research in Microbiology* 167 (4): 313-324. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.01.001.

Deredjian, A., C. Colinon, E. Brothier, S. Favre-Bonte, B. Cournoyer et S. Nazaret. 2011. "Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*." *Research in Microbiology* 162 (7): 689-700. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.007.

Desneux, J., M. Chemaly et A.-M. Pourcher. 2015. "Experimental design for the optimization of propidium monoazide treatment to quantify viable and non-viable bacteria in piggery effluents." *BMC Microbiology* 15 (1): 164. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0505-6.

Devarajan, N., A. Laffite, N. D. Graham, M. Meijer, K. Prabakar, J. I. Mubedi, V. Elongo, P. T. Mpiana, B. W. Ibelings, W. Wildi et J. Poté. 2015. "Accumulation of clinically relevant antibiotic-resistance genes, bacterial load, and metals in freshwater lake sediments in central europe." *Environmental Science and Technology* 49 (11): 6528-6537. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01031.

Diallo, A. A., H. Brugère, M. Kérourédan, V. Dupouy, P.-L. Toutain, A. Bousquet-Mélou, E. Oswald et D. Bibbal. 2013. "Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater." *Water Research* 47 (13): 4719-4729. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.047.

Díaz-Cruz, M. S., M. a. J. López de Alda et D. Barceló. 2003. "Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (6): 340-351. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00603-4.

Dickens, A. L., D. M. O'Sullivan, S. Basu, S. H. Gillespie et T. D. McHugh. 2005. "Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (2): 344-348. https://doi.org/10.1093/jac/dki191.

Dickinson, A. W., A. Power, M. G. Hansen, K. K. Brandt, G. Piliposian, P. Appleby, P. A. O'Neill, R. T. Jones, P. Sierocinski, B. Koskella et M. Vos. 2019. "Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach." *Environment International* 132. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105117.

Dimitriu, T., C. Lotton, J. Bénard-Capelle, D. Misevic, S. P. Brown, A. B. Lindner et F. Taddei. 2014. "Genetic information transfer promotes cooperation in bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (30): 11103-11108. https://doi.org/10.1073/pnas.1406840111.

Dinh, Q. T. 2012. "Transferts et comportements d'antibiotiques à l'échelle du bassin versant élémentaire." Thèse de doctorat, Ecole pratiques des hautes études, Université Pierre et Marie Curie.

Dinh, Q. T., F. Alliot, E. Moreau-Guigon, J. Eurin, M. Chevreuil et P. Labadie. 2011. "Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS." *Talanta* 85 (3): 1238-45. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.013.

Dinh, Q. T., E. Moreau-Guigon, P. Labadie, F. Alliot, M. J. Teil, M. Blanchard et M. Chevreuil. 2017a. "Occurrence of antibiotics in rural catchments." *Chemosphere* 168: 483-490. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.106.

Dinh, Q. T., E. Moreau-Guigon, P. Labadie, F. Alliot, M. J. Teil, M. Blanchard, J. Eurin et M. Chevreuil. 2017b. "Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network." *Science of The Total Environment* 575: 758-766. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.118.

Dinh, Q. T., T. A. Nguyen, E. Moreau-Guigon, F. Alliot, M.-J. Teil, M. Blanchard et M. Chevreuil. 2017c. "Trace-level determination of oxolinic acid and flumequine in soil, river bed sediment, and river water using microwave-assisted extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection." *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 26 (3): 247-258. https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1276154.

Dörr, T., K. Lewis et M. Vulić. 2009. "SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*." *PLoS Genetics* 5 (12): e1000760. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760.

Drieux, L., S. Haenn, L. Moulin et V. Jarlier. 2016. "Quantitative evaluation of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the wastewater of a French teaching hospital and relation to patient strain." *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 5 (1): 9. https://doi.org/10.1186/s13756-016-0108-5.

Dupouy, V., B. Doublet, N. Arpaillange, K. Praud, D. Bibbal, H. Brugère, E. Oswald, A. Cloeckaert, P.-L. Toutain et A. Bousquet-Mélou. 2016. "Dominant plasmids carrying extended-spectrum β-lactamases blaCTX-M genes in genetically diverse *Escherichia coli* from slaughterhouse and urban wastewaters." *Environmental Microbiology Reports* 8 (5): 789-797. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12440.

Dussart-Baptista, L., N. Massei, J. P. Dupont et T. Jouenne. 2003. "Transfer of bacteria-contaminated particles in a karst aquifer: Evolution of contaminated materials from a sinkhole to a spring." *Journal of Hydrology* 284 (1): 285-295. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2003.08.007.

EASAC. 2018. *Extreme weather events in Europe - Preparing for climate change adaptation: an update on EASAC's 2013 study.* European Academies Science Advisory Council (Halle, Allemagne). https://easac.eu/fileadmin/PDF_s/reports_statements/Extreme_Weather/EASAC_Statement_Extreme_Weather_Events_March_2018_FINAL.pdf.

EauFrance. 2019a. "Les lacs, étangs et autres plans d'eau." Consulté le 17 septembre 2019. https://www.eaufrance.fr/les-lacs-etangs-et-autres-plans-deau.

EauFrance. 2019b. "Les rivières." Dernière mise à jour 11 avril 2019. Consulté le 17 septembre 2019. https://www.eaufrance.fr/les-rivieres.

EauFrance. 2019c. *Observatoire des services publics d'eau et d'assainissement - Panorama des services et de leur performance en 2016.*

ECDC, EFSA et EMA. 2017. "ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals." *EFSA Journal* 15 (10): 5017.

Elseviers, M. M., M. Ferech, R. H. Vander Stichele, H. Goossens et E. p. 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): 115-123. https://doi.org/10.1002/pds.1244.

Engström, E., R. Thunvik, R. Kulabako et B. Balfors. 2015. "Water transport, retention, and survival of *Escherichia coli* in unsaturated porous media: A comprehensive review of processes, models, and factors." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 45 (1): 1-100. https://doi.org/10.1080/10643389.2013.828363.

Ericson, J. F. 2007. "An evaluation of the OECD 308 water/sediment systems for investigating the biodegradation of pharmaceuticals." *Environmental Science and Technology* 41 (16): 5803-5811. https://doi.org/10.1021/es063043+.

Escudero, J. A., C. Loot et D. Mazel. 2018. "Integrons as adaptive devices." Dans *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution*, édité par Pabulo H. Rampelotto, 199-239. Springer, Cham.

Fairbairn, D. J., M. E. Karpuzcu, W. A. Arnold, B. L. Barber, E. F. Kaufenberg, W. C. Koskinen, P. J. Novak, P. J. Rice et D. L. Swackhamer. 2016. "Sources and transport of contaminants of emerging concern: A two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed." *Science of The Total Environment* 551-552: 605-613. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.056.

Fajardo, A. et J. L. Martínez. 2008. "Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses." *Current Opinion in Microbiology* 11 (2): 161-167. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.006.

FAO-OMS. 2018. *FAO/WHO expert meeting on foodborne antimicrobial resistance: Role of environment, crops and biocides - Summary report.* Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Organisation mondiale de la santé.

Feitosa-Felizzola, J. et S. Chiron. 2009. "Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France)." *Journal of Hydrology* 364: 50-57. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.10.006.

Fekadu, S., E. Alemayehu, R. Dewil et B. Van der Bruggen. 2019. "Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge." *Science of The Total Environment* 654: 324-337. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072.

Ferrario, C., G. Alessandri, L. Mancabelli, E. Gering, M. Mangifesta, C. Milani, G. A. Lugli, A. Viappiani, S. Duranti, F. Turroni, M. C. Ossiprandi, R. Hiyashi, R. Mackie, D. van Sinderen et M. Ventura. 2017. "Untangling the cecal microbiota of feral chickens by culturomic and metagenomic analyses." *Environmental Microbiology* 19 (11): 4771-4783. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13943.

Figueroa, R. A., A. Leonard et A. A. MacKay. 2004. "Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays." *Environmental Science and Technology* 38 (2): 476-483. https://doi.org/10.1021/es0342087.

Figueroa, R. A. et A. A. MacKay. 2005. "Sorption of oxytetracycline to iron oxides and iron oxide-rich soils." *Environmental Science and Technology* 39 (17): 6664-6671. https://doi.org/10.1021/es048044l.

Fischbach, M. A. et C. T. Walsh. 2009. "Antibiotics for emerging pathogens." *Science* 325 (5944): 1089-1093. https://doi.org/10.1126/science.1176667.

Fisher, R. A., B. Gollan et S. Helaine. 2017. "Persistent bacterial infections and persister cells." *Nature Reviews Microbiology* 15 (8): 453-464. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42.

Flemming, H.-C. et J. Wingender. 2010. "The biofilm matrix." *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623-633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415.

Flemming, H.-C. et S. Wuertz. 2019. "Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms." *Nature Reviews Microbiology* 17 (4): 247-260. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9.

Focazio, M. J., D. W. Kolpin, K. K. Barnes, E. T. Furlong, M. T. Meyer, S. D. Zaugg, L. B. Barber et M. E. Thurman. 2008. "A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources." *Science of The Total Environment* 402 (2-3): 201-216. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.021.

Forsberg, K. J., A. Reyes, B. Wang, E. M. Selleck, M. O. A. Sommer et G. Dantas. 2012. "The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens." *Science* 337 (6098): 1107-1111. https://doi.org/10.1126/science.1220761.

Foti, M., C. Giacopello, T. Bottari, V. Fisichella, D. Rinaldo et C. Mammina. 2009. "Antibiotic resistance of Gram negatives isolates from ioggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea." *Marine Pollution Bulletin* 58 (9): 1363-1366. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.020.

Foti, M., A. Mascetti, V. Fisichella, E. Fulco, B. M. Orlandella et F. Lo Piccolo. 2017. "Antibiotic resistance assessment in bacteria isolated in migratory Passeriformes transiting through the Metaponto territory (Basilicata, Italy)." *Avian Research* 8 (1): 26. https://doi.org/10.1186/s40657-017-0085-2.

Fouhy, F., A. G. Clooney, C. Stanton, M. J. Claesson et P. D. Cotter. 2016. "16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform." *BMC Microbiology* 16 (1): 123. https://doi.org/10.1186/s12866-016-0738-z.

Fournier, M., N. Massei, M. Bakalowicz, L. Dussart-Baptista, J. Rodet et J. P. Dupont. 2007. "Using turbidity dynamics and geochemical variability as a tool for understanding the behavior and vulnerability of a karst aquifer." *Hydrogeology Journal* 15 (4): 689-704. https://doi.org/10.1007/s10040-006-0116-2.

FranceAgrimer. 2020. Pêche et aquaculture. Dans *Les fiches de FranceAgriMer - Fiche filière*.

Frey-Klett, P., P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka et A. Sarniguet. 2011. "Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (4): 583-609. https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11.

Furness, L. E., A. Campbell, L. Zhang, W. H. Gaze et R. A. McDonald. 2017. "Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance." *Environmental Research* 154: 28-34. https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014.

Gaillot, B. et P. Lavarde. 2015. *Les épandages sur terres agricoles des matières fertilisantes d'origine résiduaire - Mission prospective sur les modalités d'encadrement et de suivi réglementaire.* Conseil général de l'Environnement et du développement durable et Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux. https://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/cgaaer_14074_2015_rapport.pdf.

Gallego, S. et F. Martin-Laurent. 2020. "Impact of PhACs on soil microorganisms." Dans *The Handbook of Environmental Chemistry*, 1-44. Berlin, Heidelberg: Springer.

Galvin, S., F. Boyle, P. Hickey, A. Vellinga, D. Morris et M. Cormican. 2010. "Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (14): 4772-4779. https://doi.org/10.1128/AEM.02898-09.

Gantzhorn, M. R., J. E. Olsen et L. E. Thomsen. 2015. "Importance of sigma factor mutations in increased triclosan resistance in *Salmonella Typhimurium*." *BMC Microbiology* 15: 105. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0444-2.

Gao, L., Y. Shi, W. Li, J. Liu et Y. Cai. 2012. "Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe River in China." *Journal of Environmental Monitoring* 14 (4): 1248-55. https://doi.org/10.1039/c2em10916f.

Garcia-Armisen, T., A. Anzil, P. Cornelis, M. Chevreuil et P. Servais. 2013. "Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers: Insights into the cultivation bias." *Water Research* 47 (14): 4938-4947. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.036.

Garcia-Armisen, T. et P. Servais. 2004. "Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization." *Journal of Microbiological Methods* 58 (2): 269-279. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.014.

Gaze, W. H., N. Abdouslam, P. M. Hawkey et E. M. Wellington. 2005. "Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (5): 1802-7.

George, I., A. Anzil et P. Servais. 2004. "Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching." *Water Research* 38 (3): 611-618. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.022.

Gibs, J., H. A. Heckathorn, M. T. Meyer, F. R. Klapinski, M. Alebus et R. L. Lippincott. 2013. "Occurrence and partitioning of antibiotic compounds found in the water column and bottom sediments from a stream receiving two wastewater treatment plant effluents in Northern New Jersey, 2008." *Science of The Total Environment* 458-460: 107-116. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.076.

Gillings, M. R. 2013. "Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome." *Frontiers in Microbiology* 4: 4-4. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00004.

Gillings, M. R., W. H. Gaze, A. Pruden, K. Smalla, J. M. Tiedje et Y.-G. Zhu. 2014. "Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution." *The ISME Journal* 9: 1269. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226.

Gilmore, B. F. 2012. "Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges." *Expert Review of Anti-infective Therapy* 10 (5): 533-535. https://doi.org/10.1586/eri.12.30.

Glaeser, S. P., O. Sowinsky, J. S. Brunner, W. Dott et P. Kämpfer. 2016. "Cultivation of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant staphylococci from input and output samples of German biogas plants." *FEMS Microbiology Ecology* 92 (3). https://doi.org/10.1093/femsec/fiw010.

Gogarten, J. P. et J. P. Townsend. 2005. "Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution." *Nature Reviews Microbiology* 3: 679. https://doi.org/10.1038/nrmicro1204.

Goh, E.-B., G. Yim, W. Tsui, J. McClure, M. G. Surette et J. Davies. 2002. "Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (26): 17025-17030. https://doi.org/10.1073/pnas.252607699.

Golpayegani, A., M. Douraghi, F. Rezaei, M. Alimohammadi et R. N. Nodehi. 2019. "Propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction (PMA-qPCR) assay for rapid detection of viable and viable but non-culturable (VBNC) *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools." *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 17 (1): 407-416. https://doi.org/10.1007/s40201-019-00359-w.

Gordon, L., E. Giraud, J. P. Ganière, F. Armand, A. Bouju-Albert, N. De La Cotte, C. Mangion et H. Le Bris. 2007. "Antimicrobial resistance survey in a river receiving effluents from freshwater fish farms." *Journal of Applied Microbiology* 102 (4): 1167-1176. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03138.x.

Goulas, A., D. Belhadi, A. Descamps, A. Andremont, P. Benoit, S. Courtois, C. Dagot, N. Grall, D. Makowski, S. Nazaret, S. Nélieu, D. Patureau, F. Petit, C. Roose-Amsaleg, M. Vittecoq, B. Livoreil et C. Laouénan. 2020. "How effective are strategies to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review." *Environmental Evidence* 9 (1): 4. https://doi.org/10.1186/s13750-020-0187-x.

Goulas, A., B. Livoreil, N. Grall, P. Benoit, C. Couderc-Obert, C. Dagot, D. Patureau, F. Petit, C. Laouénan et A. Andremont. 2018a. "What are the effective solutions to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review protocol." *Environmental Evidence* 7 (1): 3. https://doi.org/10.1186/s13750-018-0118-2.

Goulas, A., L. Sabourin, F. Asghar, C. S. Haudin, P. Benoit et E. Topp. 2018b. "Explaining the accelerated degradation of ciprofloxacin, sulfamethazine, and erythromycin in different soil exposure scenarios by their aqueous extractability." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (16): 16236-16245. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1834-4.

Gouliouris, T., K. E. Raven, D. Moradigaravand, C. Ludden, F. Coll, B. Blane, P. Naydenova, C. Horner, N. M. Brown, J. Corander, D. Limmathurotsakul, J. Parkhill et S. J. Peacock. 2019. "Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital-adapted lineages in municipal wastewater treatment plants indicates widespread distribution and release into the environment." *Genome research* 29 (4): 626-634. https://doi.org/10.1101/gr.232629.117.

Graie, 14 février 2013, 2013, "Effluents hospitaliers et stations d'épuration urbaines : caractérisation, risques environnementaux et sanitaires, traitabilité - SIPIBEL."

Grall, N., O. Barraud, I. Wieder, A. Hua, M. Perrier, A. Babosan, M. Gaschet, O. Clermont, E. Denamur, F. Catzeflis, D. Decré, M.-C. Ploy et A. Andremont. 2015. "Lack of dissemination of acquired resistance to β-lactams in small wild mammals around an isolated village in the Amazonian forest." *Environmental Microbiology Reports* 7 (5): 698-708. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12289.

Gray, A. D., D. Todd et A. E. Hershey. 2020. "The seasonal distribution and concentration of antibiotics in rural streams and drinking wells in the piedmont of North Carolina." *Science of The Total Environment* 710: 136286. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136286.

Grenni, P., V. Ancona et A. Barra Caracciolo. 2018. "Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review." *Microchemical Journal* 136: 25-39. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006.

Gros, M., E. Marti, J. L. Balcázar, M. Boy-Roura, A. Busquets, J. Colón, A. Sànchez-Melsió, I. Lekunberri, C. M. Borrego, S. Ponsá et M. Petrovic. 2019. "Fate of pharmaceuticals and antibiotic resistance genes in a full-scale on-farm livestock waste treatment plant." *Journal of Hazardous Materials* 378: 120716. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.109.

Gu, C. et K. G. Karthikeyan. 2005a. "Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides." *Environmental Science and Technology* 39 (8): 2660-2667. https://doi.org/10.1021/es048603o.

Gu, C. et K. G. Karthikeyan. 2005b. "Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides." *Environmental Science and Technology* 39 (23): 9166-9173. https://doi.org/10.1021/es051109f.

Gu, C., K. G. Karthikeyan, S. D. Sibley et J. A. Pedersen. 2007. "Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid." *Chemosphere* 66 (8): 1494-1501. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.028.

Guerin, É., G. Cambray, N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, I. Erill, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, J. Barbé, M.-C. Ploy et D. Mazel. 2009. "The SOS response controls integron recombination." *Science* 324 (5930): 1034-1034. https://doi.org/10.1126/science.1172914.

Guibal, R., S. Lissalde, Y. Brizard et G. Guibaud. 2018. "Semi-continuous pharmaceutical and human tracer monitoring by POCIS sampling at the watershed-scale in an agricultural rural headwater river." *Journal of Hazardous Materials* 360: 106-114. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.106.

Guillon, A., N. Noyon, C. Gogot, S. Robert, A. Bruchet et M. Esperanza. 2015. "Study on veterinary and human antibiotics in raw and treated water from a French basin." *Water Science and Technology: Water Supply* 15 (6): 1275-1284. https://doi.org/10.2166/ws.2015.094.

Gullberg, E., L. M. Albrecht, C. Karlsson, L. Sandegren et D. I. Andersson. 2014. "Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals." *mBio* 5 (5): e01918-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01918-14.

Gullberg, E., S. Cao, O. G. Berg, C. Ilbäck, L. Sandegren, D. Hughes et D. I. Andersson. 2011. "Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations." *PLoS Pathogens* 7 (7): e1002158. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158.

Guyomard-Rabenirina, S., C. Dartron, M. Falord, S. Sadikalay, C. Ducat, V. Richard, S. Breurec, O. Gros et A. Talarmin. 2017. "Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe." *PLoS One* 12 (3): e0173155-e0173155. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173155.

Guzman, M., J. Dille et S. Godet. 2012. "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8 (1): 37-45. https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.007.

Habte, M. et M. Alexander. 1975. "Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil." *Applied Microbiology* 29 (2): 159-164.

Hamscher, G., H. T. Pawelzick, H. Höper et H. Nau. 2005. "Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (4): 861-8. https://doi.org/10.1897/04-182r.1.

Han, Y., Z. C. Zhou, L. Zhu, Y. Y. Wei, W. Q. Feng, L. Xu, Y. Liu, Z. J. Lin, X. Y. Shuai, Z. J. Zhang et H. Chen. 2019. "The impact and mechanism of quaternary ammonium compounds on the transmission of antibiotic resistance genes." *Environmental Science and Pollution Research* 26 (27): 28352-28360. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05673-2.

Harrison, E. Z. 2004. *Hygienic implications of small-scale composting in New York state - Final report of the Cold Compost Project.* The Cornell Waste Management Institute (Ithaca, NY).

Hartmann, A., L. Amoureux, A. Locatelli, G. Depret, C. Jolivet, E. Gueneau et C. Neuwirth. 2012. "Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy Region)." *Frontiers in Microbiology* 3 (83). https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00083.

Hendriksen, R. S., P. Munk, P. Njage, B. van Bunnik, L. McNally, O. Lukjancenko, T. Röder, D. Nieuwenhuijse, S. K. Pedersen, J. Kjeldgaard, R. S. Kaas, P. T. L. C. Clausen, J. K. Vogt, P. Leekitcharoenphon, M. G. M. van de Schans, T. Zuidema, A. M. de Roda Husman, S. Rasmussen, B. Petersen, A. Bego, C. Rees, S. Cassar, K. Coventry, P. Collignon, F. Allerberger, T. O. Rahube, G. Oliveira, I. Ivanov, Y. Vuthy, T. Sopheak, C. K. Yost, C. Ke, H. Zheng, L. Baisheng, X. Jiao, P. Donado-Godoy, K. J. Coulibaly, M. Jergović, J. Hrenovic, R. Karpíšková, J. E. Villacis, M. Legesse, T. Eguale, A. Heikinheimo, L. Malania, A. Nitsche, A. Brinkmann, C. K. S. Saba, B. Kocsis, N. Solymosi, T. R. Thorsteinsdottir, A. M. Hatha, M. Alebouyeh, D. Morris, M. Cormican, L. O'Connor, J. Moran-Gilad, P. Alba, A. Battisti, Z. Shakenova, C. Kiiyukia, E. Ng'eno, L. Raka, J. Avsejenko, A. Bērziņš, V. Bartkevics, C. Penny, H. Rajandas, S. Parimannan, M. V. Haber, P. Pal, G.-J. Jeunen, N. Gemmell, K. Fashae, R. Holmstad, R. Hasan, S. Shakoor, M. L. Z. Rojas, D. Wasyl, G. Bosevska, M. Kochubovski, C. Radu, A. Gassama, V. Radosavljevic, S. Wuertz, R. Zuniga-Montanez, M. Y. F. Tay, D. Gavačová, K. Pastuchova, P. Truska, M. Trkov, K. Esterhuyse, K. Keddy, M. Cerdà-Cuéllar, S. Pathirage, L. Norrgren, S. Örn, D. G. J. Larsson, T. V. d. Heijden, H. H. Kumburu, B. Sanneh, P. Bidjada, B.-M. Njanpop-Lafourcade, S. C. Nikiema-Pessinaba, B. Levent, J. S. Meschke, N. K. Beck, C. D. Van, N. D. Phuc, D. M. N. Tran, G. Kwenda, D.-a. Tabo, A. L. Wester, S. Cuadros-Orellana, C. Amid, G. Cochrane, T. Sicheritz-Ponten, H. Schmitt, J. R. M. Alvarez, A. Aidara-Kane, S. J. Pamp, O. Lund, T. Hald, M. Woolhouse, M. P. Koopmans, H. Vigre, T. N. Petersen, F. M. Aarestrup et c. The Global Sewage Surveillance project. 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.

Henriot, C., D. Martak, Q. Cuenot, C. Loup, H. Masclaux, F. Gillet, X. Bertrand, D. Hocquet et G. Bornette. 2019. "Occurrence and ecological determinants of the contamination of floodplain wetlands with *Klebsiella pneumoniae* and pathogenic or antibiotic-resistant *Escherichia coli*." *FEMS Microbiology Ecology*. https://doi.org/10.1093/femsec/fiz097.

Henriques, I., M. Tacão, L. Leite, C. Fidalgo, S. Araújo, C. Oliveira et A. Alves. 2016. "Co-selection of antibiotic and metal(loid) resistance in gram-negative epiphytic bacteria from contaminated salt marshes." *Marine Pollution Bulletin* 109 (1): 427-434. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.031.

Hirte, K., B. Seiwert, G. Schüürmann et T. Reemtsma. 2016. "New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater." *Water Research* 88: 880-888. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.028.

Hissinger, P. 2017. "Quelle est la biodisponibilité du cuivre dans les sols viticoles ?" Plan National Dépérissement du Vignoble - Séminaire de recherche.

Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, M. J. MacCoss, Z. Zhang, R. A. Jones et S. I. Miller. 2005. "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." *Nature* 436: 1171. https://doi.org/10.1038/nature03912.

Holden, M. T. G., L.-Y. Hsu, K. Kurt, L. A. Weinert, A. E. Mather, S. R. Harris, B. Strommenger, F. Layer, W. Witte, H. de Lencastre, R. Skov, H. Westh, H. Zemlicková, G. Coombs, A. M. Kearns, R. L. R. Hill, J. Edgeworth, I. Gould, V. Gant, J. Cooke, G. F. Edwards, P. R. McAdam, K. E. Templeton, A. McCann, Z. Zhou, S. Castillo-Ramírez, E. J. Feil, L. O. Hudson, M. C. Enright, F. Balloux, D. M. Aanensen, B. G. Spratt, J. R. Fitzgerald, J. Parkhill, M. Achtman, S. D. Bentley et U. Nübel. 2013. "A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic." *Genome research* 23 (4): 653-664. https://doi.org/10.1101/gr.147710.112.

Honda, R., C. Tachi, K. Yasuda, T. Hirata, M. Noguchi, H. Hara-Yamamura, R. Yamamoto-Ikemoto et T. Watanabe. 2020. "Estimated discharge of antibiotic-resistant bacteria from combined sewer overflows of urban sewage system." *npj Clean Water* 3 (1): 15. https://doi.org/10.1038/s41545-020-0059-5.

Horner-Devine, M. C., K. M. Carney et B. J. M. Bohannan. 2004. "An ecological perspective on bacterial biodiversity." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271 (1535): 113-122. https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2549.

Huang, M., W. K. Rumbeiha, W. E. Braselton et M. Johnson. 2011. "Rapid and reliable identification of ionophore antibiotics in feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23 (2): 358-363. https://doi.org/10.1177/104063871102300229.

Huschek, G., P. D. Hansen, H. H. Maurer, D. Krengel et A. Kayser. 2004. "Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations." *Environmental Toxicology* 19 (3): 226-240. https://doi.org/10.1002/tox.20015.

IACG. 2019. *Pas le temps d'attendre : assurer l'avenir contre les infections résistantes aux médicaments - Rapport au sécrétaire général des nations unies.* UN Interagency coordination group on antimicrobial résistance. https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_FR.pdf.

iRCP - Anses/ANMV. 2019. Index des médicaments vétérinaires autorisés en France. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Agence nationale du médicament vétérinaire.

Jafari Ozumchelouei, E., A. H. Hamidian, Y. Zhang et M. Yang. 2020. "Physicochemical properties of antibiotics: A review with an emphasis on detection in the aquatic environment." *Water Environment Research* 92 (2): 177-188. https://doi.org/10.1002/wer.1237.

Jaffrezic, A., E. Jarde, A. Soulier, L. Carrera, E. Marengue, A. Cailleau et B. Le Bot. 2017. "Veterinary pharmaceutical contamination in mixed land use watersheds: From agricultural headwater to water monitoring watershed." *Science of The Total Environment* 609: 992-1000. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.206.

Jaimes-Correa, J. C., D. D. Snow et S. L. Bartelt-Hunt. 2015. "Seasonal occurrence of antibiotics and a beta agonist in an agriculturally-intensive watershed." *Environmental Pollution* 205: 87-96. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.023.

Jeannot, K., M. L. Sobel, F. El Garch, K. Poole et P. Plésiat. 2005. "Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction." *Journal of Bacteriology* 187 (15): 5341-5346. https://doi.org/10.1128/jb.187.15.5341-5346.2005.

Jechalke, S., C. Kopmann, I. Rosendahl, J. Groeneweg, V. Weichelt, E. Krögerrecklenfort, N. Brandes, M. Nordwig, G.-C. Ding, J. Siemens, H. Heuer et K. Smalla. 2013. "Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (5): 1704-1711. https://doi.org/10.1128/aem.03172-12.

Jefferson, K. K., D. A. Goldmann et G. B. Pier. 2005. "Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (6): 2467-2473. https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2467-2473.2005.

Ji, X., Q. Shen, F. Liu, J. Ma, G. Xu, Y. Wang et M. Wu. 2012. "Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China." *Journal of Hazardous Materials* 235-236: 178-185. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.040.

Jiang, M., L. Wang et R. Ji. 2010. "Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment." *Chemosphere* 80 (11): 1399-1405. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.048.

Jiang, X., M. M. H. Ellabaan, P. Charusanti, C. Munck, K. Blin, Y. Tong, T. Weber, M. O. A. Sommer et S. Y. Lee. 2017. "Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens." *Nature Communications* 8: 15784. https://doi.org/10.1038/ncomms15784.

Jin, X., D. Wu, J. Ling, C. Wang, C. Liu et C. Gu. 2019. "Hydrolysis of chloramphenicol catalyzed by clay minerals under nonaqueous conditions." *Environmental Science and Technology* 53 (18): 10645-10653. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02119.

Johnson, T. J. et L. K. Nolan. 2009. "Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73 (4): 750-774. https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-09.

Joigneaux, E. 2011. "Etat qualitatif des eaux de la nappe du Val d'Orléans : impact du changement climatique et gestion durable de la ressource." Thèse de doctorat, Université d'Orléans.

Joy, S. R., S. L. Bartelt-Hunt, D. D. Snow, J. E. Gilley, B. L. Woodbury, D. B. Parker, D. B. Marx et X. Li. 2013. "Fate and transport of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in soil and runoff following land application of swine manure slurry." *Environmental Science and Technology* 47 (21): 12081-8. https://doi.org/10.1021/es4026358.

Ju, F., K. Beck, X. Yin, A. Maccagnan, C. S. McArdell, H. P. Singer, D. R. Johnson, T. Zhang et H. 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): 346-360. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0277-8.

Jutkina, J., N. P. Marathe, C. F. Flach et D. G. J. Larsson. 2018. "Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations." *Science of The Total Environment* 616-617: 172-178. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.312.

Kandeler, E., D. Tscherko, K. D. Bruce, M. Stemmer, P. J. Hobbs, R. D. Bardgett et W. Amelung. 2000. "Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil." *Biology and Fertility of Soils* 32 (5): 390-400. https://doi.org/10.1007/s003740000268.

Karimi, B., N. Chemidlin Prévost-Bouré, S. Dequiedt, S. Terrat et L. Ranjard. 2018. *Atlas français des bactéries du sol*. Paris: Muséum national d'Histoire naturelle.

Karkman, A., K. Pärnänen et D. G. J. Larsson. 2019. "Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments." *Nature Communications* 10 (1): 80. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3.

Kay, P., P. A. Blackwell et A. B. A. Boxall. 2004. "Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil." *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (5): 1136-1144. https://doi.org/10.1897/03-374.

Keen, E. C., V. V. Bliskovsky, F. Malagon, J. D. Baker, J. S. Prince, J. S. Klaus et S. L. Adhya. 2017. "Novel "superspreader" bacteriophages promote horizontal gene transfer by transformation." *mBio* 8 (1): e02115-16. https://doi.org/10.1128/mBio.02115-16.

Kieffer, N., P. Nordmann et L. Poirel. 2017. "Moraxella species as potential sources of MCR-like polymyxin resistance determinants." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (6): e00129-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00129-17.

Kim, J.-S., N. Chowdhury, R. Yamasaki et T. K. Wood. 2018. "Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state." *Environmental Microbiology* 20 (6): 2038-2048. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14075.

Kim, K. R., G. Owens, Y. S. Ok, W. K. Park, D. B. Lee et S. I. Kwon. 2012. "Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting." *Waste Management* 32 (1): 110-6. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.07.026.

Kim, Y.-H. et C. E. Cerniglia. 2005. "Influence of erythromycin A on the microbial populations in aquaculture sediment microcosms." *Aquatic Toxicology* 73 (3): 230-241. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.013.

Kim, Y.-H., K. Pak, J. V. Pothuluri et C. E. Cerniglia. 2004a. "Mineralization of erythromycin A in aquaculture sediments." *FEMS Microbiology Letters* 234 (1): 169-175. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09529.x.

Kim, Y. H., T. M. Heinze, S. J. Kim et C. E. Cerniglia. 2004b. "Adsorption and clay-catalyzed degradation of erythromycin A on homoionic clays." *Journal of Environmental Quality* 33 (1): 257-64. https://doi.org/10.2134/jeq2004.2570.

Kivits, T., H. P. Broers, H. Beeltje, M. van Vliet et J. Griffioen. 2018. "Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming." *Environmental Pollution* 241: 988-998. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.085.

Klümper, U., M. Recker, L. Zhang, X. Yin, T. Zhang, A. Buckling et W. H. Gaze. 2019. "Selection for antimicrobial resistance is reduced when embedded in a natural microbial community." *The ISME Journal*. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0483-z.

Kmet, V., A. Cuvalova et M. Stanko. 2018. "Small mammals as sentinels of antimicrobial-resistant *staphylococci*." *Folia Microbiol (Praha)* 63 (5): 665-668. https://doi.org/10.1007/s12223-018-0594-3.

Kohanski, M. A., M. A. DePristo et J. J. Collins. 2010. "Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis." *Molecular Cell* 37 (3): 311-320. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003.

Kopmann, C., S. Jechalke, I. Rosendahl, J. Groeneweg, E. Krögerrecklenfort, U. Zimmerling, V. Weichelt, J. Siemens, W. Amelung, H. Heuer et K. Smalla. 2013. "Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil." *FEMS Microbiology Ecology* 83 (1): 125-134. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01458.x.

Korajkic, A., P. Wanjugi, L. Brooks, Y. Cao et V. J. Harwood. 2019. "Persistence and decay of fecal microbiota in aquatic habitats." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 83 (4): e00005-19. https://doi.org/10.1128/mmbr.00005-19.

Kreuzig, R., S. Höltge, J. Brunotte, N. Berenzen, J. Wogram et R. Schulz. 2005. "Test-plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (4): 777-81. https://doi.org/10.1897/04-019r.1.

Krumperman, P. H. 1983. "Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods." *Applied and Environmental Microbiology* 46 (1): 165-170.

Kulshrestha, P., R. F. Giese, Jr. et D. S. Aga. 2004. "Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: Insights on factors affecting its mobility in soil." *Environmental Science and Technology* 38 (15): 4097-105.

Kümmerer, K. 2004. "Resistance in the environment." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (2): 311-320. https://doi.org/10.1093/jac/dkh325.

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

Kwak, Y.-K., P. Colque, S. Byfors, C. G. Giske, R. Möllby et I. Kühn. 2015. "Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: Does it reflect the resistance trends in the society?" *International Journal of Antimicrobial Agents* 45 (1): 25-32. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.016.

Labadie, P., S. Alligant, T. Berthe, Hélène Budzinski, A. Bigot-Clivot, F. Collard, R. Dris, J. Gasperi, E. Guigon, F. Petit, V. Rocher, B. Tassin, R. Tramoy et R. Treilles. 2019. "Contaminants of emerging concern in the Seine River basin: Overview of recent research." Dans *The Seine River Basin, The Handbook of Environmental Chemistry*, 26. Berlin, Heidelberg: Springer.

Laforest-Lapointe, I. et B. K. Whitaker. 2019. "Decrypting the phyllosphere microbiota: Progress and challenges." *American Journal of Botany* 106 (2): 171-173. https://doi.org/10.1002/ajb2.1229.

Langsrud, S., G. Sundheim et A. L. Holck. 2004. "Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers." *Journal of Applied Microbiology* 96 (1): 201-208.

Lara-Martín, P. A., A. A. Renfro, J. K. Cochran et B. J. Brownawell. 2015. "Geochronologies of pharmaceuticals in a sewage-impacted estuarine urban setting (Jamaica Bay, New York)." *Environmental Science and Technology* 49 (10): 5948-5955. https://doi.org/10.1021/es506009v.

Lardy-Fontan, S., V. Brieudes, B. Lalere, P. Candido, G. Couturier, H. Budzinski et G. Lavison-Bompard. 2016. "For more reliable measurements of pharmaceuticals in the environment: Overall measurement uncertainty estimation, QA/QC implementation and metrological considerations. A case study on the Seine River." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 77: 76-86. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.011.

Laroche, E., B. Pawlak, T. Berthe, D. Skurnik et F. Petit. 2009. "Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France)." *FEMS Microbiology Ecology* 68 (1): 118-130. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00655.x.

Laroche, E., F. Petit, M. Fournier et B. Pawlak. 2010. "Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply." *Journal of Hydrology* 392 (1): 12-21. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.07.022.

Larsson, D. G. J. 2014. "Pollution from drug manufacturing: Review and perspectives." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1656): 20130571. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0571.

Larsson, D. G. J., C. de Pedro et N. Paxeus. 2007. "Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals." *Journal of Hazardous Materials* 148 (3): 751-755. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008.

Lastre-Acosta, A. M., B. Barberato, M. P. S. Parizi et A. C. S. C. Teixeira. 2019. "Direct and indirect photolysis of the antibiotic enoxacin: Kinetics of oxidation by reactive photo-induced species and simulations." *Environmental Science and Pollution Research* 26 (5): 4337-4347. https://doi.org/10.1007/s11356-018-2555-4.

Lau, C. H. F., K. van Engelen, S. Gordon, J. Renaud et E. Topp. 2017. "Novel antibiotic resistance determinants from agricultural soil exposed to antibiotics widely used in human medicine and animal farming." *Applied and Environmental Microbiology* 83 (16). https://doi.org/10.1128/AEM.00989-17.

Le Bouquin, S., S. Hanne-Poujade, R. Thomas, A. Courtois, S. Baron, M. Jamin et C. Chauvin. 2018. "Pathologies dominantes et pratiques sanitaires associées dans les pisciculturesde salmonidés d'eau douce en France " *TemA* 46: 49-56.

Le Bris, H., R. Dhaouadi, M. Naviner, E. Giraud, C. Mangion, F. Armand, N. De La Cotte, C. Thorin, J.-P. Ganière et H. Pouliquen. 2007. "Experimental approach on the selection and persistence of anti-microbial-resistant Aeromonads in faecal matter of rainbow trout during and after an oxolinic acid treatment." *Aquaculture* 273 (4): 416-422. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.034.

Le Devendec, L., G. Mourand, S. Bougeard, J. Léaustic, E. Jouy, A. Keita, W. Couet, N. Rousset et I. Kempf. 2016. "Impact of colistin sulfate treatment of broilers on the presence of resistant bacteria and resistance genes in stored or composted manure." *Veterinary Microbiology* 194: 98-106. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.012.

Leclercq, R., K. Oberlé, S. Galopin, V. Cattoir, H. Budzinski et F. Petit. 2013. "Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river continuum." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (7): 2428-2434. https://doi.org/10.1128/AEM.03586-12.

Leclercq, S. O., C. Wang, Z. Sui, H. Wu, B. Zhu, Y. Deng et J. 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.

Lee, K., D.-W. Kim, D.-H. Lee, Y.-S. Kim, J.-H. Bu, J.-H. Cha, C. N. Thawng, E.-M. Hwang, H. J. Seong, W. J. Sul, E. M. H. Wellington, C. Quince et C.-J. Cha. 2020. "Mobile resistome of human gut and pathogen drives anthropogenic bloom of antibiotic resistance." *Microbiome* 8 (1): 2. https://doi.org/10.1186/s40168-019-0774-7.

Lekunberri, I., J. Subirats, C. M. Borrego et J. L. Balcázar. 2017. "Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance." *Environmental Pollution* 220: 981-984. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059.

Leonard, A. F. C., L. Zhang, A. J. Balfour, R. Garside, P. M. Hawkey, A. K. Murray, O. C. Ukoumunne et W. 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: 326-333. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.003.

Lewis, G., A. Juhasz et E. Smith. 2012. "Environmental metabolites of fluoroquinolones: synthesis, fractionation and toxicological assessment of some biologically active metabolites of ciprofloxacin." *Environmental Science and Pollution Research* 19 (7): 2697-2707. https://doi.org/10.1007/s11356-012-0766-7.

Li, D., M. Yang, J. Hu, J. Zhang, R. Liu, X. Gu, Y. Zhang et Z. Wang. 2009. "Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river." *Environmental Microbiology* 11 (6): 1506-1517. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01878.x.

Li, D., T. Yu, Y. Zhang, M. Yang, Z. Li, M. Liu et R. Qi. 2010. "Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (11): 3444-3451. https://doi.org/10.1128/AEM.02964-09.

Li, J., L. J. Carter et A. B. A. Boxall. 2020. "Evaluation and development of models for estimating the sorption behaviour of pharmaceuticals in soils." *Journal of Hazardous Materials* 392: 122469. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122469.

Li, L.-G., Q. Huang, X. Yin et T. Zhang. 2020. "Source tracking of antibiotic resistance genes in the environment - Challenges, progress, and prospects." *Water Research* 185: 116127. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116127.

Li, L.-G., Y. Xia et T. Zhang. 2017. "Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection." *The ISME Journal* 11 (3): 651-662. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.155.

Li, W., Y. Shi, L. Gao, J. Liu et Y. Cai. 2012. "Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China." *Chemosphere* 89 (11): 1307-1315. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.079.

Li, W. C. 2014. "Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil." *Environmental Pollution* 187: 193-201. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015.

Li, X., C. Liu, Y. Chen, H. Huang et T. Ren. 2018. "Antibiotic residues in liquid manure from swine feedlot and their effects on nearby groundwater in regions of North China." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (12): 11565-11575. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1339-1.

Liebert, C. A., R. M. Hall et A. O. Summers. 1999. "Transposon Tn21, flagship of the floating genome." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (3): 507-522.

Lin, Y.-w., D. Li, A. Z. Gu, S.-y. Zeng et M. He. 2016. "Bacterial regrowth in water reclamation and distribution systems revealed by viable bacterial detection assays." *Chemosphere* 144: 2165-2174. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.071.

Lindow, S. E. et M. T. Brandl. 2003. "Microbiology of the phyllosphere." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1875-1883. https://doi.org/10.1128/aem.69.4.1875-1883.2003.

Lindqvist, N., T. Tuhkanen et L. Kronberg. 2005. "Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters." *Water Research* 39 (11): 2219-2228. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.003.

Liu, A., A. Fong, E. Becket, J. Yuan, C. Tamae, L. Medrano, M. Maiz, C. Wahba, C. Lee, K. Lee, K. P. Tran, H. Yang, R. M. Hoffman, A. Salih et J. H. Miller. 2011a. "Selective advantage of resistant strains at trace levels of antibiotics: A simple and ultrasensitive color test for detection of antibiotics and genotoxic agents." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (3): 1204-1210. https://doi.org/10.1128/aac.01182-10.

Liu, B., Y. Li, X. Zhang, J. Wang et M. Gao. 2014. "Combined effects of chlortetracycline and dissolved organic matter extracted from pig manure on the functional diversity of soil microbial community." *Soil Biology and Biochemistry* 74: 148-155. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.005.

Liu, S., T. G. Bekele, H. Zhao, X. Cai et J. Chen. 2018. "Bioaccumulation and tissue distribution of antibiotics in wild marine fish from Laizhou Bay, North China." *Science of The Total Environment* 631-632: 1398-1405. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.139.

Liu, S., H. Zhao, H. J. Lehmler, X. Cai et J. Chen. 2017a. "Antibiotic pollution in marine food webs in Laizhou Bay, North China: Trophodynamics and human exposure implication." *Environmental Science and Technology* 51 (4): 2392-2400. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04556.

Liu, W. J., L. Fu, M. Huang, J. P. Zhang, Y. Wu, Y. S. Zhou, J. Zeng et G. X. Wang. 2017b. "Frequency of antiseptic resistance genes and reduced susceptibility to biocides in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*." *Journal of Medical Microbiology* 66 (1): 13-17. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000403.

Liu, Y., X. Lu, F. Wu et N. Deng. 2011b. "Adsorption and photooxidation of pharmaceuticals and personal care products on clay minerals." *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* 104 (1): 61-73. https://doi.org/10.1007/s11144-011-0349-5.

Locey, K. J. et J. T. Lennon. 2016. "Scaling laws predict global microbial diversity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (21): 5970-5975. https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113.

Loeffler, D., A. Hatz, D. Albrecht, M. Fligg, J. Hogeback et T. A. Ternes. 2020. "Determination of non-extractable residues in soils: Towards a standardised approach." *Environmental Pollution* 259: 113826. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113826.

Loos, R., R. Carvalho, S. Comero, D. C. António, M. Ghiani, T. Lettieri, G. Locoro, B. Paracchini, S. Tavazzi, B. M. Gawlik, L. Blaha, B. Jarosova, S. Voorspoels, D. Schwesig, P. Haglund, J. Fick et O. Gans. 2012. *EU wide monitoring survey on waste water treatment plant effluents.* European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability.

Lopatek, M., K. Wieczorek et J. Osek. 2018. "Antimicrobial resistance, virulence factors, and genetic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood." *Applied and Environmental Microbiology* 84 (16): e00537-18. https://doi.org/10.1128/aem.00537-18.

Lopatkin, A. J., H. R. Meredith, J. K. Srimani, C. Pfeiffer, R. Durrett et L. You. 2017. "Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance." *Nature Communications* 8 (1): 1689. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01532-1.

Lopez, B., P. Ollivier, A. Togola, N. Baran et J. P. Ghestem. 2015. "Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants." *Science of The Total Environment* 518-519: 562-573. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.110.

Lopez, E., M. Elez, I. Matic et J. Blazquez. 2007. "Antibiotic-mediated recombination: Ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* 64 (1): 83-93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05642.x.

Lundström, S. V., M. Östman, J. Bengtsson-Palme, C. Rutgersson, M. Thoudal, T. Sircar, H. Blanck, K. M. Eriksson, M. Tysklind, C.-F. Flach et D. G. J. Larsson. 2016. "Minimal selective concentrations of tetracycline in complex aquatic bacterial biofilms." *Science of The Total Environment* 553: 587-595. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.103.

Luo, G., B. Li, L.-G. Li, T. Zhang et I. Angelidaki. 2017. "Antibiotic resistance genes and correlations with microbial community and metal resistance genes in full-scale biogas reactors as revealed by metagenomic analysis." *Environmental Science and Technology* 51 (7): 4069-4080. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05100.

Luo, Y., L. Xu, M. Rysz, Y. Wang, H. Zhang et P. J. Alvarez. 2011. "Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China." *Environmental Science and Technology* 45 (5): 1827-33. https://doi.org/10.1021/es104009s.

Mackay, D. et A. Fraser. 2000. "Kenneth Mellanby Review Award. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models." *Environ Pollut* 110 (3): 375-91. https://doi.org/S0269749100001627 [pii].

Mailler, R., J. Gasperi, Y. Coquet, S. Deshayes, S. Zedek, C. Cren-Olive, N. Cartiser, V. Eudes, A. Bressy, E. Caupos, R. Moilleron, G. Chebbo et V. Rocher. 2015. "Study of a large scale powdered activated carbon pilot: Removals of a wide range of emerging and priority micropollutants from wastewater treatment plant effluents." *Water Research* 72: 315-330. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.047.

Mailler, R., J. Gasperi, D. Patureau, E. Vulliet, N. Delgenes, A. Danel, S. Deshayes, V. Eudes, S. Guerin, R. Moilleron, G. Chebbo et V. Rocher. 2017. "Fate of emerging and priority micropollutants during the sewage sludge treatment: Case study of Paris conurbation. Part 1: Contamination of the different types of sewage sludge." *Waste Management* 59: 379-393. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.010.

Mallory, L. M., C. S. Yuk, L. N. Liang et M. Alexander. 1983. "Alternative prey: A mechanism for elimination of bacterial species by protozoa." *Applied and Environmental Microbiology* 46 (5): 1073-1079.

Manaia, C. M., G. Macedo, D. Fatta-Kassinos et O. C. Nunes. 2016. "Antibiotic resistance in urban aquatic environments: Can it be controlled?" *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (4): 1543-57. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7202-0.

Martak, D., C. P. Henriot, M. Broussier, C. Couchoud, B. Valot, M. Richard, J. Couchot, G. Bornette, D. Hocquet et X. Bertrand. 2020. "High prevalence of human-associated *Escherichia coli* in wetlands located in eastern France." *Frontiers in Microbiology* 11 (2200). https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.552566.

Marti, E., J. Jofre et J. L. Balcazar. 2013. "Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant." *PLoS One* 8 (10): e78906. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906.

Marti, R., Y.-C. Tien, R. Murray, A. Scott, L. Sabourin et E. Topp. 2014. "Safely coupling livestock and crop production systems: How rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure?" *Applied and Environmental Microbiology* 80 (10): 3258-3265. https://doi.org/10.1128/AEM.00231-14.

Martin-Laurent, F., R. Marti, N. Waglechner, G. D. Wright et E. Topp. 2014. "Draft genome sequence of the sulfonamide antibiotic-degrading *Microbacterium sp*. Strain C448." *Genome Announc* 2 (1). https://doi.org/10.1128/genomeA.01113-13.

Martin-Laurent, F., E. Topp, L. Billet, I. Batisson, C. Malandain, P. Besse-Hoggan, S. Morin, J. Artigas, C. Bonnineau, L. Kergoat, M. Devers-Lamrani et S. Pesce. 2019. "Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum." *Environmental Science and Pollution Research* 26 (18): 18930-18937. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05122-0.

Martínez, J. L., T. M. Coque et F. Baquero. 2014. "What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes." *Nature Reviews Microbiology* 13: 116. https://doi.org/10.1038/nrmicro3399.

Mattei, M. R., L. Frunzo, B. D'Acunto, Y. Pechaud, F. Pirozzi et G. Esposito. 2018. "Continuum and discrete approach in modeling biofilm development and structure: A review." *Journal of Mathematical Biology* 76 (4): 945-1003. https://doi.org/10.1007/s00285-017-1165-y.

McInerney, J. O., A. McNally et M. J. O'Connell. 2017. "Why prokaryotes have pangenomes." *Nature Microbiology* 2: 17040. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.40.

MEDDE. 2015. Feuille de route 2015 issue des trois tables rondes de la Conférence environnementale. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie.

MEDDE, ARMINES et BRGM. 2012. *Explore 2070 - Hydrologie souterraine - Résumé.* www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Resume_de_l_etude_et_principaux_points_a_retenir_en_quelques_pages.pdf.

Menció, A. et J. Mas-Pla. 2019. "Assessing the influence of environmental factors on groundwater antibiotic occurrence by means of variation partitioning." *Water* 11: 1495. https://doi.org/10.3390/w11071495.

Mendes, R., P. Garbeva et J. M. Raaijmakers. 2013. "The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms." *FEMS Microbiology Reviews* 37 (5): 634-663. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028.

Menz, J., J. Muller, O. Olsson et K. Kummerer. 2018. "Bioavailability of antibiotics at soil-water interfaces: A comparison of measured activities and equilibrium partitioning estimates." *Environmental Science and Technology* 52 (11): 6555-6564. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06329.

Meredith, H. R., J. K. Srimani, A. J. Lee, A. J. Lopatkin et L. You. 2015. "Collective antibiotic tolerance: Mechanisms, dynamics and intervention." *Nature Chemical Biology* 11: 182. https://doi.org/10.1038/nchembio.1754.

Metorg 2. 2012. *Les polluants métalliques et organiques dans les sédiments du bassin de la Loire : sources et évolution spatio-temporelle.* . Université de Poitiers/Université de Tours.

Middleton, J. H. et J. D. Salierno. 2013. "Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88: 79-88. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.025.

Milaković, M., G. Vestergaard, J. J. González-Plaza, I. Petrić, A. Šimatović, I. Senta, S. Kublik, M. Schloter, K. Smalla et N. Udiković-Kolić. 2019. "Pollution from azithromycin-manufacturing promotes macrolide-resistance gene propagation and induces spatial and seasonal bacterial community shifts in receiving river sediments." *Environment International* 123: 501-511. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.050.

Miller, T. H., N. R. Bury, S. F. Owen, J. I. MacRae et L. P. Barron. 2018. "A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna." *Environmental Pollution* 239: 129-146. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.012.

Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt. 2017. Ecoantibio^2 - Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire (2017 - 2021).

Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. 2020. *Surveillance sanitaire des denrées animales et végétales en France : bilan 2018 des plans de surveillance et de contrôle.* https://agriculture.gouv.fr/telecharger/106064?token=ee554f49881e9d421397f3aa4dd2b448edd597d1d5f063fc287c8597fe7d07af.

Ministère de la transition écologique et solidaire et Ministère des solidarités et de la santé. 2019. "Portail sur l'assainissement non collectif." Dernière mise à jour 23 août 2019. Consulté le 4 septembre 2019. www.assainissement-non-collectif.developpement-durable.gouv.fr/spip.php?page=archive_article&lang=fr.

Miquel, G. 2003. *Rapport sur « la qualité de l'eau et de l'assainissement en France ».* Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques.

Mitchell, S. M., J. L. Ullman, A. L. Teel et R. J. Watts. 2014. "pH and temperature effects on the hydrolysis of three β-lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin." *Science of The Total Environment* 466-467: 547-555. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.027.

Mitchell, S. M., J. L. Ullman, A. L. Teel et R. J. Watts. 2015. "Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin." *Chemosphere* 134: 504-511. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.050.

Mo, S. S., A. M. Urdahl, K. Madslien, M. Sunde, L. L. Nesse, J. S. Slettemeås et M. Norström. 2018. "What does the fox say? Monitoring antimicrobial resistance in the environment using wild red foxes as an indicator." *PLoS One* 13 (5): e0198019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198019.

Mokh, S. 2013. "Optimisation de techniques analytiques pour caractériser les antibiotiques dans les systèmes aquatiques." Thèse de doctorat, Chimie analytique et environnement, Université de Bordeaux 1.

Mompelat, S., A. Jaffrezic, E. Jardé et B. Le Bot. 2013. *Stabilité des résidus pharmaceutiques dans les échantillons d'eaux naturelles - I- Synthèse sur l'impact du prétraitement et du stockage II- Recommandations opérationnelles pour la conservation des échantillons, Rapport final projet Onema, 2013*.

Mompelat, S., O. Thomas et B. Le Bot. 2011. "Contamination levels of human pharmaceutical compounds in French surface and drinking water." *Journal of Environmental Monitoring* 13: 2929-2939. https://doi.org/10.1039/c1em10335k.

Montanari, S., A. Oliver, P. Salerno, A. Mena, G. Bertoni, B. Tümmler, L. Cariani, M. Conese, G. Döring et A. Bragonzi. 2007. "Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis." *Microbiology* 153 (5): 1445-1454. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003400-0.

Moraru, R., A. M. Pourcher, A. Jadas-Hecart, I. Kempf, C. Ziebal, M. Kervarrec, P. Y. Comunal, M. Mares et P. Dabert. 2012. "Changes in concentrations of fluoroquinolones and of ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* in chicken feces and manure stored in a heap." *Journal of Environmental Quality* 43 (3): 754-63. https://doi.org/10.2134/jeq2011.0313.

Morrissey, J. P., U. F. Walsh, A. O'Donnell, Y. Moënne-Loccoz et F. O'Gara. 2002. "Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications." *Antonie van Leeuwenhoek* 81 (1): 599-606. https://doi.org/10.1023/a:1020522025374.

Mulder, I., J. Siemens, V. Sentek, W. Amelung, K. Smalla et S. Jechalke. 2018. "Quaternary ammonium compounds in soil: implications for antibiotic resistance development." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 17 (1): 159-185. https://doi.org/10.1007/s11157-017-9457-7.

Mullot, J.-U. 2009. "Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers." Thèse de doctorat, Université Paris-Sud 11.

Muniesa, M., M. Colomer-Lluch et J. Jofre. 2013. "Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations?" *Mobile Genetic Elements* 3 (4): e25847-e25847. https://doi.org/10.4161/mge.25847.

Murray, A. K., L. Zhang, J. Snape et W. H. Gaze. 2019. "Comparing the selective and co-selective effects of different antimicrobials in bacterial communities." *International Journal of Antimicrobial Agents*. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.03.001.

Najdenski, H., T. Dimova, M. M. Zaharieva, B. Nikolov, G. Petrova-Dinkova, S. Dalakchieva, K. Popov, I. Hristova-Nikolova, P. Zehtindjiev, S. Peev, A. Trifonova-Hristova, E. Carniel, Y. A. Panferova et N. K. Tokarevich. 2018. "Migratory birds along the Mediterranean - Black Sea Flyway as carriers of zoonotic pathogens." *Canadian Journal of Microbiology* 64 (12): 915-924. https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0763.

Nalca, Y., L. Jänsch, F. Bredenbruch, R. Geffers, J. Buer et S. Häussler. 2006. "Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: A global approach." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (5): 1680-1688. https://doi.org/10.1128/aac.50.5.1680-1688.2006.

NandaKafle, G., A. A. Christie, S. Vilain et V. S. Brözel. 2018. "Growth and extended survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil organic matter." *Frontiers in Microbiology* 9 (762). https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00762.

Naviner, M., E. Giraud, C. Thorin, H. Le Bris, H. Pouliquen et J.-P. Ganiere. 2007. "Effects of three dosages of oral oxolinic acid treatment on the selection of antibiotic-resistant *Aeromonas*: Experimental approach in farmed trout." *Aquaculture* 269 (1): 31-40. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.014.

Naviner, M., L. Gordon, E. Giraud, M. Denis, C. Mangion, H. Le Bris et J.-P. Ganière. 2011. "Antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from the growth pond to the commercial product in a rainbow trout farm following a flumequine treatment." *Aquaculture* 315 (3): 236-241. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.006.

Nazaret, S. 2020a. Communication personnelle: "Concentrations en ATB dans des PRO et des sols - Projet DABARES."

Nazaret, S. 2020b. Communication personnelle: "Concentrations en ATB dans des PRO et des sols - Projet QualiAgro."

Nesme, J. 2014. "Caractérisation de la prévalence et de la diversité des gènes de résistance bactérienne à des antibiotiques dans le sol par des approches métagénomiques : Quel est le potentiel de dissémination du résistome tellurique ?" Thèse de doctorat, Électronique, électrotechnique, automatique, École Centrale de Lyon, Université de Lyon.

Nesme, J., S. Cécillon, Tom O. Delmont, J.-M. Monier, Timothy M. Vogel et P. Simonet. 2014. "Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment." *Current Biology* 24 (10): 1096-1100. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.036.

Nesme, J. et P. Simonet. 2015. "The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria." *Environmental Microbiology* 17 (4): 913-930. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631.

Neyfakh, A. A. 1997. "Natural functions of bacterial multidrug transporters." *Trends in Microbiology* 5 (8): 309-313. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01064-0.

Nichols, W. W., M. J. Evans, M. P. E. Slack et H. L. Walmsley. 1989. "The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of General Microbiology* 135 (5): 1291-1303. https://doi.org/10.1099/00221287-135-5-1291.

Nicholson, F. A., S. J. Groves et B. J. Chambers. 2005. "Pathogen survival during livestock manure storage and following land application." *Bioresource Technology* 96 (2): 135-143. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.030.

Nies, D. H. 2003. "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes." *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2-3): 313-339. https://doi.org/10.1016/s0168-6445(03)00048-2.

Nikaido, H. et D. G. Thanassi. 1993. "Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (7): 1393-1399. https://doi.org/10.1128/aac.37.7.1393.

Nishino, K., E. Nikaido et A. Yamaguchi. 2007. "Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Journal of Bacteriology* 189 (24): 9066-9075. https://doi.org/10.1128/JB.01045-07.

Nriagu, J. O. 1996. "A history of global metal pollution." *Science* 272 (5259): 223-223. https://doi.org/10.1126/science.272.5259.223.

Nunan, N., K. Ritz, D. Crabb, K. Harris, K. Wu, J. W. Crawford et I. M. Young. 2001. "Quantification of the *in situ* distribution of soil bacteria by large-scale imaging of thin sections of undisturbed soil." *FEMS Microbiology Ecology* 37 (1): 67-77. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00854.x.

Oberlé, K. 2012. "Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et *d'Enterococcus* spp. dans les hydrosystèmes de surface." Thèse de doctorat, Biologie, Université de Rouen.

Oberlé, K., M.-J. Capdeville, T. Berthe, H. Budzinski et F. Petit. 2012. "Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: From medical center patients to a receiving environment." *Environmental Science and Technology* 46 (3): 1859-1868. https://doi.org/10.1021/es203399h.

Oberoi, A. S., Y. Jia, H. Zhang, S. K. Khanal et H. Lu. 2019. "Insights into the Fate and Removal of Antibiotics in Engineered Biological Treatment Systems: A Critical Review." *Environmental Science and Technology* 53 (13): 7234-7264. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01131.

OCDE. 2000. *Test No. 106: Adsorption - Desorption using a batch equilibrium method.* https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264069602-en.

OCDE. 2002. *Test No. 308: Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems*.

Oh, S., M. Tandukar, S. G. Pavlostathis, P. S. G. Chain et K. T. Konstantinidis. 2013. "Microbial community adaptation to quaternary ammonium biocides as revealed by metagenomics." *Environmental Microbiology* 15 (10): 2850-2864. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12154.

OIE. Mai 2015 2015. *Liste OIE des antibiotiques importants en médecine vétérinaire.* Organisation mondiale de la santé animale. https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/F_OIE_List_antimicrobials_Mai2015.pdf.

OIE. 2016. *OIE Annual report on the use of antimicrobial agents in animals.* Organisation mondiale de la santé animale.

Olds, H. T., S. R. Corsi, D. K. Dila, K. M. Halmo, M. J. Bootsma et S. L. McLellan. 2018. "High levels of sewage contamination released from urban areas after storm events: A quantitative survey with sewage specific bacterial indicators." *PLoS Medicine* 15 (7): e1002614. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002614.

Oliver, J. P., C. A. Gooch, S. Lansing, J. Schueler, J. J. Hurst, L. Sassoubre, E. M. Crossette et D. S. Aga. 2020. "Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems." *Journal of Dairy Science* 103 (2): 1051-1071. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16778.

OMS. 2016a. *Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens.* Organisation mondiale de la santé (Genève). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/249548/9789242509762-fre.pdf?sequence=1.

OMS. 2016b. *Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens - Manuel de mise en oeuvre initiale.* Organisation mondiale de la santé (Genève). http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/247196/1/9789242549409-fre.pdf?ua=1&ua=1.

OMS. 2017a. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.* Organisation mondiale de la santé.

OMS. 2017b. "L'approche multisectorielle de l'OMS « Un monde, une santé »." Organisation mondiale de la santé. Consulté le 25 avril 2019. https://www.who.int/features/qa/one-health/fr/.

OMS. 2018. "Report of the 7th Meeting." WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR), Raleigh, USA, 17-20 October 2016. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272714/WHO-NMH-FOS-FZD-18.1-eng.pdf?ua=1.

OMS. 2019. *Critically important antimicrobials for human medicine - 6th Revision 2018.* Organisation mondiale de la santé (Genève). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1.

OMS, FAO et OIE. 2010. *The FAO-OIE-WHO Collaboration - Sharing responsibilities and coordinating global activities to address health risks at the animal-human-ecosystems interfaces - A Tripartite concept note.* Organisation mondiale de la santé, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la santé animale (Genève, Suisse). https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Current_Scientific_Issues/docs/pdf/FINAL_CONCEPT_NOTE_Hanoi.pdf.

OMS, FAO et OIE. 2017. *The Tripartite's commitment providing multi-sectoral, collaborative leadership in addressing health challenges.* Organisation mondiale de la santé, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la santé animale (Genève, Suisse). https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Tripartite_2017.pdf.

OMS, FAO et OIE. 2019a. *Enquête tripartite d'autoévaluation par pays sur la résistance aux antimicrobiens (TrACSS).* Organisation mondiale de la santé, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la santé animale (Genève, Suisse). https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/monitoring-evaluation/Tripartite-AMR-country-self-assessment-survey-2019-20-questionnaire-French.pdf?ua=1.

OMS, FAO et OIE. 2019b. *Monitoring and evaluation of the global action plan on antimicrobial resistance - Framework and recommended indicators.* Organisation mondiale de la santé, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la santé animale (Genève, Suisse). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325006/9789241515665-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Ongeng, D., A. H. Geeraerd, D. Springael, J. Ryckeboer, C. Muyanja et G. Mauriello. 2015. "Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the manure-amended soil-plant ecosystem of fresh vegetable crops: A review." *Critical Reviews in Microbiology* 41 (3): 273-294. https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.829415.

Ory, J., G. Bricheux, A. Togola, J. L. Bonnet, F. Donnadieu-Bernard, L. Nakusi, C. Forestier et O. Traore. 2016. "Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent." *Environmental Pollution* 214: 635-645. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.033.

Oubekka, S. D. 2012. "Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* : apport de la microscopie de fluorescence multimodale." Thèse de doctorat, Microbiologie, Université Paris Sud.

Pal, C., K. Asiani, S. Arya, C. Rensing, D. J. Stekel, D. G. J. Larsson et J. L. Hobman. 2017. "Chapter seven - Metal resistance and its association with antibiotic resistance." Dans *Advances in Microbial Physiology*, édité par Robert K. Poole, 261-313. Academic Press.

Pal, C., J. Bengtsson-Palme, E. Kristiansson et D. G. J. 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.

Palumbo, J. D., C. I. Kado et D. A. Phillips. 1998. "An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots." *Journal of Bacteriology* 180 (12): 3107-3113.

Pan, M. et L. M. Chu. 2017. "Leaching behavior of veterinary antibiotics in animal manure-applied soils." *Science of The Total Environment* 579: 466-473. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.072.

Parija, S. C. 2014. *Textbook of Microbiology and Immunology - Second edition*. Elsevier Health Sciences.

Pärnänen, K. M. M., C. Narciso-da-Rocha, D. Kneis, T. U. Berendonk, D. Cacace, T. T. Do, C. Elpers, D. Fatta-Kassinos, I. Henriques, T. Jaeger, A. Karkman, J. L. Martinez, S. G. Michael, I. Michael-Kordatou, K. O'Sullivan, S. Rodriguez-Mozaz, T. Schwartz, H. Sheng, H. Sørum, R. D. Stedtfeld, J. M. Tiedje, S. V. D. Giustina, F. Walsh, I. Vaz-Moreira, M. Virta et C. M. Manaia. 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.

Pasquini, L., J.-F. Munoz, N. Rimlinger, X. Dauchy, X. France, M.-N. Pons et T. Görner. 2013. "Assessment of the fate of some household micropollutants in urban wastewater treatment plant." *Chemical Papers* 67: 601-612. https://doi.org/10.2478/s11696-013-0339-3.

Passerat, J., F. Tamtam, B. Le Bot, J. Eurin, M. Chevreuil et P. Servais. 2010. "Rejets hospitaliers d'antibiotiques et de bactéries fécales antibiorésistantes dans les rivières du bassin de la Seine." *European Journal of Water Quality* 41 (1): 1-13.

Perrodin, Y., C. Bazin, F. Orias, A. Wigh, T. Bastide, A. Berlioz-Barbier, E. Vulliet et L. Wiest. 2016. "A posteriori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital." *Chemosphere* 144: 440-445. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.075.

Perrodin, Y., B. Christine, B. Sylvie, D. Alain, B. K. Jean-Luc, C. O. Cecile, R. Audrey et B. Elodie. 2013. "A priori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital." *Chemosphere* 90: 1037-1046. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.049.

Perron, K., O. Caille, C. Rossier, C. van Delden, J.-L. Dumas et T. Köhler. 2004. "CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Biological Chemistry* 279 (10): 8761-8768. https://doi.org/10.1074/jbc.M312080200.

Petit, F. 2020. Communication personnelle: "Concentrations en ATB dans des sédiments et des périphytons - Projet PIREN-Seine."

Petit, F., T. Berthe, H. Budzinski, R. Leclercq, V. Cattoir, A. Andremont, K. Oberlé, A. Laverman et E. Denamur. 2014. "Vulnerability and resilience of estuaries to contamination by antibiotics and antibiotic-resistant bacteria: A challenge for the next decade." Dans *Vulnerability of Coastal Ecosystems and Adaptation*, édité par A. Monaco and P. Prouzet.

Petit, F., T. Berthe, G. Chaix, E. Denamur, O. Clermont, N. Massei et J.-P. Dupont. 2018. "Factors influencing the occurrence and the fate of *E. coli* population in karst hydrosystems." Dans *Karst Groundwater Contamination and Public Health*, édité par William B. White, Janet S. Herman, Ellen K. Herman etMarian Rutigliano, 219-230. Cham: Springer.

Petit, F., O. Clermont, S. Delannoy, P. Servais, M. Gourmelon, P. Fach, K. Oberlé, M. Fournier, E. Denamur et T. Berthe. 2017. "Change in the structure of *Escherichia coli* population and the pattern of virulence genes along a rural aquatic continuum." *Frontiers in Microbiology* 8 (APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00609.

Petit, F., E. Denamur, H. Budzinski, R. Leclercq, L. Favennec, M. Chevé, M. Bussi, D. Féménias et J. Garnier. 2012. *Projet FLASH : Devenir des antibiotiques, flux de gènes et de bactéries antibiorésistantes en estuaire de Seine, exposition à l'Homme.* Projet Seine-Aval. https://www.seine-aval.fr/wp-content/uploads/2017/02/RR-SA4-FLASH_oct_2012_red_pro.pdf.

Peysson, W. et E. Vulliet. 2013. "Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1290: 46-61. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057.

Pidot, S. J., W. Gao, A. H. Buultjens, I. R. Monk, R. Guerillot, G. P. Carter, J. Y. H. Lee, M. M. C. Lam, M. L. Grayson, S. A. Ballard, A. A. Mahony, E. A. Grabsch, D. Kotsanas, T. M. Korman, G. W. Coombs, J. O. Robinson, A. Gonçalves da Silva, T. Seemann, B. P. Howden, P. D. R. Johnson et T. P. Stinear. 2018.

"Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols." *Science Translational Medicine* 10 (452): eaar6115. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar6115.

Pills. 2012. *Pharmaceutical residues in the aquatic system – a challenge for the future - Insights and activities of the European cooperation project PILLS.* http://www.pills-project.eu/PILLS_summary_english.pdf.

Pinasseau, L., L. Wiest, A. Fildier, L. Volatier, G. R. Fones, G. A. Mills, F. Mermillod-Blondin et E. Vulliet. 2019. "Use of passive sampling and high resolution mass spectrometry using a suspect screening approach to characterise emerging pollutants in contaminated groundwater and runoff." *Science of The Total Environment* 672: 253-263. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.489.

Pinheiro, É. F. M., D. V. B. de Campos, F. de Carvalho Balieiro, L. H. C. dos Anjos et M. G. Pereira. 2015. "Tillage systems effects on soil carbon stock and physical fractions of soil organic matter." *Agricultural Systems* 132: 35-39. https://doi.org/10.1016/j.agsy.2014.08.008.

Pinto, D., V. Almeida, M. Almeida Santos et L. Chambel. 2011. "Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli." *Journal of Applied Microbiology* 110 (6): 1601-1611. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x.

Pipame. 2017. *Prospectives Enjeux et perspectives des producteurs pour tiers de principes actifs et de médicaments.* Pôle interministériel de Prospective et d'Anticipation des Mutations économiques. https://www.entreprises.gouv.fr/files/files/directions_services/etudes-et-statistiques/prospective/Industrie/2017-03-PIPAME-Faconnage-Pharmaceutique-RAPPORT.pdf.

PNUE. 2017. *Frontières 2017 - Questions émergentes d'ordre environnemental.* Programme des Nations Unies pour l'environnement.

PNUE. 2019. *Global Environment Outlook - GEO6: Healthy planet, healthy people.* Programme des Nations Unies pour l'environnement. https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/27539/GEO6_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Poirel, L., V. Cattoir et P. Nordmann. 2012. "Plasmid-mediated quinolone resistance; Interactions between human, animal, and environmental ecologies." *Frontiers in Microbiology* 3: 24-24. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00024.

Poll, C., T. Brune, D. Begerow et E. Kandeler. 2010. "Small-scale diversity and succession of fungi in the detritusphere of rye residues." *Microbial Ecology* 59 (1): 130-140. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9541-9.

Poole, K. 2017. "At the nexus of antibiotics and metals: The impact of Cu and Zn on antibiotic activity and resistance." *Trends in microbiology* 25 (10): 820-832. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.010.

Pourcher, A. M., A. Jadas-Hécart, P. Cotinet, P. Dabert, C. Ziebal, S. Le Roux, R. Moraru, D. Heddadj et I. Kempf. 2014. "Effect of land application of manure from enrofloxacin-treated chickens on ciprofloxacin resistance of *Enterobacteriaceae* in soil." *Science of The Total Environment* 482-483: 269-275. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.136.

Pronk, M., N. Goldscheider et J. Zopfi. 2007. "Particle-size distribution as indicator for fecal bacteria contamination of drinking water from karst springs." *Environmental Science and Technology* 41 (24): 8400-8405. https://doi.org/10.1021/es071976f.

Pulicharla, R., S. K. Brar, P. Drogui, M. Verma et R. Y. Surampalli. 2015a. "Removal processes of antibiotics in waters and wastewaters: crucial link to physical-chemical properties and degradation." *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste* 19 (4): 04015008. https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000285.

Pulicharla, R., R. K. Das, S. K. Brar, P. Drogui, S. J. Sarma, M. Verma, R. Y. Surampalli et J. R. Valero. 2015b. "Toxicity of chlortetracycline and its metal complexes to model microorganisms in wastewater sludge." *Science of The Total Environment* 532: 669-675. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.140.

Pulicharla, R., K. Hegde, S. K. Brar et R. Y. Surampalli. 2017. "Tetracyclines metal complexation: Significance and fate of mutual existence in the environment." *Environmental Pollution* 221: 1-14. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.017.

Raaijmakers, J. M. et M. Mazzola. 2012. "Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria." *Annual Review of Phytopathology* 50 (1): 403-424. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908.

Rahube, T. O., R. Marti, A. Scott, Y. C. Tien, R. Murray, L. Sabourin, Y. Zhang, P. Duenk, D. R. Lapen et E. Topp. 2014. "Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (22): 6898-6907. https://doi.org/10.1128/AEM.02389-14.

Ranjard, L., S. Nazaret, F. Gourbière, J. Thioulouse, P. Linet et A. Richaume. 2000. "A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes

and analysis of community DNA fingerprints." *FEMS Microbiology Ecology* 31 (2): 107-115. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00676.x.

Ranjard, L. et A. Richaume. 2001. "Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil." *Research in Microbiology* 152 (8): 707-716. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01251-7.

Ratajczak, M., E. Laroche, T. Berthe, O. Clermont, B. Pawlak, E. Denamur et F. Petit. 2010. "Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed." *BMC Microbiology* 10 (1): 222. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-222.

Reichel, M., A. Schlicht, C. Ostermeyer et G. Kampf. 2014. "Efficacy of surface disinfectant cleaners against emerging highly resistant gram-negative bacteria." *BMC Infectious Diseases* 14 (1): 292. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-292.

Renau-Pruñonosa, A., O. García-Menéndez, M. Ibáñez, E. Vázquez-Suñé, C. Boix, B. Ballesteros, M. García, I. Morell et F. Hernandez. 2020. "Identification of aquifer recharge sources as the origin of emerging contaminants in intensive agricultural areas. La Plana de Castellón, Spain." *Water* 12: 731. https://doi.org/10.3390/w12030731.

Ribeiro, A. F., E. Laroche, G. Hanin, M. Fournier, L. Quillet, J. P. Dupont et B. Pawlak. 2012. "Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in karstic systems: A biological indicator of the origin of fecal contamination?" *FEMS Microbiology Ecology* 81 (1): 267-280. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01382.x.

Ricken, B., P. F. X. Corvini, D. Cichocka, M. Parisi, M. Lenz, D. Wyss, P. M. Martínez-Lavanchy, J. A. Müller, P. Shahgaldian, L. G. Tulli, H.-P. E. Kohler et B. A. Kolvenbach. 2013. "*ipso*-hydroxylation and subsequent fragmentation: a novel microbial strategy to eliminate sulfonamide antibiotics." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (18): 5550-5558. https://doi.org/10.1128/aem.00911-13.

Riesenfeld, C. S., R. M. Goodman et J. Handelsman. 2004. "Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes." *Environmental Microbiology* 6 (9): 981-989. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00664.x.

Rogers, S. W., M. Donnelly, L. Peed, C. A. Kelty, S. Mondal, Z. Zhong et O. C. Shanks. 2011. "Decay of bacterial pathogens, fecal indicators, and real-time quantitative PCR genetic markers in manure-amended soils." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (14): 4839-4848. https://doi.org/10.1128/AEM.02427-10.

Rolo, J., P. Worning, J. B. Nielsen, R. Bowden, O. Bouchami, P. Damborg, L. Guardabassi, V. Perreten, A. Tomasz, H. Westh, H. de Lencastre et M. Miragaia. 2017. "Evolutionary origin of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (6): e02302-16. https://doi.org/10.1128/aac.02302-16.

Rosendahl, I., J. Siemens, J. Groeneweg, E. Linzbach, V. Laabs, C. Herrmann, H. Vereecken et W. Amelung. 2011. "Dissipation and sequestration of the veterinary antibiotic sulfadiazine and its metabolites under field conditions." *Environmental Science and Technology* 45 (12): 5216-5222. https://doi.org/10.1021/es200326t.

Ross, J. et E. Topp. 2015. "Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (22): 7905-7913. https://doi.org/10.1128/aem.02363-15.

Rusch, M., A. Spielmeyer, H. Zorn et G. Hamscher. 2018. "Biotransformation of ciprofloxacin by *Xylaria longipes*: structure elucidation and residual antibacterial activity of metabolites." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (19): 8573-8584. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9231-y.

Rusch, M., A. Spielmeyer, H. Zorn et G. Hamscher. 2019. "Degradation and transformation of fluoroquinolones by microorganisms with special emphasis on ciprofloxacin." *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (17): 6933-6948. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10017-8.

Ruyters, S., P. Salaets, K. Oorts et E. Smolders. 2013. "Copper toxicity in soils under established vineyards in Europe: A survey." *Science of The Total Environment* 443: 470-477. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.001.

Sabourin, L., A. Beck, P. W. Duenk, S. Kleywegt, D. R. Lapen, H. Li, C. D. Metcalfe, M. Payne et E. Topp. 2009. "Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of dewatered municipal biosolids to an agricultural field." *Science of The Total Environment* 407 (16): 4596-4604. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.027.

Sabourin, L., P. Duenk, S. Bonte-Gelok, M. Payne, D. R. Lapen et E. Topp. 2012. "Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids." *Science of The Total Environment* 431: 233-6. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.017.

Saby, N. P. A., B. P. Marchant, R. M. Lark, C. C. Jolivet et D. Arrouays. 2011. "Robust geostatistical prediction of trace elements across France." *Geoderma* 162 (3): 303-311. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.03.001.

Sadikalay, S. 2018. "Influence des rejets humains et animaux sur la diffusion de l'antibiorésistance à l'homme, aux animaux et à l'environnement, en Guadeloupe." Thèse de doctorat, Microbiologie, Université des Antilles.

Salvia, M.-V., J. Experton, C. Geandel, C. Cren-Olivé et E. Vulliet. 2014. "Fate of pharmaceutical compounds and steroid hormones in soil: study of transfer and degradation in soil columns." *Environmental Science and Pollution Research* 21 (17): 10525-10535. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3038-x.

Salvia, M.-V., M. Fieu et E. Vulliet. 2015. "Determination of tetracycline and fluoroquinolone antibiotics at trace levels in sludge and soil." *Applied and Environmental Soil Science* 2015: 1-10. https://doi.org/10.1155/2015/435741.

Salvia, M.-V., E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot et C. Cren-Olivé. 2012. "Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil." *Journal of Chromatography A* 1245: 122-133. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.034.

San Millan, A. et R. C. MacLean. 2017. "Fitness costs of plasmids: A limit to plasmid transmission." *Microbiology Spectrum* 5 (5). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0016-2017.

Sandberg, K. D., S. Ishii et T. M. LaPara. 2018. "A microfluidic quantitative polymerase chain reaction method for the simultaneous analysis of dozens of antibiotic resistance and heavy metal resistance genes." *Environmental Science and Technology Letters* 5 (1): 20-25. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00552.

Sanofi. 2019. *Plan de vigilance du groupe.* https://www.sanofi.com/-/media/Project/One-Sanofi-Web/Websites/Global/Sanofi-COM/Home/common/docs/download-center/Plan-de-Vigilance-2019.pdf?la=fr&hash=EABF70E661D70AFC2FAC0ECCDF1BC05CFA1357AB.

Santamaría, J. et G. Toranzos. 2003. "Enteric pathogens and soil: A short review." *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 6: 5-9. https://doi.org/10.1007/s10123-003-0096-1.

SATEGE Nord-Pas de Calais. 2019. *Epandage et stockage des effluents organiques en Nord-Pas de Calais.* Service d'assistance technique à la gestion des épandages. https://hautsdefrance.chambres-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/Hauts-de-France/029_Inst-Hauts-de-France/Environnement-et-territoires/Eau_sol/Agronomie_et_sols/plaquette_distances_59_62_juillet2019-2.pdf.

SCENHIR. 2O1O. *Opinion on triclosan, antimicrobial resistance - adopté le 22 juin 2010 après consultation.* Scientific committee on emerging and newly identified health risks.

SCENIHR. 2009. *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides.* Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks - European Commission (Bruxelles).

Schauss, T., S. P. Glaeser, A. Gütschow, W. Dott et P. Kämpfer. 2015. "Improved detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in input and output samples of German biogas plants by a selective pre-enrichment procedure." *PLoS One* 10 (3): e0119791. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119791.

Schnappinger, D. et W. Hillen. 1996. "Tetracyclines: Antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms." *Archives of Microbiology* 165 (6): 359-369. https://doi.org/10.1007/s002030050339.

Schroeder, M., B. D. Brooks et A. E. Brooks. 2017. "The complex relationship between virulence and antibiotic resistance." *Genes* 8 (1): 39. https://doi.org/10.3390/genes8010039.

Schwartz, T., W. Kohnen, B. Jansen et U. Obst. 2003. "Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms." *FEMS Microbiology Ecology* 43 (3): 325-335. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00444-0.

Scott, A., Y.-C. Tien, C. F. Drury, W. D. Reynolds et E. Topp. 2018. "Enrichment of antibiotic resistance genes in soil receiving composts derived from swine manure, yard wastes, or food wastes, and evidence for multiyear persistence of swine Clostridium spp." *Canadian Journal of Microbiology* 64 (3): 201-208. https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0642.

Seiler, C. et T. Berendonk. 2012. "Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture." *Frontiers in Microbiology* 3 (399). https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399.

Selvam, A. et J. W. C. Wong. 2017. "12 - Degradation of antibiotics in livestock manure during composting." Dans *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, édité par Jonathan W. C. Wong, Rajeshwar D. Tyagi etAshok Pandey, 267-292. Elsevier.

Servais, P., G. Billen, T. Garcia-Armisen, I. George, A. Goncalvez et S. Thibert. 2009. *La contamination microbienne des eaux du bassin de la Seine.* Programme PIREN-Seine - Agence de l'eau Seine-Normandie. https://www.piren-seine.fr/sites/default/files/PIREN_documents/fascicules/Collection_AESN_PIREN-Seine_08_-_microbienne.pdf.

Servais, P., T. Garcia-Armisen, I. George et G. Billen. 2007. "Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling." *Science of The Total Environment* 375 (1): 152-167. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.010.

Servais, P. et J. Passerat. 2009. "Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France)." *Science of The Total Environment* 408 (2): 365-372. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.042.

Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann et E. Kandeler. 2001. "Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (9): 4215-24. https://doi.org/10.1128/aem.67.9.4215-4224.2001.

Sharma, M., P. D. Millner, F. Hashem, B. T. Vinyard, C. L. East, E. T. Handy, K. White, R. Stonebraker et C. P. Cotton. 2019. "Survival of *Escherichia coli* in manure-amended soils is affected by spatiotemporal, agricultural, and weather factors in the Mid-Atlantic United States." *Applied and Environmental Microbiology* 85 (5): e02392-18. https://doi.org/10.1128/aem.02392-18.

Sharma, R., F. Larney, J. Chen, L. Yanke, M. Morrison, E. Topp, T. McAllister et Z. Yu. 2009. "Selected antimicrobial resistance during composting of manure from cattle administered sub-therapeutic antimicrobials." *Journal of Environmental Quality* 38: 567-75. https://doi.org/10.2134/jeq2007.0638.

Sidhu, H., G. O'Connor, A. Ogram et K. Kumar. 2019. "Bioavailability of biosolids-borne ciprofloxacin and azithromycin to terrestrial organisms: Microbial toxicity and earthworm responses." *Science of The Total Environment* 650 (Pt 1): 18-26. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.004.

Simonet, P. et E. Gardeur-Algros. 2012. *Etude de la situation naturelle ou après amendement par des molécules antibiotiques de la diversité des gènes de résistance à des antibiotiques dans le génome des bactéries telluriques, de leur prévalence dans le sol et de leurs potentialités de transfert horizontal - Projet "Générique".* https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/projet-generique-resistance-antibiotiques-2012-rapport-final.pdf.

Šimůnek, J., C. He, L. Pang et S. A. Bradford. 2006. "Colloid-facilitated solute transport in variably saturated porous media: Numerical model and experimental verification." *Vadose Zone Journal* 5 (3): 1035-1047. https://doi.org/10.2136/vzj2005.0151.

Sinreich, M., M. Pronk et R. Kozel. 2014. "Microbiological monitoring and classification of karst springs." *Environmental Earth Sciences* 71 (2): 563-572. https://doi.org/10.1007/s12665-013-2508-7.

SIPIBEL. 2019. Communication personnelle: "Base DOMINEAU."

Sládeček, V. et A. Sládečková. 1964. "Determination of the periphyton production by means of the glass slide method." *Hydrobiologia* 23 (1): 125-158. https://doi.org/10.1007/BF00043726.

Slekovec, C., J. Plantin, P. Cholley, M. Thouverez, D. Talon, X. Bertrand et D. Hocquet. 2012. "Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network." *PLoS One* 7 (12): e49300. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049300.

Slekovec, C., J. Robert, D. Trystram, J. M. Delarbre, A. Merens, N. van der Mee-Marquet, C. de Gialluly, Y. Costa, J. Caillon, D. Hocquet, X. Bertrand et o. b. o. t. ONERBA. 2014. "*Pseudomonas aeruginosa* in French hospitals between 2001 and 2011: back to susceptibility." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 33 (10): 1713-1717. https://doi.org/10.1007/s10096-014-2125-8.

SOeS. 2015. *Repères - Sols et environnement - Chiffres clés.* Serviecde l'observation et des statistiques, Commisariat général au développement durable. https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/sites/default/files/2019-01/reperes-chiffres-cles-sols-et-environnement-edition-2015-novembre2016.pdf.

Somorin, Y., G. Bouchard, J. Gallagher, F. Abram, F. Brennan et C. O'Byrne. 2017. "Roles for RpoS in survival of *Escherichia coli* during protozoan predation and in reduced moisture conditions highlight its importance in soil environments." *FEMS Microbiology Letters* 364 (19). https://doi.org/10.1093/femsle/fnx198.

Somorin, Y. M., T. Vollmerhausen, N. Waters, L. Pritchard, F. Abram, F. Brennan et C. O'Byrne. 2018. "Absence of curli in soil-persistent *Escherichia coli* is mediated by a C-di-GMP signaling defect and suggests evidence of biofilm-independent niche specialization." *Frontiers in Microbiology* 9 (1340). https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01340.

Soumet, C., E. Fourreau, P. Legrandois et P. Maris. 2012. "Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*." *Veterinary Microbiology* 158 (1-2): 147-152.

Soumet, C., D. Méheust, C. Pissavin, P. Le Grandois, B. Frémaux, C. Feurer, A. Le Roux, M. Denis et P. Maris. 2016. "Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds." *Journal of Applied Microbiology* 121 (5): 1275-1281. https://doi.org/10.1111/jam.13247.

Sousa-Silva, M., M. Simões, L. Melo et I. Machado. 2018. "*Pseudomonas fluorescens* tolerance to benzyldimethyldodecyl ammonium chloride: Altered phenotype and cross-resistance." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 15: 188-195. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.07.004.

Sposito, G. 2008. *The chemistry of soils - Second edition*. New York, USA: Oxford University Press.

Stalder, T., O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot et M.-C. Ploy. 2012. "Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance." *Frontiers in Microbiology* 3: 119-119. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119.

Stalder, T., O. Barraud, T. Jové, M. Casellas, M. Gaschet, C. Dagot et M.-C. Ploy. 2014. "Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool." *The ISME Journal* 8 (4): 768-777. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.189.

Stewart, P. S. et J. W. Costerton. 2001. "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." *The Lancet* 358 (9276): 135-8. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1.

Storino, F., J. S. Arizmendiarrieta, I. Irigoyen, J. Muro et P. M. Aparicio-Tejo. 2016. "Meat waste as feedstock for home composting: Effects on the process and quality of compost." *Waste Management* 56: 53-62. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.07.004.

Strahler, A. N. 1952. "Hypsometric (area-altitude) analysis of erosional topology." *Geological Society of America Bulletin* 63 (11): 1117-1142. https://doi.org/10.1130/0016-7606(1952)63[1117:Haaoet]2.0.Co;2.

Strub, M. 2009. *Enseignements nationaux de l'opération européenne de recherche des substances émergentes dans les eaux de surface : EUMORE FATE.* INERIS.

Stuart, M. E., K. Manamsa, J. C. Talbot et C. E. J. 2011. *Emerging contaminants in groundwater.* British Geological Survey.

Stubbendieck, R. M., C. Vargas-Bautista et P. D. Straight. 2016. "Bacterial communities: Interactions to scale." *Frontiers in Microbiology* 7: 1234-1234. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234.

Syntheau. 2017. *Fiches n°7 - Les micropolluants dans les eaux rejetées au milieu naturel.* Syndicat national des entreprises du traitement de l'eau. http://www.synteau.com/wp-content/uploads/2017/06/20170517_SYNTEAU_FICHES_MICROPOLLUANTS-1.pdf.

Tahlan, K., S. K. Ahn, A. Sing, T. D. Bodnaruk, A. R. Willems, A. R. Davidson et J. R. Nodwell. 2007. "Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*." *Molecular Microbiology* 63 (4): 951-961. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05559.x.

Tamtam, F. 2008. "Sources et devenir des antibiotiques dans le bassin versant de la Seine." Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.

Tamtam, F., B. Le Bot, T. Dinh, S. Mompelat, J. Eurin, M. Chevreuil, P. Bonté, J.-M. Mouchel et S. Ayrault. 2011a. "A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments." *Journal of Soils and Sediments* 11: 852-859. https://doi.org/10.1007/s11368-011-0364-1.

Tamtam, F., B. Lebot, J. Eurin, F. Mercier, A. Desportes et M. Chevreuil. 2009a. "Contamination des eaux de surface en milieu rural par des résidus d'antibiotiques." *European journal of water quality* 40: 175-186. https://doi.org/10.1051/water/2009012.

Tamtam, F., B. Lebot, J. Eurin, F. Mercier, K. Tiphagne-Larcher, A. Desportes et M. Chevreuil. 2007. "Étude des sources et du devenir de deux antibiotiques dans les eaux de la Seine : l'acide oxolinique et le sulfaméthoxazole." *European journal of water quality* 38: 155-168. https://doi.org/10.1051/wqual/2007005.

Tamtam, F., F. Mercier, J. Eurin, M. Chevreuil et B. Le Bot. 2009b. "Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393: 1709-1718. https://doi.org/10.1007/s00216-008-2576-9.

Tamtam, F., F. Mercier, B. Le Bot, J. Eurin, Q. Tuc Dinh, M. Clément et M. Chevreuil. 2008. "Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions." *Science of The Total Environment* 393 (1): 84-95. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.009.

Tamtam, F., F. van Oort, B. Le Bot, T. Dinh, S. Mompelat, M. Chevreuil, I. Lamy et M. Thiry. 2011b. "Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation." *Science of The Total Environment* 409 (3): 540-547. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.033.

Tandukar, M., S. Oh, U. Tezel, K. T. Konstantinidis et S. G. Pavlostathis. 2013. "Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance." *Environmental Science and Technology* 47 (17): 9730-9738. https://doi.org/10.1021/es401507k.

Tappe, W., M. Herbst, D. Hofmann, S. Koeppchen, S. Kummer, B. Thiele et J. Groeneweg. 2013. "Degradation of sulfadiazine by *Microbacterium lacus* strain SDZm4, isolated from lysimeters previously manured with slurry

from sulfadiazine-medicated pigs." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (8): 2572-2577. https://doi.org/10.1128/AEM.03636-12.

Tell, J., D. J. Caldwell, A. Häner, J. Hellstern, B. Hoeger, R. Journel, F. Mastrocco, J. J. Ryan, J. Snape, J. O. Straub et J. Vestel. 2019. "Science-based targets for antibiotics in receiving waters from pharmaceutical manufacturing operations." *Integrated Environmental Assessment and Management* 15 (3): 312-319. https://doi.org/10.1002/ieam.4141.

Tennent, J. M., B. R. Lyon, M. Midgley, G. Jones, A. S. Purewal et R. A. Skurray. 1989. "Physical and biochemical characterization of the qacA gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*." *Microbiology* 135 (1): 1-10. https://doi.org/10.1099/00221287-135-1-1.

Ter Laak, T. L., W. A. Gebbink et J. Tolls. 2006. "Estimation of soil sorption coefficients of veterinary pharmaceuticals from soil properties." *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (4): 933-941. https://doi.org/10.1897/05-229R.1.

Thi, T. D., E. López, A. Rodríguez-Rojas, J. Rodríguez-Beltrán, A. Couce, J. R. Guelfo, A. Castañeda-García et J. Blázquez. 2011. "Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (3): 531-8. https://doi.org/10.1093/jac/dkq496.

Thiebault, T., L. Chassiot, L. Fougère, E. Destandau, A. Simonneau, P. Van Beek, M. Souhaut et E. Chapron. 2017. "Record of pharmaceutical products in river sediments: A powerful tool to assess the environmental impact of urban management?" *Anthropocene* 18: 47-56. https://doi.org/10.1016/j.ancene.2017.05.006.

Thiele-Bruhn, S. et D. Peters. 2007. "Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces." *Landbauforschung Volkenrode* 57 (1): 13-23.

Thompson, J. M., A. Gündoğdu, H. M. Stratton et M. Katouli. 2013. "Antibiotic resistant Staphylococcus aureus in hospital wastewaters and sewage treatment plants with special reference to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." *Journal of Applied Microbiology* 114 (1): 44-54. https://doi.org/10.1111/jam.12037.

Tien, Y. C., B. Li, T. Zhang, A. Scott, R. Murray, L. Sabourin, R. Marti et E. Topp. 2017. "Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest." *Science of The Total Environment* 581-582: 32-39. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138.

Tkachenko, O., J. Shepard, V. M. Aris, A. Joy, A. Bello, I. Londono, J. Marku, P. Soteropoulos et M. A. Peteroy-Kelly. 2007. "A triclosan-ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes." *Research in Microbiology* 158 (8): 651-658. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.003.

Togola, A. 2018. *Participation à la surveillance pour la liste de vigilance - Rapport final.* Bureau de Recherches Géologiques et Minières.

Tolls, J. 2001. "Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review." *Environmental Science and Technology* 35 (17): 3397-406. https://doi.org/10.1021/es0003021.

Topp, E., R. Chapman, M. Devers-Lamrani, A. Hartmann, R. Marti, F. Martin-Laurent, L. Sabourin, A. Scott et M. Sumarah. 2013. "Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading *Microbacterium* sp." *Journal of Environmental Quality* 42 (1): 173-178. https://doi.org/10.2134/jeq2012.0162.

Topp, E., J. Renaud, M. Sumarah et L. Sabourin. 2016. "Reduced persistence of the macrolide antibiotics erythromycin, clarithromycin and azithromycin in agricultural soil following several years of exposure in the field." *Science of The Total Environment* 562: 136-144. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.210.

Tortorella, E., P. Tedesco, F. Palma Esposito, G. G. January, R. Fani, M. Jaspars et D. de Pascale. 2018. "Antibiotics from deep-sea microorganisms: Current discoveries and perspectives." *Marine drugs* 16 (10): 355. https://doi.org/10.3390/md16100355.

Udikovic-Kolic, N., F. Wichmann, N. A. Broderick et J. Handelsman. 2014. "Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (42): 15202-15207. https://doi.org/10.1073/pnas.1409836111.

Um, M. M., O. Barraud, M. Kérourédan, M. Gaschet, T. Stalder, E. Oswald, C. Dagot, M.-C. Ploy, H. Brugère et D. Bibbal. 2016. "Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health." *Water Research* 88: 30-38. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.029.

US EPA. 2004. *Report to Congress - Impacts and control of CSOs and SSOs.* United States Environmental Protection Agency (Washington, D.C. USA). https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/csossortc2004_full.pdf.

Valdes, D., J.-P. Dupont, B. Laignel, S. Slimani et C. Delbart. 2014. "Infiltration processes in karstic chalk investigated through a spatial analysis of the geochemical properties of the groundwater: The effect of the superficial layer of clay-with-flints." *Journal of Hydrology* 519: 23-33. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2014.07.002.

van Veen, J. A., L. S. van Overbeek et J. D. van Elsas. 1997. "Fate and activity of microorganisms introduced into soil." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (2): 121-135.

Varela, A. R., G. Ferro, J. Vredenburg, M. Yanık, L. Vieira, L. Rizzo, C. Lameiras et C. M. Manaia. 2013. "Vancomycin resistant enterococci: From the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant." *Science of The Total Environment* 450-451: 155-161. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.015.

Vega, N. M. et J. Gore. 2014. "Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications." *Current Opinion in Microbiology* 21: 28-34. https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.003.

Vione, D., D. Fabbri, M. Minella et S. Canonica. 2018. "Effects of the antioxidant moieties of dissolved organic matter on triplet-sensitized phototransformation processes: Implications for the photochemical modeling of sulfadiazine." *Water Research* 128: 38-48. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.020.

Vittecoq, M., S. Godreuil, F. Prugnolle, P. Durand, L. Brazier, N. Renaud, A. Arnal, S. Aberkane, H. Jean-Pierre, M. Gauthier-Clerc, F. Thomas et F. Renaud. 2016. "Antimicrobial resistance in wildlife." *Journal of Applied Ecology* 53 (2): 519-529. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596.

Vittecoq, M., C. Laurens, L. Brazier, P. Durand, E. Elguero, A. Arnal, F. Thomas, S. Aberkane, N. Renaud, F. Prugnolle, J. Solassol, H. Jean-Pierre, S. Godreuil et F. Renaud. 2017. "VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* in gulls from southern France." *Ecology and Evolution* 7 (4): 1224-1232. https://doi.org/10.1002/ece3.2707.

Vivant, A.-L., D. Garmyn, L. Gal, A. Hartmann et P. Piveteau. 2015. "Survival of *Listeria monocytogenes* in soil requires agrA-mediated regulation." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (15): 5073-5084. https://doi.org/10.1128/AEM.04134-14.

Vivant, A.-L., E. Guigon, T. Berthe, F. Alliot, B. Janvier, A. Goutte, E. Marchand, D. Guenée et F. Petit. 2019. "Le résistome des biofilms et des sédiments : un indicateur de vulnérabilité et/ou de résilience à la contamination par les antibiotiques et les bactéries antibiorésistantes." Dans *PIREN-Seine - Rapports de synthèse de la phase 7 (2015-2019) - Volume 6 : Devenir des contaminants : piégeage, transformation, bioaccumulation et effets écotoxicologiques*, édité par Gelabert & Goutte.

Vos, M., L. Sibleyras, L. K. Lo, E. Hesse, W. Gaze et U. Klümper. 2020. "Zinc can counteract selection for ciprofloxacin resistance." *FEMS Microbiology Letters* 367 (3). https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa038.

Vrel, A., D. Boust, P. Lesueur, J. Deloffre, C. Dubrulle-Brunaud, L. Solier, M. Rozet, C. Thouroude, C. Cossonnet et S. Thomas. 2013. "Dating of sediment record at two contrasting sites of the Seine River using radioactivity data and hydrological time series." *Journal of Environmental Radioactivity* 126: 20-31. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.06.005.

Vulliet, E., C. Cren-Olivé et M.-F. Grenier-Loustalot. 2011. "Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters." *Environmental Chemistry Letters* 9: 103-114. https://doi.org/10.1007/s10311-009-0253-7.

Vulliet, E., M. Tournier, A. Vauchez, L. Wiest, R. Baudot, F. Lafay, A. Kiss et C. Cren-Olive. 2014. "Survey regarding the occurrence of selected organic micropollutants in the groundwaters of overseas departments." *Environmental Science and Pollution Research* 21: 7512-7521. https://doi.org/10.1007/s11356-014-2619-z.

Wales, A. D. et R. H. Davies. 2015. "Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens." *Antibiotics* 4 (4): 567-604. https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567.

Wallace, J. S. et D. S. Aga. 2016. "Enhancing extraction and detection of veterinary antibiotics in solid and liquid fractions of manure." *Journal of Environmental Quality* 45: 471-479. https://doi.org/10.2134/jeq2015.05.0246.

Walters, E., K. McClellan et R. U. Halden. 2010. "Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms." *Water Research* 44 (20): 6011-6020. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.051.

Wand, M. E., L. J. Bock, L. C. Bonney et J. M. Sutton. 2017. "Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (1): e01162-16. https://doi.org/10.1128/aac.01162-16.

Wang, F.-H., M. Qiao, Z. Chen, J.-Q. Su et Y.-G. Zhu. 2015. "Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest." *Journal of Hazardous Materials* 299: 215-221. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.028.

Webber, M. A., R. N. Whitehead, M. Mount, N. J. Loman, M. J. Pallen et L. J. V. Piddock. 2015. "Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (8): 2241-2248. https://doi.org/10.1093/jac/dkv109.

Wegst-Uhrich, S. R., D. A. G. Navarro, L. Zimmerman et D. S. Aga. 2014. "Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides." *Chemistry Central Journal* 8 (1): 5. https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-5.

Werner, J. J., W. A. Arnold et K. McNeill. 2006. "Water hardness as a photochemical parameter: Tetracycline photolysis as a function of calcium concentration, magnesium concentration, and pH." *Environmental Science and Technology* 40 (23): 7236-7241. https://doi.org/10.1021/es060337m.

Werner, J. J., K. McNeill et W. A. Arnold. 2009. "Photolysis of chlortetracycline on a clay surface." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (15): 6932-6937. https://doi.org/10.1021/jf900797a.

Wesgate, R., P. Grasha et J.-Y. 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): 458-464. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.009.

Whipps, J. M. 2001. "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere." *Journal of Experimental Botany* 52 (suppl_1): 487-511. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487.

Wiest, L., T. Chonova, A. Berge, R. Baudot, F. Bessueille-Barbier, L. Ayouni-Derouiche et E. Vulliet. 2018. "Two-year survey of specific hospital wastewater treatment and its impact on pharmaceutical discharges." *Environmental Science and Pollution Research* 25: 9207-9218. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9662-5.

Wright, G. D. 2005. "Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification." *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (10): 1451-1470. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002.

Wright, G. D. 2007. "The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity." *Nature Reviews Microbiology* 5 (3): 175-186. https://doi.org/10.1038/nrmicro1614.

Wu, Q., Z. Que, Z. Li, S. Chen, W. Zhang, K. Yin et H. Hong. 2018. "Photodegradation of ciprofloxacin adsorbed in the intracrystalline space of montmorillonite." *Journal of Hazardous Materials* 359: 414-420. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.041.

Xie, W. â. Y., Q. Shen et F. J. Zhao. 2018. "Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review." *European Journal of Soil Science* 69 (1): 181-195. https://doi.org/10.1111/ejss.12494.

Xing, Y., X. Chen, J. Zhuang et X. Chen. 2015. "What happens when pharmaceuticals meet colloids." *Ecotoxicology* 24 (10): 2100-2114. https://doi.org/10.1007/s10646-015-1557-y.

Xu, S., S. Sura, R. Zaheer, G. Wang, A. Smith, S. Cook, A. Olson, A. Cessna, F. Larney et T. McAllister. 2016. "Dissipation of antimicrobial resistance determinants in composted and stockpiled beef cattle manure." *Journal of Environment Quality* 45: 528–536. https://doi.org/10.2134/jeq2015.03.0146.

You, Y., S. C. Rankin, H. W. Aceto, C. E. Benson, J. D. Toth et Z. Dou. 2006. "Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9): 5777-5783. https://doi.org/10.1128/AEM.00791-06.

Youenou, B., E. Brothier et S. Nazaret. 2014. "Diversity among strains of *Pseudomonas aeruginosa* from manure and soil, evaluated by multiple locus variable number tandem repeat analysis and antibiotic resistance profiles." *Research in Microbiology* 165 (1): 2-13. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.10.004.

Youenou, B., S. Favre-Bonte, J. Bodilis, E. Brothier, A. Dubost, D. Muller et S. Nazaret. 2015. "Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles." *Genome Biol Evol* 7 (9): 2484-505. https://doi.org/10.1093/gbe/evv161.

Youngquist, C. P., S. M. Mitchell et C. G. Cogger. 2016. "Fate of antibiotics and antibiotic resistance during digestion and composting: A review." *Journal of Environmental Quality* 45 (2): 537-45. https://doi.org/10.2134/jeq2015.05.0256.

Yu, K., P. Li, Y. He, B. Zhang, Y. Chen et J. Yang. 2020. "Unveiling dynamics of size-dependent antibiotic resistome associated with microbial communities in full-scale wastewater treatment plants." *Water Research* 187: 116450. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116450.

Zarfl, C., J. Klasmeier et M. Matthies. 2009. "A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils." *Chemosphere* 77 (6): 720-726. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.035.

Zhang, H. et C.-H. Huang. 2005a. "Oxidative transformation of fluoroquinolone antibacterial agents and structurally related amines by manganese oxide." *Environmental Science and Technology* 39 (12): 4474-4483. https://doi.org/10.1021/es048166d.

Zhang, H. et C.-H. Huang. 2005b. "Reactivity and transformation of antibacterial N-oxides in the presence of manganese oxide." *Environmental Science and Technology* 39 (2): 593-601. https://doi.org/10.1021/es048753z.

Zhang, M., L. Y. He, Y. S. Liu, J. L. Zhao, W. R. Liu, J. N. Zhang, J. Chen, L. K. He, Q. Q. Zhang et G. G. Ying. 2019. "Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting." *Science of The Total Environment* 650 (Pt 1): 1363-1370. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.147.

Zhang, Q., C. Yang, Z. Dang et W. Huang. 2011. "Sorption of tylosin on agricultural soils." *Soil Science* 176 (8).

Zhang, T., K. Fukuda, E. Topp, Y.-G. Zhu, K. Smalla, J. M. Tiedje et D. G. J. Larsson. 2020. "Editorial: The environmental dimension of antibiotic resistance." *FEMS Microbiology Ecology* 96 (8). https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa130.

Zhang, Y., S. A. Boyd, B. J. Teppen, J. M. Tiedje et H. Li. 2014. "Organic acids enhance bioavailability of tetracycline in water to *Escherichia coli* for uptake and expression of antibiotic resistance." *Water Research* 65: 98-106. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.021.

Zhang, Y., S. A. Boyd, B. J. Teppen, J. M. Tiedje, W. Zhang, D. Zhu et H. Li. 2018. "Bioavailability of tetracycline to antibiotic resistant *Escherichia coli* in water-clay systems." *Environmental Pollution* 243: 1078-1086. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.059.

Zhao, H., J. L. Zhou et J. Zhang. 2015. "Tidal impact on the dynamic behavior of dissolved pharmaceuticals in the Yangtze Estuary, China." *Science of The Total Environment* 536: 946-954. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.055.

Zhao, J. L., Y. S. Liu, W. R. Liu, Y. X. Jiang, H. C. Su, Q. Q. Zhang, X. W. Chen, Y. Y. Yang, J. Chen, S. S. Liu, C. G. Pan, G. Y. Huang et G. G. Ying. 2015. "Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region." *Environmental Pollution* 198: 15-24. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.026.

Zhao, W.-H. et Z.-Q. Hu. 2013. "Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria." *Critical Reviews in Microbiology* 39 (1): 79-101. https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460.

Zhao, Y., T. Cocerva, S. Cox, S. Tardif, J.-Q. Su, Y.-G. Zhu et K. K. Brandt. 2019. "Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils." *Science of The Total Environment* 656: 512-520. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.372.

10.2 Normes

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

NF EN 12579 (décembre 2013) - Amendements organiques et supports de culture – Échantillonnage

Normes FD X 50-171 - ISO 8402 - Système de management de la qualité - Indicateurs et tableaux de bord

10.3 Législation et réglementation

10.3.1 Européennes

Directive n° 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

Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires.

Règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale.

Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE).

Règlement (UE) n° 358/2014 de la Commission du 9 avril 2014 modifiant les annexes II et V du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques

Règlement (UE) 2020/741 du Parlement européen et du Conseil du 25 mai 2020 relatif aux exigences minimales applicables à la réutilisation de l'eau.

Décision d'exécution (UE) n° 2013/652/UE de la Commission du 12 novembre 2013 concernant la surveillance et la présentation de rapports relatifs à la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries zoonotiques et commensales [notifiée sous le numéro C(2013) 7145]

Décision d'exécution de la Commission du 24 avril 2014 concernant la non-approbation de certaines substances actives biocides en vertu du règlement (UE) no 528/2012 du Parlement européen et du Conseil.

Décision d'exécution (UE) n° 2015/495 du 20 mars 2015 établissant une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil (Abrogée)

Décision d'exécution (UE) n° 2016/110 DE LA COMMISSION du 27 janvier 2016 n'approuvant pas le triclosan en tant que substance active existante destinée à être utilisée dans les produits biocides du type de produits 1.

Décision d'exécution (UE) n° 2018/840 de la Commission du 05 juin 2018 établissant une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la décision d'exécution (UE) 2015/495 de la Commission.

10.3.2 Françaises

Loi n° 2014-1170 du 13 octobre 2014 d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt

Loi n° 2020-105 du 10 février 2020 relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire

Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances ATB d'importance critique

Arrêté du 9 juin 2000 relatif à l'abattage des animaux de boucherie accidentés.

Arrêté du 30 avril 2004 modifié relatif aux prescriptions applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation sous la rubrique n° 2210 « abattage d'animaux ».

Arrêté du 7 septembre 2009 modifié fixant les prescriptions techniques applicables aux installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO5

Arrêté du 25 janvier 2010 modifié établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement

Arrêté du 2 août 2010 modifié relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts

Arrêté du 27 avril 2012 relatif aux modalités de l'exécution de la mission de contrôle des installations d'assainissement non collectif

Arrêté du 21 juillet 2015 modifié relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO5

Arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances ATB d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue à l'article R. 5141-117-2

Arrêté du 24 août 2017 modifiant l'arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO5

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2016 -SA- 0 2 5 2

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

COURRIER ARRIVE
05 DEC. 2016
DIRECTION GENERALE

Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer
Ministère des affaires sociales et de la santé
Ministère de l'agriculture, de l'agro-alimentaire et de la forêt

Paris le 16 NOV. 2016

Le Directeur général de la prévention des risques

Le Directeur général de la santé

Le Directeur général de l'alimentation

à

Monsieur le Directeur général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail
14, rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT Cedex

Objet : Antibiorésistance et environnement - Etat de la contamination des milieux par les antibiotiques et les bactéries pathogènes résistantes et mécanismes de développement de l'antibiorésistance dans l'environnement.

Les antibiotiques ont permis, depuis la généralisation de leur utilisation, en médecine humaine comme en médecine animale, de combattre des maladies bactériennes autrefois difficiles voire impossibles à soigner. Cependant, les mésusages des antibiotiques augmentent inévitablement les risques de sélection de bactéries résistantes dont l'impact en santé publique est majeur.

La place du volet environnemental dans le traitement de la question de l'antibiorésistance est essentielle. En effet les déchets et les effluents humains et d'élevage constituent des sources de contamination des milieux naturels par les antibiotiques et les bactéries résistantes. En outre, d'autres produits chimiques (biocides, métaux lourds…) trouvés dans certains milieux, peuvent contribuer à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques. L'environnement est également une source de diffusion des bactéries (multi)résistantes et de contamination des personnes et des animaux.

Suite au rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques rendu par le Dr Carlet à la demande de la ministre chargée de la Santé un comité interministériel pour la santé dédié à l'antibiorésistance se tiendra à l'automne 2016 et proposera une feuille de route comprenant les actions à mettre en place dans le domaine de l'environnement.

De même, suite aux travaux de la conférence environnementale de fin 2014, la mesure 56 de la feuille de route 2015 pour la transition écologique indique qu'« une expertise sera conduite

par l'Anses afin d'objectiver les connaissances relatives aux mécanismes participant au développement de l'antibiorésistance dans l'environnement. L'objectif est de comprendre les mécanismes mis en œuvre dans l'environnement dans l'apparition et la diffusion des résistances bactériennes afin d'orienter les mesures à mettre en place pour limiter l'émergence de nouvelles résistances ».

Les résultats de cette expertise viseront, *in fine*, à définir de nouvelles actions de réduction du risque pour ce qui concerne les interfaces entre médecines humaine et vétérinaire, et environnement.

Dans ce contexte, les ministères en charge de la santé, de l'agriculture et de l'environnement demandent à l'Anses de réaliser une synthèse des données et une consultation d'experts afin de :

1. **dresser un état des lieux des connaissances actuelles sur la contamination des différents compartiments environnementaux (sols et eaux) par les antibiotiques et les bactéries pathogènes résistantes.** L'expertise pourra inclure des recommandations pour l'élaboration d'une cartographie nationale des contaminations, en tenant compte de la diversité des méthodes et indicateurs utilisés pour détecter et mesurer l'antibiorésistance. Les résultats de cette expertise pourront être utilisés dans le cadre des actions menées par le comité interministériel pour la santé.

2. **déterminer les mécanismes sous-jacents à la sélection et à la transmission de l'antibiorésistance via l'environnement.** L'étude montrera, sur la base des publications sélectionnées, quels mécanismes contribuant au développement et à l'expansion de l'antibiorésistance ont été identifiés dans l'environnement (sources de contamination, voies de transmission à la faune et la flore notamment). Elle estimera également l'impact de l'utilisation des antibiotiques (également des résidus et métabolites) et d'autres molécules (biocides, métaux lourds, ...) sur la sélection de l'antibiorésistance. L'étude identifiera enfin les éléments d'analyse éventuellement manquants et les actions opérationnelles ou de recherche pouvant être mises en œuvre pour les couvrir, en lien avec les travaux du comité interministériel pour la santé. Des recommandations quant aux mesures à mettre en place par les pouvoirs publics et autres acteurs pour limiter l'émergence de nouvelles résistances via l'environnement pourront être faites.

Nous vous précisons que parallèlement à cette saisine, le commissariat général au développement durable du MEEM a lancé en août 2016 un appel à proposition pour la réalisation d'une revue systématique des connaissances sur les solutions de lutte contre la contamination des milieux naturels en antibiotiques, résidus et bactéries résistantes.

Enfin, à partir des résultats de votre expertise, nous vous remercions de bien vouloir nous transmettre un rapport complet pour le 31 mai 2017, la première partie sur l'état des lieux de la contamination des milieux pouvant donner lieu à un premier rendu pour le premier trimestre 2017.

Le Directeur général de la santé	Le Directeur général de l'alimentation	Le Directeur général de la prévention des risques
Benoît VALLET	Patrick DEHAUMONT	Marc MORTUREUX

Annexe 2 : Actions institutionnelles pour lutter contre l'antibiorésistance

Cette annexe présente les actions institutionnelles de lutte contre l'ABR prises aux niveaux international, européen et français, avec une attention particulière à celles relatives à l'ABR dans l'environnement, du point de vue de la santé humaine.

1) Au niveau international

a) Assemblée générale des Nations Unies

La Déclaration politique de 2016 de la Réunion de haut niveau de l'Assemblée générale des Nations Unies sur la résistance aux antimicrobiens a marqué une étape décisive dans l'engagement du monde à combattre la résistance aux antimicrobiens (Assemblée générale des Nations Unies 2016). Dans cette déclaration, les États membres ont demandé au Secrétaire général de constituer, en concertation avec l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS), un groupe spécial de coordination inter-institutions (IACG), coprésidé par le Cabinet du Secrétaire général et le Directeur général de l'OMS. Ce groupe a été chargé « *de donner des indications pratiques quant aux approches à suivre pour que l'action mondiale menée pour lutter contre la résistance aux agents antimicrobiens soit efficace et durable* ».

L'IACG a rendu son rapport final en 2019 (IACG 2019) dans lequel il soumet des recommandations, au Secrétaire Général des Nations Unies, aux États membres et aux autres parties prenantes dans la réponse mondiale à la résistance antimicrobienne. Le rapport indique que « *la résistance aux antimicrobiens est un problème mondial qui menace un siècle entier de progrès dans le domaine de la santé, en même temps que la réalisation des objectifs de développement durable* » qui « *aura des effets catastrophiques dans moins d'une génération* ». Par conséquent, il recommande que des actions urgentes soient déployées à l'échelle planétaire.

Pour cela, considérant que les facteurs de la résistance aux antimicrobiens sont à rechercher du côté des êtres humains, des animaux, des végétaux, des denrées alimentaires et de l'environnement, le rapport souligne la nécessité d'une démarche durable, fondée sur la stratégie « *Un monde, une santé* » et recommande que les organismes tripartites (FAO, OIE et OMS), de concert avec la branche Environnement des Nations Unies, d'autres organismes des Nations Unies et la Banque mondiale, renforcent davantage l'action conjointe « *Un monde, une santé* », en renforçant la capacité organisationnelle nationale et en fournissant un financement de base adéquat et durable pour les activités liées à la résistance aux antimicrobiens.

En ce qui concerne la résistance aux antimicrobiens et l'environnement, les principales conclusions et recommandations tirées du rapport sont les suivantes :

- Bien que les preuves restent limitées, l'inquiétude augmente sur l'impact de la résistance aux antimicrobiens sur l'environnement et les écosystèmes naturels en raison de la surutilisation et du rejet d'antimicrobiens et de BRA dans les fumiers, dans les effluents des centres de soins, d'industries pharmaceutiques, des sites de productions animales et végétales commerciales et dans les pisciculture. Ce problème pourrait être accéléré par le réchauffement climatique.
- De nombreux plans d'action nationaux se concentrent principalement sur la santé de l'Homme et du bétail. Ils accordent une attention insuffisante aux plantes, à la production de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux, à la gestion des déchets et à l'environnement.
- Bien que l'impact de la résistance aux antimicrobiens sur la santé humaine et la production alimentaire ait fait l'objet d'une attention considérable, l'engagement politique et l'engagement des parties prenantes restent insuffisants dans ces domaines aux niveaux mondial et national. Les efforts déployés pour lutter contre la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement accusent un retard considérable en matière d'attention, de plaidoyer, d'engagement politique, d'engagement et de base de données probantes. Un leadership,

une coordination et une responsabilisation plus solides sont nécessaires à tous les niveaux pour relever ces défis.

- Un effort soutenu est nécessaire pour stimuler l'innovation dans le domaine des médicaments, des diagnostics, des vaccins et des solutions alternatives aux antimicrobiens pour la santé humaine, la santé des animaux terrestres et aquatiques, la santé des végétaux, ainsi que pour la gestion des déchets et de l'environnement.

Les conclusions du rapport de l'IACG (2019) ont été adoptées par l'Assemblée générale des Nations Unies (2019).

b) Partenariat tripartite (OMS, FAO, OIE)

Depuis 2010, l'OMS, la FAO et l'OIE se sont engagées dans une alliance tripartite (OMS, FAO et OIE 2010). En 2017, les Organisations ont publié leur deuxième document stratégique commun (OMS, FAO et OIE 2017). En juin 2018, elles ont officiellement signé un Protocole d'accord réaffirmant leur engagement et établissant les responsabilités respectives de ces trois organisations dans le combat contre les maladies ayant des conséquences sanitaires et économiques majeures, en particulier les zoonoses. La résistance aux antimicrobiens est une des trois questions prioritaires de l'Alliance tripartite. L'Alliance tripartite s'accorde en particulier à :

- Soutenir la mise en œuvre en cours du Plan d'action mondial contre la résistance aux antimicrobiens (OMS 2016a) ;
- Développer un code volontaire de conduite afin de renforcer la mise en œuvre des normes internationales destinées à une utilisation responsable et prudente des antimicrobiens.

i) Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens

En mai 2015, l'Assemblée mondiale de la Santé a adopté un Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens (OMS 2016a), qui définit 5 objectifs :

- Mieux faire connaître et comprendre le problème de la résistance aux antimicrobiens grâce à une communication, une éducation et une formation efficaces ;
- Renforcer les connaissances et les bases factuelles par la surveillance et la recherche ;
- Réduire l'incidence des infections par des mesures efficaces d'assainissement, d'hygiène et de prévention des infections ;
- Optimiser l'usage des médicaments antimicrobiens en santé humaine et animale ;
- Dégager les arguments économiques en faveur d'investissements durables qui tiennent compte des besoins de tous les pays et accroître les investissements dans la mise au point de nouveaux médicaments, outils diagnostiques, vaccins et autres interventions.

Ce plan recommandait à tous les États membres d'élaborer un plan national intersectoriel de maîtrise de la résistance d'ici 2017.

ii) Monitoring and evaluation of the global action plan on antimicrobial resistance - Framework and recommended indicators.

En 2019, le partenariat tripartite a publié un rapport décrivant un cadre de suivi et d'évaluation du Plan d'action mondial sur la résistance aux antimicrobiens (OMS, FAO et OIE 2019b). Ce cadre est destiné à être déployé à l'échelle nationale, régionale et mondiale, et vise à recueillir des informations sur la manière dont le plan d'action mondial est mis en œuvre, et avec quels effets. Il fournit une liste d'indicateurs recommandés qui doivent être compilés au niveau national, et par le Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (GLASS) (OMS 2016b), l'initiative de l'OIE pour la collecte de données sur l'utilisation mondiale des antimicrobiens (OIE 2016) et l'enquête tripartite d'auto-évaluation des pays sur la RAM (TrACSS) (OMS, FAO et OIE 2019a).

Le cadre de suivi et d'évaluation du Plan d'action mondial sur la résistance aux antimicrobiens comprend deux séries d'activités. La première concerne la mise en œuvre des actions, en lien par

exemple avec le suivi du plan, le financement, les progrès du partenariat tripartite et la recherche et développement. La deuxième série d'activités concerne les résultats et les impacts de la mise en œuvre des actions et comporte six volets :

- Le suivi des résultats du Plan d'action mondial pour permettre des comparaisons entre pays ;
- Le suivi de l'utilisation des antimicrobiens et des schémas de résistance ;
- Le suivi des investissements ;
- L'évaluation de la mesure dans laquelle la recherche et développement sert à la mise au point de nouveaux produits de santé humaine, animale et végétale (y compris diagnostics, vaccins et antimicrobiens), ainsi que de leur disponibilité et de leur accessibilité financière ;
- L'évaluation de l'impact de l'action sur la santé humaine et animale et le développement économique ;
- L'identification des meilleures pratiques et des domaines dans lesquels l'octroi de ressources prioritaires aura un impact plus important.

Le cadre utilise un ensemble minimum d'indicateurs de base, avec la recommandation d'en utiliser davantage lorsque les capacités et les ressources sont disponibles. La surveillance de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement n'est pas explicitement recommandée dans les indicateurs de base. Toutefois, il est recommandé que les travaux futurs comprennent « *des efforts pour comprendre la transmission à travers les interfaces humaines, animales et environnementales, qui peuvent être surveillés en suivant les niveaux des mécanismes de résistance, tels que les BLSE, chez les animaux, l'environnement et les porteurs humains, et ceux qui ont des infections à E. coli (par exemple le protocole Tricycle)*[58]. »

iii) Réunion d'experts FAO/OMS sur la résistance aux antimicrobiens d'origine alimentaire : rôle de l'environnement

En juin 2018, la FAO et l'OMS ont organisé, en collaboration avec l'OIE, une réunion conjointe « Réunion d'experts FAO/OMS sur la résistance aux antimicrobiens d'origine alimentaire : rôle de l'environnement ». Cette décision faisait suite à celle de la Commission du Codex Alimentarius et du Groupe intergouvernemental spécial du Codex sur la résistance aux antimicrobiens, de réviser le Code d'usages du Codex pour réduire au minimum et maîtriser la résistance aux antimicrobiens (CAC/RCP 61-2005) et élaborer de nouvelles directives sur les programmes de surveillance concernant la résistance aux antimicrobiens dans l'alimentation. Les principales conclusions sont tirées du rapport de la réunion du groupe d'experts (FAO-OMS 2018).

Il existe des preuves scientifiques évidentes que les aliments d'origine végétale peuvent servir de véhicule à l'exposition alimentaire à des BRA. Des efforts concertés devraient donc être déployés pour atténuer leur contamination à tous les stades de la chaîne alimentaire, de la production à la consommation. Pour atteindre cet objectif, de bonnes pratiques agricoles devraient être utilisées. Les meilleures pratiques de gestion devraient être respectées en ce qui concerne l'utilisation de matières d'origine humaine (boues de STEU ; biosolides) ou animale (fumiers, lisiers) dans les environnements de production alimentaire primaire. Les antimicrobiens ne devraient être utilisés dans la production agricole que conformément aux recommandations des fournisseurs dans le contexte des stratégies de lutte intégrée contre les ravageurs des cultures (organismes animaux qui attaquent les plantes cultivées ou les récoltes stockées). Une meilleure compréhension du rôle des environnements de production alimentaire dans la transmission des BRA et des GRA d'origine alimentaire et du rôle de l'utilisation agricole des antimicrobiens et des agents co-sélecteurs potentiels (ex : ions cuivre et éventuellement d'autres antimicrobiens) mènera à l'élaboration d'outils

[58] http://resistancecontrol.info/2017/the-esbl-tricycle-amr-surveillance-project-a-simple-one-health-approach-to-global-surveillance/

et stratégies supplémentaires pour réduire la présence de GRA et BRA dans les aliments. Pour réduire en amont la contamination de l'eau et des sols par les fèces humaines et animales et la résistance aux ATB préexistante dans l'environnement, une formation et une éducation supplémentaires sur les ATB (utilisation et résistance) dans les systèmes de production alimentaire terrestres et aquatiques pourraient également être utiles.

c) Programme des Nations Unies pour l'environnement

Le PNUE (2017) a considéré la résistance aux antimicrobiens comme une question émergente d'ordre environnemental revêtant une dimension mondiale et a publié un rapport visant « *à mettre en exergue la dimension environnementale du problème, et à souligner la nécessité de tenir compte de l'exposition de l'environnement aux antimicrobiens dans la prise de mesures de lutte contre l'antibiorésistance.* »

Dans son 6e *Global Environment Outlook*, le PNUE (2019) a mis l'accent sur les ATB comme l'une des catégories de contaminants environnementaux les plus préoccupantes :

- Les sociétés modernes produisent et habitent l'environnement le plus chimiquement intense que l'Homme n'ait jamais connu. Les catégories courantes de produits chimiques comprennent les produits chimiques pharmaceutiques et vétérinaires, les pesticides, les ATB, les retardateurs de flamme, les plastifiants et les nanomatériaux. Même les produits chimiques les plus connus, utilisés depuis des générations dans l'agriculture et l'industrie, sont aujourd'hui utilisés de manière si intensive et à des concentrations telles qu'ils nécessitent des programmes de surveillance et d'évaluation responsables.
- Les effets des ATB et des agents co-sélecteurs dans l'environnement sont notés avec inquiétude.
- Les produits pharmaceutiques sont souvent mal manipulés (depuis l'extraction des matières premières qui entrent dans leurs compositions jusqu'à leurs éliminations) avec plus de 200 substances différentes signalées dans les eaux des rivières du monde entier. Les bactéries résistantes aux ATB ont évolué et se sont propagées en raison d'une mauvaise gestion des antibactériens. Le développement de la résistance aux antimicrobiens chez les pathogènes s'est récemment accéléré et peut survenir à des concentrations d'exposition aux ATB plus faibles, en présence d'ETM et d'autres contaminants que l'on trouve généralement dans les mêmes réservoirs contaminés. La présence de ces contaminants dans le milieu naturel résulte du rejet des eaux usées des STEU qui ne sont pas équipées pour éliminer efficacement ces composés dangereux et de la mauvaise gestion de leur utilisation pour la production agricole.

d) Travaux de l'OMS d'intérêt pour ce rapport

i) Listes des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques (OMS 2017a)

L'OMS (2017a) a dressé une liste des agents pathogènes prioritaires pour la santé humaine constituée de bactéries résistantes aux antibiotiques afin de contribuer à établir des priorités pour la recherche et le développement de nouveaux traitements antibiotiques.

À partir des données disponibles, chaque BRA a été évaluée sur la base de dix critères : mortalité toutes causes confondues, poids pour les soins de santé et la communauté, prévalence de la résistance, tendance décennale de la résistance, transmissibilité, possibilité de prévention en milieu hospitalier et communautaire, traitabilité et réserve actuelle, par un panel d'experts. Les agents pathogènes retenus (tableau XXV) ont été regroupés selon trois niveaux de priorité : critique, élevé et moyen.

Tableau XXV. Liste de l'OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques (OMS 2017a).

Priorité 1 : Critique
Acinetobacter baumannii, résistant aux carbapénèmes *Pseudomonas aeruginosa*, résistant aux carbapénèmes *Enterobacteriaceae**, résistantes aux carbapénèmes, résistantes aux C3G
Priorité 2 : Élevée
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*, résistant aux fluoroquinolones *Salmonella* spp., résistant aux fluoroquinolones *Neisseria gonorrhoeae*, résistant C3G, résistant aux fluoroquinolones
Priorité 3 : Moyenne
Streptococcus pneumoniae, non sensible aux pénicillines *Haemophilus influenzae*, résistant à l'ampicilline *Shigella* spp., résistant aux fluoroquinolones

Les mycobactéries (y compris *Mycobacterium tuberculosis*), n'ont pas fait l'objet d'un examen en vue de leur inclusion dans cet exercice de priorisation car il s'agit déjà d'une priorité établie au niveau mondial pour laquelle de nouveaux traitements innovants sont nécessaires de toute urgence.

* *Enterobacteriaceae* inclus : *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp, *Morganella* spp.

ii) Liste des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine

Depuis 2005, l'OMS met régulièrement à jour une liste des ATB d'importance critique pour la médecine humaine rassemblant l'ensemble des ATB utilisés en médecine humaine (qui sont pour la plupart également employés en médecine vétérinaire), classés selon trois catégories en fonction de leur importance en médecine humaine. Cette liste est destinée à aider à la gestion de la résistance bactérienne, en veillant à ce que l'ensemble des ATB, surtout ceux d'importance critique, soient utilisés prudemment aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. La classification a été faite sur la base des critères suivants :

- Critère 1 (C1) : classe d'ATB qui est la seule, ou quasiment la seule, à permettre de traiter des infections humaines graves ;
- Critère 2 (C2) : classe d'ATB utilisée pour traiter des infections humaines dues : 1) à des bactéries qui sont d'origine non humaine mais peuvent être transmises à l'Homme, ou 2) à des bactéries qui peuvent acquérir des gènes de résistance d'une source non humaine ;
- Critère de priorité 1 (P1) : classe d'ATB qui est la seule ou une des rares permettant de traiter des infections humaines sévères, soit présentes chez un grand nombre de patients, soit de façon fréquente chez des patients hospitalisés ;
- Critère de priorité 2 (P2) : utilisation très fréquente de la classe d'antimicrobiens pour une indication quelconque en médecine humaine ou dans certains groupes à haut risque (ex : patients atteints d'infections graves dans les établissements de soins), leur usage risquant de favoriser la sélection de résistance ;
- Critère de priorité 3 (P3) : classe d'antimicrobiens utilisée dans le traitement d'infections humaines pour lesquelles il existe déjà de nombreuses preuves d'une transmission de bactéries résistantes (ex : *Salmonella* non typhoïdique spp. et *Campylobacter* spp.) ou de gènes de résistance (élevée pour *E. coli* et *Enterococcus* spp.) à partir de sources non humaines.

Le tableau XXVI présente la classification et le niveau de priorité des ATB considérés comme étant d'importance critique, d'importance élevée ou importants selon l'OMS (2019).

Tableau XXVI. Classification et niveau de priorité des antibiotiques considérés comme d'importance critique, d'importance élevée ou importants par l'OMS (2019).

		Classes d'ATB	Critère (O = oui)				
			C1	C2	P1	P2	P3
Importance critique	Priorité majeure	Céphalosporines (3e, 4e et 5e générations)	O	O	O	O	O
		Glycopeptides	O	O	O	O	O
		Macrolides et kétolides	O	O	O	O	O
		Polymyxines	O	O	O	O	O
		Quinolones	O	O	O	O	O
		Aminosides	O	O		O	O
		Ansamycines	O	O	O	O	
		Carbapénèmes et autres pénèmes	O	O	O	O	
		Glycylcyclines	O	O	O		
		Lipopeptides	O	O	O		
		Monobactames	O	O	O		
		Oxazolidinones	O	O	O		
		Pénicillines (anti-Pseudomonas)	O	O		O	
		Pénicillines (aminopénicillines)	O	O		O	O
		Pénicillines (aminopénicillines avec inhibiteurs de β-lactamases)	O	O		O	O
		Dérivés d'acide phosphonique	O	O	O	O	
		Médicaments antituberculeux ou contre d'autres infections mycobactériennes	O	O	O	O	
Importance élevée		Phénicolés		O	NA		
		Céphalosporines (1e et 2e générations) et céphamycines		O			
		Lincosamides		O			
		Pénicillines (amidinopénicillines)					
		Pénicillines (antistaphylococciques)		O			
		Pénicillines (spectre étroit)		O			
		Acides pseudomoniques		O			
		Riminofenazines	O				
		Stéroïdes antibactériens		O			
		Streptogramines		O			
		Sulfamidés, inhibiteurs de la dihydrofolate réductase et associations		O			
		Sulfones	O				
		Tétracyclines	O				
Important		Aminocyclitols			NA		
		Peptides cycliques					
		Dérivés du nitrofurane					
		Nitroimidazoles					
		Pleuromutilines					

NA=non applicable.

2) Union européenne

a) Le plan d'action européen de lutte contre l'antibiorésistance

La résistance aux ATB fut l'une des priorités de la présidence néerlandaise de l'Union européenne, conduisant le Conseil européen à adopter le 17 juin 2016 une résolution pour renforcer la lutte contre l'ABR. À l'image de l'OMS, l'UE a invité les États membres à disposer d'un plan national intersectoriel à l'horizon mi-2017. La résolution inclut également des objectifs quantifiés. En suite de cette résolution, le 29 juin 2017, la Commission européenne a publié son plan d'action pour combattre la résistance aux ATB avec comme principe de base « Une seule santé ».

Ce plan d'action reconnaît le rôle de l'environnement dans la promotion et la transmission de la résistance aux antimicrobiens, comme l'illustrent des passages clés. Il prévoit par exemple, d'examiner les possibilités d'une surveillance harmonisée de la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement, notamment par l'intermédiaire du réseau des laboratoires nationaux de référence dans le secteur vétérinaire. Il prévoit aussi mettre à disposition, de manière régulière, des informations sur la résistance aux antimicrobiens dans une approche « Une seule santé », permettant de présenter une vue d'ensemble de la situation épidémiologique concernant ce phénomène dans les États membres et au niveau de l'Union. Pour cela, la Commission a mis en place, au début de l'année 2017, un réseau d'experts gouvernementaux qui réunit des spécialistes de la santé humaine, de la santé animale et de l'environnement, ainsi que des agences scientifiques de l'Union qui travaillent dans les secteurs de la santé humaine et animale (ECDC, EMA et EFSA). Les membres de ce réseau « Une seule santé » sur la résistance aux antimicrobiens s'emploient à favoriser l'apprentissage mutuel, à partager les idées innovantes, à rechercher des consensus, à comparer les progrès accomplis dans les domaines essentiels et, le cas échéant, à accélérer les efforts déployés au niveau national pour endiguer le phénomène.

La Commission entend aussi (i) adopter une politique de l'Union concernant les produits pharmaceutiques dans l'environnement, (ii) exploiter autant que possible les données de surveillance existantes, par exemple celles issues de la surveillance de la liste de vigilance au titre de la directive cadre sur l'eau, afin d'améliorer les connaissances disponibles sur l'apparition et la propagation des agents antimicrobiens dans l'environnement, y compris au moyen de la plateforme d'information pour la surveillance des substances chimiques pour accéder aux données de surveillance pertinentes; (iii) renforcer le rôle du comité scientifique des risques sanitaires et environnementaux (CSRSE) en tant que fournisseur d'expertise sur les questions de résistance aux antimicrobiens liées à l'environnement.

La Commission souhaite également :

- Soutenir la recherche visant à combler les lacunes dans les connaissances sur le rejet de micro-organismes résistants et d'antimicrobiens dans l'environnement et sur leur propagation ;
- Étudier des méthodologies d'évaluation des risques, avec l'appui des agences et organismes scientifiques, et les utiliser pour évaluer les risques que représente, pour la santé humaine et animale, la présence d'antimicrobiens dans l'environnement ;
- Soutenir la recherche en vue de la mise au point de nouveaux outils pour le suivi des antimicrobiens et des micro-organismes résistants aux antimicrobiens dans l'environnement ;
- Soutenir la conception de technologies permettant la dégradation rapide et efficace des antimicrobiens dans les eaux usées et l'environnement, et réduisant la propagation de la résistance aux antimicrobiens.

Plus spécifiquement dans le cadre de la stratégie européenne de recherche, la résolution du 17 juin 2016 soutient aussi le programme d'initiative conjointe « *Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance* - JPIAMR ». Cette programmation scientifique a défini un Agenda Stratégique de Recherche incluant six axes majeurs, dont l'un porte spécifiquement sur les liens entre ABR et environnement. Au-delà de l'ouverture d'appels à projets, le JPIAMR finance également des ateliers et la constitution de réseaux sur le thème de l'ABR et l'environnement. Un

atelier s'est notamment tenu les 27-28 septembre 2017 à l'Université de Gothenburg (Suède). Deux réseaux de chercheurs ont également été financés début 2018. Toutes ces actions visent à mieux définir les lignes stratégiques de recherche en matière d'ABR en lien avec les problématiques environnementales.

b) Actions des agences de l'Union européenne

Depuis plusieurs années, des travaux inter-agences (ECDC, EMA, EFSA) sont menés dans le domaine de l'ABR. Ils contribuent à décloisonner les périmètres spécifiques de chacune de ces agences, et à renforcer l'approche « Une seule santé » mis en avant par le plan d'action européen.

À titre d'exemple, l'Union européenne produit régulièrement un rapport sur l'ABR chez les bactéries zoonotiques et indicatrices chez l'Homme, les animaux et les produits alimentaires, dont les données sont fournies par l'ECDC et l'EFSA. Également, le *Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis* (JIACRA) est un rapport sur les relations entre les consommations d'ATB en médecine humaine et vétérinaire et les niveaux d'ABR chez l'Homme et l'animal. Le premier rapport JIACRA a été publié en janvier 2015, le second en juillet 2017, et le troisième est prévu pour décembre 2020. En octobre 2017, l'ECDC, l'EMA et l'EFSA ont publié une opinion conjointe sur les indicateurs à suivre en matière de consommation d'ATB et d'ABR dans les secteurs humain et vétérinaire (animaux de production uniquement), qui définit des indicateurs primaires et secondaires (ECDC, EFSA et EMA 2017). À titre d'exemple, chez l'Homme, un indicateur primaire est la consommation totale d'ATB, limitée à l'usage parentéral, et exprimée en doses définies journalières pour 1000 habitants. L'indicateur équivalent chez l'animal est constitué des ventes d'ATB en mg de substance active par kg de poids vif estimé. Pour l'ABR chez l'Homme, les indicateurs primaires proposés sont la proportion d'isolats de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline et d'*Escherichia coli* résistants aux C3G. Chez l'animal, l'indicateur primaire proposé est la proportion agrégée d'isolats d'*Escherichia coli* dits « indicateurs » chez les poulets de chair, dindes, porcs et veaux, tels que collectés dans le cadre de la Décision 2013/652/EU. Au final, il est à noter qu'à ce jour, ces travaux inter-agences abordent principalement des questions de visions croisées entre les deux médecines (humaine et vétérinaire), sans inclure d'apport réflexif particulier sur les questions environnementales. En revanche, des travaux spécifiques ont été menés de façon séparée, principalement par l'EMA. En février 2016, en raison de préoccupations liées au risque pour l'environnement et à l'augmentation potentielle de la prévalence des BRA causée par l'utilisation de produits contenant de l'oxyde de zinc, les Pays-Bas et la France ont engagé une procédure de saisine au titre de l'article 35 de la directive 2001/82/CE concernant tous les médicaments vétérinaires à administrer par voie orale contenant de l'oxyde de zinc. Ils ont en outre demandé à l'EMA d'examiner toutes les données disponibles et d'évaluer le rapport bénéfice/risque global pour les produits concernés. Le 16 mars 2017, l'EMA a terminé un examen de la sécurité et de l'efficacité de médicaments à usage vétérinaire contenant de l'oxyde de zinc pour une administration par voie orale à des espèces productrices de denrées alimentaires. L'EMA a conclu que le rapport bénéfice/risque global des médicaments à usage vétérinaire contenant de l'oxyde de zinc à administrer par voie orale chez les porcs était négatif, étant donné que les bénéfices de l'oxyde de zinc dans la prévention de la diarrhée chez le porc ne l'emportaient pas sur les risques pour l'environnement. L'EMA a reconnu qu'il existait un risque de co-sélection de résistance associé à l'utilisation de l'oxyde de zinc mais que, pour l'heure, ce risque ne pouvait être quantifié. Aucune mesure efficace permettant de gérer l'accumulation de zinc dans l'environnement n'ayant été identifiée, l'EMA a recommandé le refus de l'octroi d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et le retrait des AMM existantes pour les médicaments à usage vétérinaire contenant de l'oxyde de zinc.

Également, l'EMA a mis en consultation publique jusqu'au 31 août 2019 une proposition de rapport intitulé *Antimicrobial resistance in the environment: considerations for current and future risk assessment of veterinary medicinal products*. L'objectif de ce rapport est de fournir un état des connaissances sur l'(les) impact(s) potentiel(s) sur les écosystèmes, la santé animale et humaine, de la présence de résidus d'antimicrobiens et / ou de gènes de résistance aux antimicrobiens dans l'environnement résultant de l'utilisation de médicament vétérinaire. Il souligne notamment les difficultés de fournir, au vu des données actuelles, des recommandations claires pour une prise en compte de ce sujet dans les dossiers d'AMM. En particulier, il est noté que la contribution relative

des ATB vétérinaires au fardeau global de l'ABR dans l'environnement, et de ce fait sur la santé humaine et animale, n'est pas connue. En revanche, le rapport met en lumière la nécessité d'une prise en compte de cette problématique en aval de l'antibiothérapie, notamment dans le cadre du traitement des effluents d'élevage.

Enfin, très récemment, l'EFSA a saisi son panel BIOHAZ en vue de produire une opinion scientifique (prévue pour fin 2020) sur le rôle joué par l'environnement dans l'émergence et la dissémination de l'ABR *via* la chaîne alimentaire. L'un des experts du groupe *ad hoc* est également membre de l'ECDC, et l'EMA, l'EEA et la DG-Santé suivent les travaux en tant qu'observateurs.

3) En France

a) Les actions ministérielles de lutte contre l'antibiorésistance

i) En médecine humaine

Les premières actions gouvernementales visant à lutter contre l'ABR en France l'ont été en médecine humaine. Elles ont résulté du constat très préoccupant des taux de mortalité associés à l'ABR chez l'Homme. En effet, l'ABR est responsable du décès d'environ 12 500 personnes par an en France (Colomb-Cotinat *et al.* 2015). Le sujet de l'ABR a ainsi été reconnu comme un problème majeur de santé publique.

Le premier plan de lutte a été mis en place au début des années 2000, sous l'impulsion forte du Dr Bernard Kouchner, alors Ministre de la Santé. De nombreuses mesures portant sur les pratiques en antibiothérapie mais également sur la promotion des mesures préventives d'hygiène à l'hôpital (utilisation des solutions hydro-alcooliques) ont conduit à des résultats positifs dans plusieurs secteurs de la médecine. Une campagne de communication efficace (« *les ATB, c'est pas automatique* ») a permis de viser un public large, et notamment la population extra-hospitalière. Plus de 90 % des ATB utilisés en médecine humaine le sont en ville, et des mesures préventives ont également été mises en place dans ce secteur comme la vaccination anti-pneumococcique chez les enfants, qui a fortement contribué à la diminution de la prévalence des pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline.

Deux autres plans ministériels ont été lancés dans la continuité du premier, conduisant à une période globale et ininterrompue de 16 années (2000-2016) de politique publique contre l'ABR en médecine humaine.

Pour autant, les résultats restent mitigés et certains indicateurs montrent que la situation en médecine humaine n'est pas maîtrisée. En effet, si le recul de la prévalence des infections par SARM à l'hôpital doit être considéré comme une avancée indiscutable (diminution d'environ de moitié, de 30 % à 15 %), ce taux reste encore bien supérieur à celui mesuré dans d'autres pays d'Europe comparables, comme les Pays-Bas. On peut également citer l'augmentation de la prévalence des Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de dernières générations, notamment en ville.

Face à cette situation alarmante, la Ministre de la Santé Marisol Touraine a mandaté, en 2014, un groupe de travail piloté par le Professeur Jean Carlet, associant plus de 160 scientifiques et/ou médecins, chargé de proposer des actions pour lutter contre l'ABR en France en considérant les champs de la médecine humaine, vétérinaire et de l'environnement (voir § b)).

ii) En médecine vétérinaire :

Le premier plan ministériel en médecine vétérinaire (Ecoantibio 1, 2012-2016) a été mis en place en parallèle du troisième plan en médecine humaine (Plan national d'alerte sur les ATB, 2011-2016). Composé de cinq axes et de 40 mesures, le plan Ecoantibio 1 a affiché un objectif de réduction de 25 % de l'exposition des animaux aux ATB en 3 ans. Au-delà des mesures incitatives sur l'antibiothérapie raisonnée et la prévention des infections animales, ce plan a également été marqué par la mise en place de mesures réglementaires. Notamment, l'arrêté du 18 mars 2016 rend obligatoire la réalisation d'un antibiogramme avant toute prescription d'un ATB d'importance critique pour l'Homme (céphalosporines de dernières générations, fluoroquinolones). Ce même arrêté fixe

la liste des ATB dont l'usage est totalement interdit en médecine vétérinaire. Plus globalement, la loi d'Avenir Agricole du 13 octobre 2014 porte l'ensemble des bases réglementaires sur le sujet de l'ABR, et en premier lieu l'article 48 qui définit la notion d'ATB critiques et l'article 49 qui fixe l'objectif de réduction de 25 % en 3 ans. Au-delà de l'arrêté du 18 mars 2016 cité précédemment, d'autres ont porté sur l'interdiction des rabais, remises, ristournes sur la vente des ATB (13 octobre 2014), sur le retrait des ATB de la liste positive en élevage (19 décembre 2014) ou sur les bonnes pratiques d'emploi des ATB en médecine vétérinaire (22 juillet 2015).

Les résultats du plan Ecoantibio 1 ont été jugés positifs par l'ensemble des observateurs. Ainsi, l'exposition globale des animaux aux ATB a diminué de près de 40 % (tous ATB confondus) en 5 ans. Ce recul a été encore supérieur (autour de 80 %) pour l'exposition des animaux aux céphalosporines de dernières générations et aux fluoroquinolones. L'ABR a également diminué de façon importante dans les différentes espèces animales. Par exemple, la proportion des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux céphalosporines de dernières générations en filière volaille a diminué : passant de > 20 % en 2010 à < 2 % en 2018. Un plan Ecoantibio 2 (2017-2021) a été mis en place en suite du plan Ecoantibio 1, avec l'objectif de poursuivre et stabiliser les efforts engagés par l'ensemble des acteurs du monde animal (notamment éleveurs et vétérinaires).

b) Le rapport Carlet et la feuille de route interministérielle contre l'antibiorésistance

Le rapport « Tous ensemble, sauvons les ATB », également appelé « rapport Carlet », a été remis à la Ministre de la Santé en septembre 2015 (Carlet et Le Coz 2015) et a servi de base à la construction d'un cadre interministériel de lutte contre l'ABR, regroupant, de façon intégrée, les actions dans les secteurs humains, animaux et environnementaux. Le rapport aborde les cinq champs suivants :

- Coût de l'ABR
- Bon usage des ATB
- Communication, information et éducation
- Recherche, innovation et nouveaux modèles médico-économiques
- Antibiorésistance et environnement.

Parmi les éléments de la synthèse de ces travaux, en lien avec le domaine de l'ABR et environnement, on peut retenir le paragraphe suivant : « *la lutte contre la résistance bactérienne ne peut plus se limiter uniquement à l'indispensable évolution vertueuse des prescriptions des professionnels de santé. De fait, à la surconsommation tant en médecine humaine qu'animale, ou dans des usages non sanitaires comme dans l'élevage intensif, s'ajoutent des effets écologiques liés à la dispersion de résidus d'ATB dans l'environnement. La pollution des différents réservoirs de vie par les activités humaines (anti-infectieux, métaux lourds, intrants agricoles chimiques, …) favorise la sélection des résistances dans les milieux naturels agressés. Par ailleurs, il est important de ne pas restreindre les réflexions sur l'ABR uniquement à l'utilisation des ATB. Notamment, l'utilisation immodérée des désinfectants et biocides, y compris par les particuliers, pourrait participer à la sélection croisée des résistances.* »

La feuille de route interministérielle contre l'ABR (Comité interministériel pour la santé 2016), signée le 18 novembre 2016 par Le Premier Ministre, est déclinée sous le pilotage du Ministère de la Santé.

Un colloque interministériel sur la lutte contre l'ABR est organisé chaque année lors de la semaine mondiale sur ce sujet (*Antibiotic Awareness Week*).

Alors que les recommandations du rapport Carlet portaient sur la nomination d'un délégué interministériel, c'est en fait un délégué ministériel puis une Cheffe de Projet National rattaché à ce même ministère qui ont (ou ont eu) en charge le pilotage national de la feuille de route.

L'existence d'un plan vétérinaire dédié (Ecoantibio) piloté par le Ministère de l'Agriculture, mais intégré et qui en réfère à la feuille de route, rend l'action publique en médecine vétérinaire efficace et claire. En revanche, l'absence de plan dédié à l'ABR dans le secteur environnemental a conduit au constat d'un manque de lisibilité et d'efficacité de l'action publique dans ce secteur. En effet, plusieurs autres plans connexes peuvent ou ont pu intégrer pour partie le sujet de l'ABR (Plans

micropolluants dans les eaux, plan biodiversité, plans nationaux santé environnement), mais l'action publique dans ce secteur en ressort diluée et peu ambitieuse. Une réunion de travail à l'initiative de l'Anses et de la Fondation pour la Recherche pour la Biodiversité s'est tenue le 24 septembre 2019 avec les acteurs du secteur environnemental et des administrations. Elle a rappelé les constats scientifiques et l'urgence d'une prise en compte de l'état et du rôle des écosystèmes dans la problématique de l'ABR (diffusion des résidus d'ATB dans l'environnement, résistances croisées (biocides, métaux traces, …). Elle a notamment rappelé l'importance de renforcer l'action publique en matière environnementale.

c) Antibiotiques « critiques »

i) Pour l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

Au niveau français, la définition des ATB critiques retenue par l'Ansm (2016), repose sur la notion de pression de sélection et sur leur intérêt en dernier recours. Ont ainsi été catégorisés comme ATB « critiques », les ATB particulièrement générateurs de résistances et les ATB de dernier recours.

Le tableau XXVII présente les ATB classés comme critiques par l'Ansm (2016) en fonction de ces deux catégories.

Tableau XXVII. Listes des antibiotiques critiques retenues par l'Ansm (2016).

ATB particulièrement générateurs de résistances bactériennes	Association amoxicilline-acide clavulanique	
	Céphalosporines : plus grande préoccupation pour les spécialités administrées par voie orale que par voie injectable ; plus grande préoccupation pour les C3G et C4G, et pour la catégorie « autres céphalosporines » ; préoccupation pour la ceftriaxone	
	Fluoroquinolones	
	Témocilline*	
ATB de dernier recours	Vis-à-vis des cocci à Gram positif	Daptomycine
		Glycopeptides**
		Linézolide, tédizolide
	Vis-à-vis des bactéries à Gram négatif	Colistine injectable
		Pénèmes**
		Phénicolés
		Tigécycline
	Vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif	Fosfomycine injectable

*Pression de sélection en lien avec la problématique d'une dose optimale non établie ; **Particulièrement générateurs de résistances bactériennes

ii) Implications en médecine vétérinaire

D'un point de vue règlementaire, l'article à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique définit les substances ATB d'importance critique comme : « *celles dont l'efficacité doit être prioritairement préservée dans l'intérêt de la santé humaine et animale et dont la liste est fixée par arrêté des ministres chargés de l'agriculture et de la santé, après avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail et de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.* »

En France, l'usage des ATB critiques est soumis à restriction en médecine vétérinaire. Les ATB concernés sont listés dans le tableau XXVIII. L'article R. 5141-117-1 du code de la santé publique indique que « *La prescription d'un médicament en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances ATB d'importance critique mentionnées à l'article L. 5144-1-1 est réservée aux*

traitements métaphylactiques[59] *et curatifs*[60]. » Les articles R. 5141-117-1 et R. 5141-117-2 du code de la santé publique précisent les conditions de prescription de ces ATB.

Tableau XXVIII. Listes des antibiotiques d'importance critique définis par l'arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotique d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue à l'article R. 5141-117-2.

	Classe d'appartenance de la substance	Nom de la substance
ATB d'importance critique mentionnés aux articles R. 5141-117-1 et R. 5141-117-2 du code de la santé publique	Céphalosporines de 3e génération	Céfopérazone
		Ceftiofur
		Céfovécine
	Céphalosporines de 4e génération	Cefquinome
	Quinolones de 2e génération (fluoroquinolones)	Danofloxacine
		Enrofloxacine
		Marbofloxacine
		Orbifloxacine
		Pradofloxacine
ATB d'importance critique non autorisés pour un usage en médecine vétérinaire	Céphalosporines de 3e ou 4e génération	Ceftriaxone, Céfixime, Cefpodoxime, Céfotiam, Céfotaxime, Ceftazidime, Céfépime, Cefpirome, Ceftobiprole
	Autres céphalosporines	Ceftaroline
	Quinolones de 2e génération (fluoroquinolones)	Lévofloxacine, Loméfloxacine, Péfloxacine, Moxifloxacine, Enoxacine
	Pénèmes	Méropénème, Ertapénème, Doripénème, Imipénème + inhibiteur d'enzyme
	Acides phosphoniques	Fosfomycine
	Glycopeptides	Vancomycine, Teicoplanine, Télavancine, Dalbavancine, Oritavancine
	Glycylcyclines	Tigécycline
	Lipopeptides	Daptomycine
	Monobactames	Aztréonam
	Oxazolidones	Cyclosérine, Linézolide, Tédizolide
	Riminofenazines	Clofazimine
	Pénicillines	Pipéracilline, Pipéracilline + inhibiteur d'enzyme, Témocilline, Tircacilline, Tircacilline + inhibiteur d'enzyme
	Sulfones	Dapsone
	Antituberculeux/antilépreux	Rifampicine, Rifabutine, Capréomycine, Isoniazide, Ethionamide, Pyrazinamide, Ethambutol, Clofazimine, Dapsone + ferreux oxalate
ATB d'importance critique mentionnés au 2° du I de l'article R. 5141-117-3 du code de la santé publique	Quinolones de 2e génération (fluoroquinolones)	Ciprofloxacine, Ofloxacine, Norfloxacine

59 « *Traitement métaphylactique : tout traitement appliqué aux animaux cliniquement malades et aux autres animaux d'un même groupe qui, bien que cliniquement sains, présentent une forte probabilité d'infection du fait de leur contact étroit avec les animaux malades* » Article R. 5141-117-1 du code de la santé publique.

60 « *Traitement curatif : tout traitement, individuel ou collectif, des seuls animaux présentant les symptômes d'une maladie* » Article R. 5141-117-1 du code de la santé publique.

d) Les agences et réseaux/dispositifs de surveillance de l'antibiorésistance

i) Suivi des consommations des antibiotiques

L'agence nationale de sécurité des médicaments (ANSM) est en charge du suivi des consommations d'ATB dans le secteur humain, tandis que l'agence nationale des médicaments vétérinaires (ANMV, au sein de l'Anses), est en charge de celui des ATB utilisés en médecine vétérinaire. Les données sont produites sur une base annuelle et permettent l'analyse de tendances d'exposition des populations humaines et animales. Les unités de mesure de l'exposition aux ATB ne sont pas nécessairement superposables dans les deux secteurs, et donc les comparaisons doivent être faites en prenant en compte cette limite. À titre d'exemple, même si les déclarations de ventes des laboratoires pharmaceutiques sont une source analogue de données, la consommation d'ATB est exprimée en doses journalières pour 1 000 habitants en médecine humaine et en indice d'exposition (ALEA) en médecine vétérinaire, qui prend en compte la quantité de principe actif, la dose journalière, la durée de traitement et la biomasse animale totale. D'autres indicateurs, basés sur les prescriptions et non uniquement les ventes d'ATB, existent aussi dans les deux médecines, mais avec des modalités (et donc des unités de mesure) différentes. Ainsi, dans le cadre de la Rémunération sur Objectifs de Santé Publique (ROSP) des médecins généralistes, l'Assurance maladie suit le nombre de prescriptions d'ATB, par exemple réalisées chez les patients adultes âgés de 16 à 65 ans sans affection de longue durée. En médecine vétérinaire, le Décret n°2016-1788 du 19 décembre 2016 rend obligatoire la transmission au ministère de l'Agriculture des données de cessions d'ATB par les vétérinaires, les pharmaciens et les établissements pharmaceutiques vétérinaires.

ii) Suivi des niveaux d'antibiorésistance

En médecine humaine, les données de surveillance de l'ABR sont fournies par les Centres Nationaux de Référence sous le pilotage de Santé Publique France, ainsi que par de nombreux réseaux hospitaliers et de ville réunis dans le cadre de l'Observatoire National de l'Épidémiologie de la Résistance Bactérienne aux ATB (ONERBA). Une recomposition des acteurs est en cours, notamment dans le cadre des missions de surveillance récemment confiées aux Centres d'appui pour la prévention des infections associées aux soins (CPIAS) sur ce sujet. En médecine vétérinaire, les données de surveillance sont toutes coordonnées et fournies par l'Anses, soit par le Laboratoire National de Référence dans le cas d'une surveillance européenne réglementaire à l'abattoir (animaux sains) et dans la viande vendue au détail (Décision 2013/652/EU), soit dans le cadre du réseau Résapath, lui-même membre de l'ONERBA, qui fournit des données issues des animaux malades (surveillance clinique) pour lesquels un antibiogramme a été réalisé. Les données réglementaires sont transmises à l'EFSA et publiées conjointement avec celles des autres États membres. Le rapport Résapath est publié annuellement et mis en ligne sur le site de l'Anses. L'une des particularités de la surveillance de l'ABR dans le secteur animal par rapport au secteur humain, est de devoir aborder cette question à la fois chez l'animal malade (analogue de la médecine humaine) et dans la chaîne alimentaire (abattoirs et produits issus des animaux). Par ailleurs, si certains indicateurs sont communs dans leurs principes entre les médecines humaine et vétérinaire, comme la proportion de résistance au sein d'une espèce bactérienne donnée, ce sont les espèces bactériennes considérées qui peuvent différer, en raison de leurs importances relatives dans les infections humaines et animales (par exemple, il n'y a pas d'infections à pneumocoques chez les animaux, un indicateur fondé sur la proportion de résistance à la pénicilline chez les pneumocoques n'a de sens qu'en médecine humaine). D'autres indicateurs sont encore plus spécifiques de secteurs : en médecine humaine, l'incidence est utilisée pour refléter la dynamique de diffusion des infections à BRA. En milieu hospitalier ou communautaire, le dénominateur pour l'incidence cumulée est le nombre de patients admis ou le nombre d'habitants. En période épidémique et lorsque le dénominateur est un nombre de personnes (patients admis ou habitants), l'incidence cumulée est appelée taux d'attaque. Pour la densité d'incidence, utilisée surtout en milieu hospitalier, le dénominateur sera le nombre de journées d'hospitalisation. Ces indicateurs, utiles pour suivre la dynamique de diffusion à long terme en médecine humaine, ne sont pas utilisés en médecine vétérinaire.

iii) Surveillance de l'antibiorésistance dans l'environnement :

Il n'existe pas de dispositif fournissant des données de surveillance de l'ABR dans l'environnement, à tout le moins de façon régulière et dans le cadre du suivi d'indicateurs validés et stables La nature même des indicateurs les plus appropriés pour suivre l'état des milieux naturels en matière d'ATB et d'ABR est encore en débat. En revanche, des travaux de recherche importants sont menés en France sur la base de sites ateliers et à une échelle régionale. Ils s'intéressent au suivi de certains indicateurs (ex : *E. coli* résistant aux ATB ou encore éléments génétiques tels que les intégrons) en différents points de rejets (ville, hôpital, station d'épuration, élevage, *etc.*)

À noter, en parallèle de l'action européenne décrite précédemment, que l'Anses avait été saisie en 2013 par le ministère chargé de l'Agriculture afin de procéder à une évaluation bénéfice-risque de l'utilisation de l'oxyde de zinc dans l'alimentation des porcelets (efficacité pour l'animal, risque pour l'Homme, l'animal, l'environnement) et rendre un avis sur l'intérêt de l'utilisation de ce traitement pour réduire les risques d'ABR. Il était ressorti que l'évaluation du risque environnemental lié à l'utilisation d'oxyde de zinc en tant que prémélange médicamenteux (épandage de lisier de porcelets en post-sevrage) présentait un risque toxique pour les différents compartiments de l'environnement (sédiment, aquatique et terrestre), avec un niveau d'impact dépendant des contextes d'utilisation, notamment du type d'élevage et de la concentration en zinc dans l'aliment. Également, l'Anses soulignait l'existence de phénomènes de résistance bactérienne au zinc et de résistance croisée ou de co-sélection de bactéries résistantes avec certains ATB.

Au final, l'Anses a considéré qu'au regard du risque environnemental lié à l'utilisation de l'oxyde de zinc comme prémélange médicamenteux chez le porcelet en post-sevrage, des mesures de gestion visant à compenser ce risque devaient être envisagées. La première consistait à n'utiliser l'oxyde de zinc que dans des élevages avec ateliers d'engraissement, et ne traitant pas les lisiers avant épandage. L'Anses précisait aussi que l'autorisation éventuelle de l'oxyde de zinc comme prémélange médicamenteux pour les porcelets en post-sevrage devrait s'accompagner de la mise en place d'un système de surveillance de la résistance au zinc, de la résistance croisée ou co-sélectionnée à certains ATB et d'une surveillance annuelle des quantités utilisées au niveau national.

Annexe 3 : Bioaccumulation des antibiotiques dans le biote aquatique

La bioaccumulation est le résultat net des phénomènes d'absorption, de transformation et d'élimination de la substance par un organisme, *via* toutes les voies d'exposition (atmosphère, eau, sédiments/sol et alimentation). La bioconcentration correspond au résultat net de l'absorption, de la transformation et de l'élimination d'une substance par un organisme à partir d'une exposition *via* l'eau (Règlement européen N°1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances[61]). Elle peut être caractérisée par un facteur de bioconcentration (BCF), défini par le ratio de la concentration en un contaminant dans l'organisme sur la concentration totale dans l'eau. Un BCF ≥ 500 chez le poisson est une indication du potentiel de bioconcentration (Règlement européen N°1272/2008).

La faculté d'une substance à se bioaccumuler dépend de sa solubilité dans les lipides, classiquement exprimée par le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}). Des expériences de bioconcentration ont permis d'établir des corrélations entre le facteur de bioconcentration et le coefficient de partage octanol-eau (Mackay et Fraser 2000). Les substances ayant un log K_{ow} supérieur à 4 sont considérées comme ayant un réel potentiel de bioconcentration (Règlement européen N°1272/2008). De manière générale, les ATB sont chimiquement peu propices à la bioaccumulation en raison du caractère polaire de la majorité des composés (tableau XXIX). Pour les ATB ionisables, le log Kow de la forme ionisée est plus faible que celui de la forme neutre. Par conséquent, pour ces ATB, le pH du milieu aura un impact sur sa capacité à se bioaccumuler. La notion de log Dow (coefficient de partition en fonction du pH), moins répandue actuellement semblerait dans ce cas plus appropriée à considérer. Les molécules les plus favorables à la bioaccumulation sont celles au log Kow les plus élevés (ex : macrolides).

Tableau XXIX. Gammes de Kow par classe d'antibiotiques (Jafari Ozumchelouei *et al.* 2020).

	Gamme de log Kow
Tétracyclines	-1,5 à -0,1
Sulfamides	-0,1 à 1,7
Aminoglycosides	-8 à 1 (6,95)*
Macrolides	1,5 à 5
β-lactamines	0,9 à 3
Quinolones	-1 à 2

* Parmi la classe, seule la spectinomycine (log Kow = 6,95) présente un log Kow supérieur à 1.

La capacité d'une substance à se bioaccumuler est également liée à sa biodisponibilité qui, dans le cas de substances organiques neutres, est en relation avec sa solubilité dans l'eau (voir § 8.4.1.1). Plusieurs paramètres structuraux entrent également en compte : des molécules ayant une masse moléculaire comprise entre 200 et 600 Da, ne comprenant pas de groupement polaire mais plutôt des liaisons carbone-carbone aliphatiques ou aromatiques ou des substituts halogénés sont les plus susceptibles de s'accumuler dans les organismes. Ces caractéristiques structurales réduisent la solubilité des molécules mais renforcent leur persistance (résistance aux processus de dégradation). En effet, l'accumulation dans l'organisme va dépendre du métabolisme et de l'élimination des ATB, fonction des ATB mais également des espèces considérées.

En France, seul Dinh (2012) a calculé des facteurs de bioccumulation (BAF, tableau XXX) pour six ATB dans des gammares et des poissons à partir de données mesurées *in situ* (voir § 6.1.3.2.1.4).

[61] Règlement (CE) No 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006

Tableau XXX. Facteurs de bioaccumulation (BAF en $L.kg^{-1}$) des antibiotiques détectés dans les gammares et dans les poissons par Dinh (2012).

	Gammares juvéniles	Gammares Adultes	Loche Franche	Goujon
Acide nalidixique	1 630	1 808	NR	NR
Fluméquine	226	373	-	-
Ofloxacine	129	225	152 ± 68	31
Norfloxacine	231	1 146	591 ± 264	-
Ciprofloxacine	68	215	422 ± 270	-
Triméthoprime	18	29	141 ± 81	86

- : inférieur au LD ; NR : non renseigné

Au niveau international, peu de travaux ont porté sur la bioaccumulation des ATB et les principales études ont été menées dans des contextes de fortes contaminations en Asie (Gao *et al.* 2012 ; Li *et al.* 2012 ; Zhao *et al.* 2015 ; Liu *et al.* 2017a ; Liu *et al.* 2018).

Dans une revue de la littérature scientifique, Miller *et al.* (2018) ont recensé au total 221 BAF ou BCF pour des espèces aquatiques, couvrant 20 ATB, appartenant aux macrolides, quinolones, sulfamides, tétracyclines et triméthoprime et dérivés. Les BCF recensés, calculés à partir d'expérimentations *in vivo*, sont tous inférieurs à 166 confirmant le caractère peu bioaccumulable des ATB. Les valeurs maximales de BAF, calculées à partir de concentrations mesurées dans l'environnement, sont associées à plusieurs macrolides, plusieurs fluoroquinolones et la sulfaméthazine.

Pour un même ATB et un même site, les BAF peuvent être variables en fonction des espèces : par exemple les BAF, calculés sur les organismes entiers, vont de 0 (plusieurs espèces de poissons) à 1 990 (escargot d'eau douce) pour la ciprofloxacine, de 0 (plusieurs espèces de poissons) à 16 700 (crevette) pour l'enrofloxacine et de 0 (homard, carpe commune et tortue) à 3 870 (*Pseudorasbora parva*) pour la sulfaméthazine (Li *et al.* 2012). De plus, pour un même organisme, les BAF varient en fonction de l'organe considéré : les valeurs moyennes de BAF pour 19 ATB chez des poissons varient de 160 à 63 000 dans les branchies, de 79 à 10 000 dans les muscles, de 320 à 79 500 dans les reins et de 320 à 251 189 dans le foie (Liu *et al.* 2018). Les données existantes mettent en évidence une accumulation préférentielle des sulfamides, du triméthoprime et des fluoroquinolones dans les muscles et des macrolides dans le foie des poissons, en lien vraisemblablement avec les processus toxicocinétiques propres aux espèces piscicoles étudiées (Liu *et al.* 2018).

Annexe 4 : Déterminants génétiques suggérés comme de possibles indicateurs pour évaluer le statut de résistance aux antibiotiques dans un environnement

Tableau XXXI. Déterminants génétiques suggérés comme de possibles indicateurs permettant d'évaluer le statut de résistance aux antibiotiques dans un environnement (Berendonk *et al.* 2015).

Déterminants génétiques	Protéines codées	ATB affectés
intI1	Intégrase des intégrons de classe 1	-
sul1, *sul2*	*sulfamide-resistant dihydropteroate synthase*	sulfamides
bla$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$	β-lactamases fréquentes chez les *Enterobacteriaceae*	β-lactamines
bla$_{NDM-1}$	*New Delhi metallo-β-lactamase*	carbapénèmes
bla$_{VIM}$	VIM fréquente chez *P. aeruginosa* dans certains pays	carbapénèmes
bla$_{KPC}$	*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*	carbapénèmes
qnrS	*quinolone pentapeptide repeat family*	fluoroquinolones
aac-(6')-*Ib-cr*	*aminoglycoside acetyltransferase*	aminosides, fluoroquinolones
vanA	*vancomycin resistance operon gene*	glycopeptides
mecA	protéine de liaison aux pénicillines	β-lactamines
erm(B), *erm*(F)	*rRNA adenine N-6 -methyltransferase*	macrolides
tet(M)	protéine de protection ribosomale	tétracyclines
aph	*aminoglycoside phosphotransferase*	aminosides

Annexe 5 : Concentrations en antibiotiques mesurées dans les matrices d'intérêt

1) Sources de contamination

Tableau XXXII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les sources de contamination d'origine humaine en France.

Classe	ATB	Eaux usées traitées urbaines[a] en ng.L^{-1}					PRO - Boues de STEU[b] en ng.g MS^{-1}					PRO - Déchets compostés[c] en ng.g MS^{-1}					Total	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
Antibactériens stéroïdiens	Acide fusidique	2	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	2	0 %
Antimycobactériens	Rifampicine	2	1	-	-	54	8	0	6	7	-	0	-	-	-	-	10	10 %
C1G et C2G	Céfalexine	5	0	3	3	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0 %
	Céfuroxime	5	0	2	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0 %
C3G et C4G	Céfotaxime	7	5	31	24	41	5	0	10	10	-	0	-	-	-	-	12	42 %
	Cefpodoxime	13	0	50	50	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0 %
	Céftiofur	13	0	1	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0 %
Carbapénèmes	Méropénème	67	0	4	4	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	67	0 %
Dérivés de l'imidazole	Métronidazole	6	4	44	217	53	8	0	33	33	-	0	-	-	-	-	14	29 %
	Ornidazole	0	-	-	-	0	5	0	2	2	-	0	-	-	-	-	5	0 %
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	103	49	50	417	6 080	97	88	2 786	7 318	82 439	4	0	-	-	-	204	67 %
	Déséthylciprofloxacine	0	-	-	-	0	5	0	2	2	-	0	-	-	-	-	5	0 %
	Enoxacine	0	-	-	-	0	5	2	2	227	1041	0	-	-	-	-	5	40 %
	Enrofloxacine	8	0	0,1	4	-	5	0	1	1	-	0	-	-	-	-	13	0 %
	Loméfloxacine	0	-	-	-	0	5	1	2	12	54	0	-	-	-	-	5	20 %
	Marbofloxacine	5	0	0,1	0,1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0 %
	Norfloxacine	17	16	60	143	700	79	69	3 000	4 090	50 315	4	0	-	-	-	100	85 %
	Ofloxacine	26	24	100	215	960	87	79	2 637	7 479	232 016	4	3	-	-	59,1	117	91 %
	Sarafloxacine	0	-	-	-	0	5	0	2	2	-	0	-	-	-	-	5	0 %
Glycopeptides	Vancomycine	67	7	4	12	62	5	0	3	3	-	0	-	-	-	-	72	10 %
Lincosamides	Clindamycine	5	2	8	13	26	8	0	8	8	-	0	-	-	-	-	13	15 %

Classe	ATB	Eaux usées traitées urbaines[a] en ng.L^{-1}					PRO - Boues de STEU[b] en ng.g MS^{-1}					PRO - Déchets compostés[c] en ng.g MS^{-1}					Total	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
	Lincomycine	13	1	0,1	6	1	7	0	4	4	-	0	-	-	-	-	20	5 %
Macrolides	Azithromycine	6	6	277	434	800	54	16	1	77	886	0	-	-	-	-	60	37 %
	Clarithromycine	12	12	113	225	840	7	0	4	5	-	0	-	-	-	-	19	63 %
	Érythromycine	15	12	75	215	1 724	19	0	14	20	-	0	-	-	-	-	34	35 %
	Josamycine	4	3	-	-	70	15	0	7	8	-	0	-	-	-	-	19	16 %
	Roxithromycine	18	13	61	228	1 100	15	0	5	7	-	0	-	-	-	-	33	39 %
	Spiramycine	6	6	68	100	200	15	2	62	205	1 200	0	-	-	-	-	21	38 %
	Tilmicosine	3	0	-	-	-	7	0	38	38	-	0	-	-	-	-	10	0 %
	Tylosine	5	1	25	16	6	28	0	5	7	-	4	0	-	-	-	37	3 %
Monobactames	Aztréonam	67	0	4	4	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	67	0 %
Pénicillines	Amoxicilline	18	1	31	40	41	5	0	13	13	-	0	-	-	-	-	23	4 %
	Ampicilline	18	0	5	10	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	18	0 %
	Cloxacilline	7	0	0,3	0,3	-	7	0	9	9	-	0	-	-	-	-	14	0 %
	Dicloxacilline	5	0	1	1	-	7	0	9	9	-	0	-	-	-	-	12	0 %
	Oxacilline	13	0	0,3	0,5	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0 %
	Pénicilline G	15	0	0,2	4	-	7	0	625	625	-	0	-	-	-	-	22	0 %
	Pénicilline V	16	0	0,4	5	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	16	0 %
Phénicolés	Chloramphénicol	10	0	1	1	-	15	0	28	20	-	0	-	-	-	-	25	0 %
	Florfénicol	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0 %
	Thiamphénicol	2	0	-	-	-	8	0	133	133	-	0	-	-	-	-	10	0 %
Polypeptides	Bacitracine	2	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	2	0 %
Quinolones	Acide nalidixique	0	-	-	-	0	5	0	2	2	-	0	-	-	-	-	5	0 %
	Acide oxolinique	13	0	0,02	0,03	-	13	0	7	7	-	0	-	-	-	-	26	0 %
	Acide pipémidique	5	2	0,2	36	148	5	2	2	5	12	0	-	-	-	-	10	40 %
	Fluméquine	20	7	1	95	830	13	5	25	53	410	0	-	-	-	-	33	36 %
Streptogramines	Virginiamycine	2	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	2	0 %
Sulfamides	Sulfadiazine	8	3	15	51	342	7	0	9	9	-	0	-	-	-	-	15	20 %
	Sulfadiméthoxine	5	2	0,1	26	129	7	0	2	2	-	0	-	-	-	-	12	17 %

Classe	ATB	Eaux usées traitées urbaines[a] en ng.L^{-1}					PRO - Boues de STEU[b] en ng.g MS^{-1}					PRO - Déchets compostés[c] en ng.g MS^{-1}					Total	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
	Sulfadoxine	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0 %
	Sulfamérazine	5	0	0,1	0,1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0 %
	Sulfaméthazine	13	1	0,1	8	105	21	1	1	2	20	4	0	-	-	-	38	5 %
	Sulfaméthizole	5	4	8	6	10	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	80 %
	Sulfaméthoxazole	110	106	200	360	3 110	94	16	1	11	388	4	0	-	-	-	208	59 %
	N-acétylsulfaméthoxazole	0	-	-	-	0	5	0	1	1	-	0	-	-	-	-	5	0 %
	Sulfanilamide	5	2	12	48	137	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	40 %
	Sulfapyridine	7	7	60	119	396	7	0	4	7	-	0	-	-	-	-	14	50 %
	Sulfathiazole	5	0	0,1	0,1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0 %
Tétracyclines	Chlortétracycline	13	0	3	3	-	13	0	26	19	-	4	0	-	-	-	30	0 %
	Doxycycline	16	6	3	7	17	16	1	67	68	33	4	0	-	-	-	36	19 %
	Oxytétracycline	16	0	0,2	3	-	20	0	3	22	-	0	-	-	-	-	36	0 %
	Tétracycline	15	11	5	6	14	25	5	20	238	4 598	0	-	-	-	-	40	40 %
Triméthoprime et dérivés	Triméthoprime	22	17	66	117	460	20	7	5	7	40	0	-	-	-	-	42	57 %

N=nombre d'échantillons ; N quantif=nombre de résultats quantifiés ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale mesurée ; MS=matières sèches ; % quantif=fréquence de quantification - [a] (Tamtam 2008 ; Coetsier *et al.* 2009 ; Mullot 2009 ; Capdeville 2011 ; Loos *et al.* 2012 ; Oberlé 2012 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Pasquini *et al.* 2013 ; Petit *et al.* 2014 ; Chiffre *et al.* 2016 ; Perrodin *et al.* 2016 ; SIPIBEL 2019) ; [b] (Algros et Jourdain 2007 ; Dinh 2012 ; Pasquini *et al.* 2013 ; Peysson et Vulliet 2013 ; Salvia, Fieu et Vulliet 2015 ; Bourdat-Deschamps *et al.* 2017 ; Mailler *et al.* 2017 ; SIPIBEL 2019) ; [c] (Bourdat-Deschamps *et al.* 2017)

Tableau XXXIII. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les sources de contamination d'origine animale en France.

Classe	ATB	PRO solides[a] en ng.g MS^{-1}					PRO liquides[b] en ng.L^{-1}					Total	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	16	7	1515	241	2 200	5	0	0	6	-	21	33 %
	Difloxacine	0	-	-	-	-	1	1	-	-	4	1	100 %
	Enrofloxacine	18	7	25	704	9 700	5	1	25	24	1	23	35 %
	Marbofloxacine	4	1	-	-	31	0	-	-	-	-	4	25 %
	Norfloxacine	11	1	30	64	289	5	1	2	24	2	16	13 %
	Ofloxacine	11	3	15	42	347	4	0	-	-	-	15	20 %
Lincosamides	Clindamycine	7	0	100	129	-	3	0	-	-	-	10	0 %
	Lincomycine	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	4	0 %
Macrolides	Érythromycine	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	4	0 %
	Spiramycine	11	3	100	65	8	3	0	-	-	-	14	21%
	Tylosine	25	1	3	29	650	8	00	2	6	-	33	3 %
	Tylosine B	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	4	0 %
Pénicillines	Amoxicilline	7	0	100	157	-	3	0	-	-	-	10	0 %
	Ampicilline	14	0	58	58	-	4	0	-	-	-	18	0 %
Phénicolés	Chloramphénicol	7	0	10	10	-	3	0	-	-	-	10	0 %
	Florfénicol	7	0	10	10	-	3	0	-	-	-	10	0 %
	Thiamphénicol	7	0	100	100	-	3	0	-	-	-	10	0 %
Quinolones	Acide oxolinique	7	0	10	10	-	4	1	-	-	2	11	9 %
	Fluméquine	7	0	10	10	-	4	2	-	-	1 515	11	18 %
Sulfamides	Sulfachloropyridazine	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	4	0 %
	Sulfadiazine	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	4	0 %
	Sulfamérazine	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	4	0 %

Classe	ATB	PRO solides[a] en ng.g MS^{-1}					PRO liquides[b] en ng.L^{-1}					Total	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
	Sulfaméthazine	23	4	3	71	730	8	3	4	577	4 590	31	23 %
	Sulfaméthoxazole	23	0	4	5	-	6	0	6	6	-	29	0 %
	N-acétylsulfaméthoxazole	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	4	0 %
Tétracyclines	Chlortétracycline	14	0	32	33	-	7	0	8	32	-	21	0 %
	Anhydrochlortétracycline	3	1	-	-	400	0	-	-	-	-	3	33 %
	Doxycycline	18	3	10	11 898	186 686	7	5	134	505	2 596	25	32 %
	Oxytétracycline	11	3	100	209	1 610	3	1	-	-	20 400	14	29 %
	Tétracycline	12	2	20	1 291	15 192	3	1	-	-	190	15	20 %
	Anhydrotétracycline	3	1	-	-	259	0	-	-	-	-	3	33 %
Triméthoprime	Triméthoprime	18	3	6	6	17	4	0	-	-	-	22	14 %

N=nombre d'échantillons ; N quantif=nombre de résultats quantifiés ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale mesurée ; MS=matières sèches ; % quantif=fréquence de quantification - [a] (Algros et Jourdain 2007 ; Moraru *et al.* 2012 ; Simonet et Gardeur-Algros 2012 ; Pourcher *et al.* 2014 ; Bourdat-Deschamps *et al.* 2017 ; Nazaret 2020a, 2020b) ; [b] (Algros et Jourdain 2007 ; Tamtam *et al.* 2009a ; Simonet et Gardeur-Algros 2012 ; Bourdat-Deschamps *et al.* 2017).

2) Compartiments récepteurs

Tableau XXXIV. Synthèse, réalisée à partir des données produites par des équipes de recherche, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les compartiments récepteurs en France.

Classe	ATB	ESU															ESO[d] en ng.L^{-1}					Sols et sols amendés[e] en ng.g MS^{-1}					Total	
		Phase dissoute[a] en ng.L^{-1}					Sédiments[b] en ng.g MS^{-1}					Périphytons[c] en ng.g MS^{-1}																
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
Aminosides	Dihydro-streptomycine	13	0	6	6	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0 %
Antibactériens stéroïdiens	Acide fusidique	10	0	1	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0 %
Antimyco-bactériens	Rifampicine	10	1	12	14	35	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	10 %
C1G et C2G	Céfalexine	31	0	3	3	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	31	0 %
	Céfazoline	2	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0	15	15	-	0	-	-	-	-	12	0 %
	Céfuroxime	31	0	2	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	31	0 %
C3G et C4G	Céfotaxime	39	1	1	14	368	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	43	2 %
	Cefpodoxime	39	0	50	50	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	42	0 %
	Céfquinome	97	0	6	6	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	8	0	6	6	-	0	-	-	-	-	105	0 %
	Céftiofur	42	0	1	2	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0	4	3	-	0	-	-	-	-	55	0 %
Carbapénèmes	Méropénème	63	0	1	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	40	0	1	1	-	0	-	-	-	-	103	0 %
Dérivés de l'imidazole	Métronidazole	64	24	1	3	26	0	-	-	-	-	12	0	0,2	0,2	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	76	32 %
	Ornidazole	11	0	7	5	-	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	15	0 %
Fluoro-quinolones	Ciprofloxacine	175	18	1	5	135	25	8	0,2	11	143	20	17	7	10	31	53	2	0,4	8	66	51	5	1	3	36	324	15 %
	Déséthyl-ciprofloxacine	2	0	-	-	-	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	6	0 %
	Danofloxacine	6	2	11	26	64	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0	13	13	-	0	-	-	-	-	16	13 %
	Difloxacine	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0 %
	Enoxacine	11	0	4	6	-	25	13	1	2	5	20	16	1	5	33	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	56	52 %
	Enrofloxacine	155	8	6	6	46	25	2	0,1	0,2	1	20	1	0,4	1	13	18	0	13	10	-	17	0	0,04	0,1	-	235	5 %
	Loméfloxacine	11	0	6	4	-	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	15	0 %
	Marbofloxacine	130	1	6	5	21	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	18	2	6	9	67	17	0	1	1	-	165	2 %
	Norfloxacine	86	18	1	6	75	25	8	0,2	11	101	20	12	2	5	29	0	-	-	-	-	74	7	2	4	17	205	22 %
	Ofloxacine	126	49	1	6	231	25	12	0,04	26	181	20	9	0,2	18	99	3	0	-	-	-	51	10	1	2	9	225	36 %
	Sarafloxacine	11	0	2	3	-	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	15	0 %

Classe	ATB	ESU															ESO[d] en ng.L^{-1}					Sols et sols amendés[e] en ng.g MS^{-1}					Total	
		Phase dissoute[a] en ng.L^{-1}					Sédiments[b] en ng.g MS^{-1}					Périphytons[c] en ng.g MS^{-1}																	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
Glycopeptides	Bacitracine	10	0	71	71	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0 %
	Vancomycine	74	2	1	3	90	4	1	-	-	14	0	-	-	-	-	40	0	1	1	-	0	-	-	-	-	118	3 %
Lincosamides	Clindamycine	9	3	0,3	2	9	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0	1	1	-	0	-	-	-	-	19	16 %
	Lincomycine	135	22	3	8	373	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	21	0	3	3	-	0	-	-	-	-	156	14 %
Macrolides	Azithromycine	156	16	10	12	140	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	156	10 %
	Clarithromycine	140	74	3	9	131	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	143	52 %
	Érythromycine	252	76	6	8	128	25	6	0,3	1	5	20	6	4	10	41	21	2	2	4	6	22	5	0,1	0,1	0,1	340	28 %
	Josamycine	27	6	0,2	0,3	1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	27	22 %
	Roxithromycine	79	29	0,4	3	24	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0	5	4	-	5	0	0,02	0,02	-	97	30 %
	Spiramycine	126	13	6	6	23	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	8	0	6	6	-	4	1	-	-	0,2	138	10 %
	Neospiramycine	97	1	6	6	24	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	8	0	6	6	-	0	-	-	-	-	105	1 %
	Tilmicosine	121	5	3	12	7	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	8	1	3	3	9	0	-	-	-	-	129	5 %
	Tylosine	150	4	3	3	131	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	18	0	5	4	-	44	0	0,4	0,2	-	216	2 %
	Tylosine B	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	17	0	0,4	0,4	-	17	0 %
Monobactames	Aztréonam	63	0	1	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	40	0	1	1	-	0	-	-	-	-	103	0 %
Pénicillines	Amoxicilline	147	2	6	17	235	25	8	0,2	3	3	20	12	2	2	4	11	0	6	10	-	0	-	-	-	-	203	11 %
	Ampicilline	148	3	6	8	91	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	11	0	6	6	-	0	-	-	-	-	159	2 %
	Cloxacilline	30	1	0,3	2	40	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	30	3 %
	Dicloxacilline	30	0	1	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	30	0 %
	Oxacilline	38	1	0,3	1	12	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	41	2 %
	Pénicilline G	38	0	0,2	0,2	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	5	0	0,1	0,1	-	46	0 %
	Pénicilline V	38	0	0,4	0,4	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	41	0 %
Phénicolés	Chloramphénicol	18	0	1	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	21	0 %
	Florfénicol	97	7	3	24	930	34	1	10	12	76	0	-	-	-	-	8	0	3	3	-	5	1	0,002	0,1	1	144	6 %
	Florfénicol amine	13	1	3	6	52	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1	0	-	-	-	0	-	-	-	-	14	7 %
	Thiamphénicol	10	0	1	1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0 %
Quinolones	Acide nalidixique	11	0	3	2	-	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	23	12	1	5	22	38	32 %
	Acide oxolinique	172	12	6	5	28	68	26	2	16	231	20	11	1	2	11	21	1	2	4	11	28	8	0,2	2	19	309	19 %
	Acide pipémidique	41	0	1	2	-	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	45	0 %
	Fluméquine	238	41	3	4	143	68	31	2	39	600	20	11	1	6	31	21	0	2	2	-	45	8	1	1	7	392	23 %

Classe	ATB	ESU															ESO[d] en ng.L^{-1}						Sols et sols amendés[e] en ng.g MS^{-1}					Total	
		Phase dissoute[a] en ng.L^{-1}					Sédiments[b] en ng.g MS^{-1}					Périphytons[c] en ng.g MS^{-1}																	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{Max}	N	% quantif
Strepto-gramines	Virginiamycine	10	0	5	5	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0 %
Sulfamides	Sulfachlo-ropyridazine	1	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	17	0	0,4	0,4	-	18	0 %
	Sulfadiazine	146	14	3	26	2946	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	18	1	2	3	18	22	1	0,4	0,3	0,1	190	8 %
	Sulfadiméthoxine	126	6	6	5	6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	8	0	6	6	-	5	0	0,005	0,01	-	139	4 %
	Sulfamérazine	31	0	0,1	0,1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	17	0	0,4	0,4	-	48	0 %
	Sulfaméthazine	169	20	3	5	181	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	21	1	1	2	16	44	1	0,4	0,3	0,02	238	9 %
	Sulfaméthizole	30	0	0,1	0,1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	30	0 %
	Sulfaméthoxazole	331	199	3	13	1435	25	3	0,2	0,4	1	32	15	0,4	3	20	129	66	3	5	25	67	1	0,4	0,4	3	584	49 %
	N-acétylsulfa-méthoxazole	2	0	-	-	-	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	17	0	0,4	0,4	-	23	0 %
	Sulfa-méthoxydiazine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0	0,01	0,01	-	5	0 %
	Sulfanilamide	30	0	10	11	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0	4	4	-	35	0 %
	Sulfapyridine	29	20	1	3	16	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	29	69 %
	Sulfaquinoxaline	3	0	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	10	0	2	2	-	0	-	-	-	-	13	0 %
	Sulfathiazole	30	0	0,1	0,1	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	5	0	0,01	0,01	-	35	0 %
Tétracyclines	Chlortétracycline	147	1	6	5	12	4	0	-	-	-	0	-	-	-	-	11	0	6	5	-	22	0	1	4	-	184	1 %
	Anhydro-chlortétracycline	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0	4	4	-	13	0 %
	Doxycycline	138	1	6	5	39	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	21	0	6	5	-	39	0	4	4	-	198	1 %
	Oxytétracycline	159	11	6	8	325	34	1	8	13	91	0	-	-	-	-	11	0	6	5	-	29	0	4	4	-	233	5 %
	Tétracycline	53	4	0,2	1	7	25	5	0,2	7	85	20	2	1	8	118	13	0	13	10	-	29	1	1	1	7	140	9 %
	Anhydro-tétracycline	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	13	0	4	4	-	13	0 %
Triméthoprime	Triméthoprime	359	75	3	7	468	25	11	0,05	3	30	32	12	0,3	2	10	97	0	7	5	-	46	1	0,2	0,1	0,04	559	18 %

ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; N quantif=nombre de résultats quantifiés ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale mesurée ; MS=matières sèches ; % quantif=fréquence de quantification - [a] (Tamtam 2008 ; Coetsier *et al.* 2009 ; Strub 2009 ; Tamtam *et al.* 2009a ; Tamtam *et al.* 2009b ; Bruchet *et al.* 2011 ; Capdeville 2011 ; Dinh *et al.* 2011 ; Joigneaux 2011 ; Mompelat, Thomas et Le Bot 2011 ; Vulliet, Cren-Olivé et Grenier-Loustalot 2011 ; Dinh 2012 ; Oberlé 2012 ; Oberlé *et al.* 2012 ; Garcia-Armisen *et al.* 2013 ; Perrodin *et al.* 2013 ; Petit *et al.* 2014 ; Camilleri *et al.* 2015 ; Guillon *et al.* 2015 ; Chiffre *et al.* 2016 ; Lardy-Fontan *et al.* 2016 ; Dinh *et al.* 2017a ; Jaffrezic *et al.* 2017 ; Togola 2018 ; Charuaud *et al.* 2019 ; SIPIBEL 2019) ; [b] (Gordon *et al.* 2007 ; Dinh 2012 ; Dinh *et al.* 2017c ; Petit 2020) ; [c] (Aubertheau *et al.* 2017 ; Petit 2020) ; [d] (Capdeville 2011 ; Joigneaux 2011 ; Guillon *et al.* 2015 ; Charuaud *et al.* 2019 ; SIPIBEL 2019) ; [e] (Tamtam *et al.* 2011b ; Salvia *et al.* 2012 ; Salvia, Fieu et Vulliet 2015 ; Bourdat-Deschamps *et al.* 2017 ; Dinh *et al.* 2017c ; Nazaret 2020a, 2020b).

Tableau XXXV. Synthèse, réalisée à partir des données du SIE, des concentrations individuelles en antibiotiques dans les compartiments récepteurs en France.

Classe	ATB	ESU en ng.L^{-1}					ESO en ng.L^{-1}					Total	
		N	N quantif	Méd	Moy	C_{MAX}	N	N quantif	Méd	Moy	C_{MAX}	N	% quantif
Aminosides	Dihydrostreptomycine	0	-	-	-	-	1 073	0	500	500	-	1 073	0 %
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	10 808	76	10	26	274	4 175	7	10	13	43	14 983	1 %
	Danofloxacine	3 623	0	50	50	-	1 862	2	50	48	24	5 485	0,04 %
	Doxycycline	3 763	65	3	8	73	2 420	4	3	4	74	6 183	1 %
	Énoxacine	712	0	10	10	-	1 850	0	3	6	-	2 562	0 %
	Enrofloxacine	4 535	0	10	10	-	1 861	4	3	6	25	6 396	0,1 %
	Marbofloxacine	3 623	0	50	50	-	1 851	0	50	48	-	5 474	0 %
	Norfloxacine	3 623	0	50	50	-	1 931	3	50	46	39	5 554	0,1 %
	Ofloxacine	14 778	545	10	12	8 700	5 066	18	10	10	204	19 844	3 %
Lincosamides	Clindamycine	3 763	166	3	13	90	1 244	0	3	3	-	5 007	3 %
	Lincomycine	40	0	1 000	1 000	-	1 668	0	3	2	-	1 708	0 %
Macrolides	Azithromycine	7 183	5	50	176	165	1 289	0	250	162	-	8 472	0,1 %
	Clarithromycine	10 817	1 942	3	6	497	2 850	5	3	6	42	13 667	14 %
	14-hydroxy-clarithromycine	712	36	3	3	43	1 804	0	25	15	-	2 516	1 %
	Érythromycine	10 952	913	3	197	2 251	4 401	43	3	72	1 872	15 353	6 %
	Tylosine	1 522	4	5	27	807	1 920	0	3	8	-	3 442	0,1 %
Pénicillines	Amoxicilline	1 356	42	26	63	464	2 398	0	50	45	-	3 754	1 %
	Ampicilline	0	-	-	-	-	1 153	1	3	3	15	1 153	0,1 %
	Cloxacilline	0	-	-	-	-	1 075	0	100	100	-	1 075	0 %
	Pénicilline G	0	-	-	-	-	1 173	0	250	229	-	1 173	0 %
Phénicolés	Florfénicol	3 622	7	50	51	334	1 074	0	50	237	-	4 696	0,1 %
Quinolones	Acide oxolinique	0	-	-	-	-	1 073	7	3	3	539	1 073	1 %
	Fluméquine	712	0	10	10	-	1 851	1	3	6	16	2 563	0,04 %
Sulfamides	Sulfadiazine	0	-	-	-	-	1 153	5	3	3	25	1 153	0,4 %

	Sulfadiméthoxine	0	-	-	-	-	1 073	0	3	3	-	1 073	0 %
	Sulfaméthazine	2 211	42	3	3	162	2 517	5	3	2	11	4 728	1 %
	Sulfaméthizole	1 889	1	3	24		1 166	1	3	3	17	3 055	0,1 %
	Sulfaméthoxazole	16 385	4 382	10	13	4 110	5 154	178	3	31	333	21 539	21 %
	Sulfaquinoxaline	3 622	0	25	18	-	1 831	2	3	12	8	5 453	0,04 %
	Sulfathiazole	712	0	3	3	-	1 911	0	3	3	-	2 623	0 %
Tétracyclines	Chlortétracycline	3 763	0	10	15	-	2 346	5	3	6	45	6 109	0,1 %
	Oxytétracycline	3 623	20	3	3	222	1 873	0	3	3	-	5 496	0,4 %
	Tétracycline	3 763	1	50	55	-	2 337	0	50	49	-	6 100	0,02 %
Triméthoprime	Triméthoprime	4 668	244	3	4	127	2 999	7	3	3	186	7 667	3 %

ESU=eau de surface ; ESO=eau souterraine ; N=nombre d'échantillons ; N quantif = nombre de résultats quantifiés ; Méd=médiane ; Moy=moyenne ; C_{Max}=concentration maximale mesurée ; MS=matières sèches ; % quantif=fréquence de quantification

Source : Naiades 2019 et Ades 2019 ; Traitement Anses

Notes

Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex
www.anses.fr
@Anses_fr

ISBN 979-10-286-0363-2- Dépôt légal : octobre 2020 - © Anses Éditions :octobre 2020- Date de publication : octobre 2020 - Couverture : Parimage (création), Anses (réalisation) - Crédit photo : iStock