

Spécialité : R2D2C (Ressources, Données, Diagnostics, Changements climatiques)

Stage de fin d'études  
Formation ingénieur Institut Agro Dijon  
Formation initiale - Agronomie

## Etude exploratoire de la dynamique des résidus d'antibiotiques et des gènes d'antibiorésistance dans les agroécosystèmes réunionnais



Stage réalisé par Marion MARÉCHAL

Du 21/03/2022 au 16/09/2022

Promotion 2019-2022

Soutenance 20/09/2022

Stéphane FOLLAIN

Enseignant référent

UMR Agroécologie

Institut Agro Dijon, France

Thierry BALDET

Tuteur de stage

UMR ASTRE

CIRAD, Saint-Denis de La Réunion, France



## Remerciements

Avant de commencer, je tiens à remercier particulièrement tous mes encadrants, Thierry Baldet, Adrien Rieux, Valérie Soti, Mathieu Bravin, Emmanuel Doelsch, Eric Cardinale, venant de quatre unités de recherche différentes du CIRAD pour la confiance qu'ils m'ont accordée afin de mener à bien mes missions durant ces 6 mois de stage de fin d'études. Grâce à leur disponibilité et à leurs explications dans leur domaine de spécialité, j'ai pu assimiler de nouvelles connaissances autour de l'approche One Health et plus spécifiquement en écologie microbienne.

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement Adrien Rieux, mon encadrant de proximité, pour son accueil au sein du CIRAD, ainsi que pour ses précisions sur le projet de recherche, et son temps passé à me conseiller tout au long du stage. Cela m'a permis de progresser et de développer mon esprit de recherche.

De plus, j'adresse mes remerciements à tous les membres du CIRAD et particulièrement à Lionel Le Mezo et Frédéric Chiroleu pour leurs aides respectives en cartographie et statistiques. Leurs conseils m'ont permis d'acquérir de bonnes pratiques sur les logiciels utilisés lors de mon stage ; mais aussi, à Marie Darnaudery, Louis Paulin, Charles Mottes pour leurs connaissances sur le bassin versant de Petite-Ile.

D'autre part, je remercie Anna Doizy, statisticienne, pour son accompagnement et son aide à l'analyse des données sur le logiciel R.

Également, je remercie tous les agriculteurs qui ont accepté de participer à cette étude. Ils m'ont tous très bien accueillie au sein de leur exploitation et partagé leur passion pour le métier d'agriculteur. Ils m'ont permis de mieux comprendre la réalité des pratiques mises en œuvre sur le terrain.

Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes des coopératives et cabinets vétérinaires qui m'ont partagé leurs connaissances et grâce auxquelles, j'ai pu avancer sur mes enquêtes.

Et enfin, j'exprime ma gratitude à Stéphane Follain, mon enseignant-référent, pour sa disponibilité et ses conseils.

## Résumé

L'emploi des antibiotiques en santé humaine au début du XX<sup>ème</sup> siècle fait partie des grandes avancées médicales. Néanmoins, leur utilisation massive, aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire a entraîné l'accumulation de **résidus d'antibiotiques** dans les différents compartiments de l'environnement et a induit l'émergence de bactéries porteuses de **gènes de résistance**. Ce phénomène appelé **antibiorésistance**, conduit à une perte d'efficacité des traitements antibiotiques, mettant en danger la santé publique. Les populations bactériennes, devenues multirésistantes, se propagent en omettant toutes frontières géographiques ou écologiques. Pour aborder cette problématique, l'approche « **One Health** » permet de prendre en compte les interactions possibles entre les Hommes, les animaux et l'environnement. La Réunion est un milieu insulaire, fortement peuplé, où l'antibiorésistance a été constatée notamment en milieu hospitalier et dans les élevages agricoles. L'objectif de cette étude exploratoire est de caractériser la présence de résidus d'antibiotiques, d'**éléments traces métalliques** (ETMs) et de gènes d'antibiorésistance au sein de différentes matrices (sol, produit résiduaire organique, plante et eau) prélevées dans plusieurs agroécosystèmes de l'île. Grâce à différentes analyses génétiques, la présence d'un grand nombre de gènes de résistance a été détectée dans toutes les matrices. Aucun lien direct entre la présence de résidus d'antibiotiques ou d'ETMs et celles des gènes de résistance n'a cependant été déterminé. Des études complémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre l'origine et la transmission des gènes de résistance au sein du territoire réunionnais.

**Mots clefs :** résidus d'antibiotiques, gènes de résistance, antibiorésistance, One Health, éléments traces métalliques.

## Summary

The use of antibiotics in public health at the beginning of the 20th century is one of the greatest medical advances. However, their massive use, both in human and veterinary medicines, has led to the accumulation of **antibiotic residues** in the various compartments of the environment which induces the emergence of bacteria carrying **resistance genes**. This phenomenon, called **antibiotic resistance**, leads to a loss of effectiveness of antibiotic treatments, endangering public health. Bacterial populations, which have become multi-resistant, spread across all geographical or ecological borders. To broach this issue, the « **One Health** » approach aims to take into account the possible interactions between humans, animals and the environment. Reunion is an isolated island, densely populated, where antibiotic resistance has been observed, particularly in hospitals and farms. The objective of this exploratory study is to characterize the presence of antibiotic residues, **metallic trace elements** (MTEs) and antibiotic resistance genes within different matrices (soil, organic waste product, plant and water) sampled in several agroecosystems on the island. Thanks to different genetic analyses, the presence of a large number of resistance genes was detected in all the matrices. However, no direct link between the presence of antibiotic residues or MTEs and those of resistance genes has been determined. Additional studies will be necessary to have better understanding of the origin and the transmission of resistance genes within Reunion Island.

**Keywords :** antibiotic residues, resistance genes, antibiotic resistance, One Health, metallic trace elements.

## Table des matières

|  |      |
|--|------|
| <b>Remerciements</b> .....                                     | i    |
| <b>Résumé</b> .....  | ii   |
| <b>Summary</b> .....   | ii   |
| <b>Table des matières</b> .....                                | iii  |
| <b>Liste des figures</b> .....                                 | v    |
| <b>Liste des tableaux</b> .....                                | vii  |
| <b>Liste des annexes</b> .....                                 | viii |
| <b>Liste des acronymes et abréviations</b> .....               | ix   |
| <b>Introduction</b> .....                                      | 1    |
| <b>1. Contexte</b> .....                                       | 3    |
| 1.1. Structure d'accueil et thématiques.....                   | 3    |
| 1.2. Antibiotique et Antibiorésistance .....                   | 4    |
| 1.3. L'approche « One Health » .....                           | 7    |
| 1.4. Santé humaine .....                                       | 8    |
| 1.5. Santé animale .....                                       | 9    |
| 1.6. Santé environnementale.....                               | 10   |
| 1.7. Bilan des connaissances actuelles mondiales .....         | 10   |
| 1.8. Site de recherche : La Réunion.....                       | 12   |
| 1.9. Principe et objectifs de l'étude .....                    | 13   |
| <b>2. Matériel et Méthodes</b> .....                           | 14   |
| 2.1. Site de recherche .....                                   | 14   |
| 2.1.1. Enquêtes .....  | 14   |
| 2.1.2. Petite-Ile .....  | 15   |
| 2.1.3. Sainte-Marie .....                                      | 16   |
| 2.1.4. Salazie .....   | 18   |
| 2.2. Campagnes de terrain et préparation des échantillons..... | 21   |
| 2.2.1. Petite-Ile .....  | 22   |
| 2.2.2. Sainte-Marie .....                                      | 22   |
| 2.2.3. Salazie .....   | 23   |
| 2.3. Analyses des échantillons.....                            | 25   |
| 2.3.1. Analyse des gènes de résistance .....                   | 25   |
| 2.3.2. Analyse des résidus d'antibiotiques .....               | 27   |

|   |              |
|---|--------------|
| 2.3.3. Analyse des ETMs.....  | 27           |
| 2.4. Traitement des données .....   | 28           |
| <b>3. Résultats .....</b>   | <b>29</b>    |
| 3.1. Analyses génétiques .....  | 29           |
| 3.1.1. Composition taxonomique des échantillons .....   | 29           |
| 3.1.2. Présence des gènes de résistance .....   | 30           |
| 3.1.3. Abondance relative des gènes de résistance .....   | 32           |
| 3.1.4. Analyse en composantes principales .....   | 36           |
| 3.2. Analyse des résidus d'antibiotiques .....  | 38           |
| 3.3. Analyse des ETMs.....  | 39           |
| 3.4. Analyses combinées .....   | 39           |
| 3.4.1. Analyse combinée entre les résidus d'antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques .....                          | 39           |
| 3.4.2. Analyse combinée entre les ETMs et les gènes de résistance aux antibiotiques .....   | 40           |
| <b>4. Discussion .....</b>  | <b>41</b>    |
| 4.1. Quels sont les gènes de résistance, antibiotiques et ETMs détectés dans les différentes matrices étudiées ?.....                 | 41           |
| 4.2. Existe-t-il un lien direct entre la présence de résidus d'antibiotiques ou d'ETMs et celle des gènes d'antibiorésistance ? ..... | 43           |
| 4.3. Peut-on identifier des évènements de transmission de gènes de résistance entre les matrices étudiées ? .....                     | 44           |
| 4.4. Limites de l'étude et perspectives .....   | 45           |
| <b>Conclusion .....</b>   | <b>47</b>    |
| <b>Références bibliographiques.....</b>   | <b>x</b>     |
| <b>Annexes .....</b>  | <b>xviii</b> |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Les stratégies de défense d'une bactérie contre l'antibiotique<br>(Charbonnier & Laveissière, 2021). .....   | 5  |
| Figure 2 : Schéma du mécanisme de transmission bactérienne de l'antibiorésistance<br>(Comité scientifique d'Agropolis international, 2019). .....   | 5  |
| Figure 3 : Schéma de la diffusion de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement<br>(Comité scientifique d'Agropolis international, 2019). .....   | 7  |
| Figure 4 : Schéma conceptuel de l'approche One Health<br>(Comité scientifique d'Agropolis international, 2019). .....   | 8  |
| Figure 5 : Nombre d'études sur l'antibiorésistance par année de publication (*la recherche<br>documentaire s'est terminée le 14/06/2018)<br>(Goulas et al., 2020). .....                                  | 11 |
| Figure 6 : Carte des sites enquêtés à La Réunion. ....  | 14 |
| Figure 7 : Carte de l'occupation des sols du bassin versant de Petite-Ile. ....   | 16 |
| Figure 8 : Zoom sur l'essai agronomique SOERE-PRO. ....   | 17 |
| Figure 9 : Photographie de la station de compostage de l'exploitation sélectionnée. À<br>gauche : un compost de 15 jours et à droite : un compost de 6 mois. ....   | 19 |
| Figure 10 : Zoom sur la zone d'étude de Salazie. ....   | 20 |
| Figure 11 : Photographies des différentes étapes du prélèvement du cours d'eau à la filtration<br>en laboratoire. ....  | 22 |
| Figure 12 : Schéma et photographies de la zone d'échantillonnage chez le maraîcher de<br>Salazie. ....  | 24 |
| Figure 13 : Photographies des différentes étapes, de gauche à droite, du prélèvement des sols à<br>la tarière, du sol tamisé à 4 mm et de l'aliquote en tube Falcon de 50 mL. ....                        | 24 |
| Figure 14 : Photographies des différentes étapes, de gauche à droite, du prélèvement des<br>salades, coriandres, choux-raves et navets, aliquote du mélange des végétaux en tube Falcon<br>de 50 mL. .... | 25 |
| Figure 15 : Nombre de gènes de résistance ciblés par famille d'antibiotiques. ....  | 26 |
| Figure 16 : Présence ou absence des gènes taxonomiques par échantillon. ....  | 29 |
| Figure 17 : Nombre de gènes détectés par famille d'antibiotiques pour chaque échantillon. ..  | 30 |
| Figure 18 : Proportion des gènes détectés par famille d'antibiotiques au sein de chaque<br>échantillon. ....  | 31 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 19 : Nombre de gènes détectés par famille d'antibiotiques pour chaque échantillon. ..   | 31 |
| Figure 20 : Pourcentage de présence de chaque gène ciblé aux antibiotiques dans l'ensemble des 14 échantillons. Les gènes sont ordonnés par leur pourcentage de présence au sein de chaque famille. .... | 32 |
| Figure 21: Abondance relative des gènes ciblés (log10) par échantillon. Le point noir indique la moyenne de l'abondance relative. ....   | 33 |
| Figure 22 : Abondance relative des gènes ciblés (log10) pour les familles d'antibiotiques phénicolés (PHE) et quinolones (QUI), par matrice et par échantillon. ....                                     | 34 |
| Figure 23 : Abondance relative des gènes ciblés (log10) pour chaque matrice. L'aire de chaque violon est proportionnelle au nombre de gènes par matrice. ....  | 34 |
| Figure 24 : Abondance relative des gènes ciblés pour chaque famille d'antibiotiques par matrice. ....  | 36 |
| Figure 25 : Pourcentage explicatif de la variance entre échantillons pour chaque dimension de l'ACP. ....  | 36 |
| Figure 26: ACP des échantillons colorés par site pour les dimensions 1 et 2. ....  | 37 |
| Figure 27: ACP des échantillons colorés par matrice (à gauche) et contribution majoritaire des gènes (à droite) pour les dimensions 1 et 2. ....   | 37 |

L'ensemble des photographies de ce rapport proviennent de sources personnelles.

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Récapitulatif des 16 échantillons prélevés. ....  | 21 |
| Tableau 2 : Concentration d'ADN extrait ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) pour chaque échantillon.....   | 30 |
| Tableau 3 : Résultats du test de Conover-Iman pour les comparaisons deux à deux<br>d'abondance relative des gènes de résistance entre matrices. ....                                      | 35 |
| Tableau 4 : Concentration des antibiotiques ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) seulement pour les échantillons<br>présentant des valeurs supérieures à la limite de quantification. .... | 38 |
| Tableau 5 : Concentration en zinc et cuivre disponibles pour les échantillons de 1 à 13. ....   | 39 |

## Liste des annexes

|  |        |
|--|--------|
| <b>Annexe 1</b> : Questionnaire pour les agriculteurs avec les réponses de l'éleveur et du maraîcher sélectionnés à Salazie. ....  | xviii  |
| <b>Annexe 2</b> : Fiche de consentement pour la réalisation d'enquêtes et de prélèvements d'échantillons. ....   | xxviii |
| <b>Annexe 3</b> : Tableau des gènes de résistance choisis pour l'analyse réalisée par le laboratoire Resistomap. ....  | xxx    |
| <b>Annexe 4</b> : Tableau des résidus d'antibiotiques analysés.....  | xxxv   |
| <b>Annexe 5</b> : Abondance relative des gènes ciblés (log10) par échantillon pour chaque famille d'antibiotiques. Le point noir indique la moyenne de l'abondance relative. ....    | xxxvi  |
| <b>Annexe 6</b> : Abondance relative des gènes ciblés (log10) pour chaque famille d'antibiotiques par matrice et par échantillon. ....   | xxxvii |
| <b>Annexe 7</b> : Modèle linéaire entre les concentrations de cuivre et de zinc disponibles (log10, mg.kg <sup>-1</sup> MS). ....  | xl     |
| <b>Annexe 8</b> : Nuage de points entre la concentration en cuivre disponible (mg.kg <sup>-1</sup> MS) et l'abondance relative des gènes ciblés : AY492, AY495 et AY498 (log10)..... | xli    |
| <b>Annexe 9</b> : Nuage de points entre la concentration en zinc disponible (mg.kg <sup>-1</sup> MS) et l'abondance relative du gène AY493 (log10). ....                             | xli    |

## **Liste des acronymes et abréviations**

ACP : Analyse en Composantes Principales

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

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

Ct : Cycle Threshold (seuil de cycle)

CTO : Contaminants Traces Organiques

Cu : Cuivre

EBLSE : Entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamase

ETMs : Eléments traces métalliques

MDR : Multiple drug resistance

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

Pro : Produits résiduaire organiques

Zn : Zinc

## Introduction

Le développement de la résistance aux antibiotiques ou antibiorésistance est devenu un enjeu mondial (Murray et al., 2022) qui ne cesse de s'accroître ces dernières années dû notamment aux activités humaines. En effet, l'utilisation d'antibiotiques pour soigner des infections chez les Hommes, s'est rapidement appliquée en santé vétérinaire dans le cadre de la production animale (Gay, 2019) et également comme moyen de lutte contre les infections bactériennes affectant certaines cultures. Par conséquent, cet usage massif d'antibiotiques a entraîné la sélection de bactéries possédant des gènes de résistance aux antibiotiques car ces dernières sont les seules à pouvoir survivre dans ces milieux avec des pressions de sélection élevées. De plus, cette sélection peut être favorisée par la présence d'éléments traces métalliques (ETMs) tels que le zinc ou le cuivre et certains bactéricides (Poole, 2017). De ce fait, les activités anthropiques ont profondément bouleversé le monde microbien naturel (UNEP, 2022).

Cette problématique doit être traitée d'un point de vue global avec une approche « One Health », une seule santé. Effectivement, au cours de ces 40 dernières années, l'apparition et la propagation de zoonoses et d'épidémies touchant la santé vétérinaire et publique ont conduit à une prise de conscience des liens entre les différentes santés qui composent la démarche One Health (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019). L'antibiorésistance impacte donc chaque microbiote que ce soit dans le compartiment environnemental, animal ou humain. Plusieurs plans d'action ont été mis en place à l'échelle mondiale, européenne et française notamment par l'Assemblée mondiale de la santé en 2015 et la Commission européenne en 2017. Ils ont pour objectifs de mieux comprendre ce sujet : les réservoirs de résistance, les liens entre les compartiments, etc., afin d'endiguer l'antibiorésistance et ses nombreuses conséquences (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019).

Au niveau mondial, les antibiotiques ont été une avancée majeure contribuant à la baisse des maladies infectieuses et à l'augmentation des productions alimentaires. Néanmoins, aujourd'hui l'antibiorésistance met en danger leur efficacité (UNEP, 2022). Il s'agit donc d'un problème de santé publique mais aussi de sûreté alimentaire. En effet, 10 millions de morts par an mondialement d'ici 2050 sont prévus si aucune mesure internationale n'est instaurée (O'Neill, 2016). De même, la production animale devrait voir une perte dans les cheptels (Goutard, 2017). Cette diffusion de l'antibiorésistance parmi différents compartiments peut également avoir lieu, par exemple, suite à un épandage d'effluents d'élevage sur une parcelle agricole. Ceci pourrait contaminer les produits végétaux, le sol et les cours d'eau. Par conséquent, des résidus d'antibiotiques ou le transfert de gènes de résistance à travers la consommation de produit animal et de végétaux crus peuvent être transmis à l'Homme (Hernando-Amado et al., 2019).

L'île de La Réunion est un site d'étude intéressant car il s'agit d'un territoire isolé mais connecté aux autres territoires insulaires du sud-ouest de l'océan Indien, entre l'Afrique australe et le sous-continent Indien. La Réunion est dotée des mêmes structures de santé qu'en France métropolitaine et de la réglementation européenne dans le domaine agricole. Quelques études ont identifié des résistances aux antibiotiques chez des patients hospitalisés (Miltgen et al., 2020) et au sein des élevages porcins et avicoles (Gay, 2019). Néanmoins, la présence de gènes d'antibiorésistance dans le compartiment environnemental reste à évaluer, ainsi que ses interconnexions avec la santé humaine et animale.

Le CIRAD, à travers ses différentes unités de recherche, a pour projet global de construire une agriculture durable adaptée aux enjeux actuels. Dans ce contexte, quatre unités de recherche se sont réunies autour d'une nouvelle étude exploratoire sur l'antibiorésistance à La Réunion, à l'origine de ce stage. L'objectif de ce travail est (i) d'évaluer la présence de gènes de résistance, résidus d'antibiotiques, et d'ETMs dans plusieurs matrices (eau, sol, produit résiduaire organique ou plante) et (ii) d'identifier des liens potentiels entre ces différents compartiments.

Pour répondre à ces questions, trois sites d'études représentatifs d'agroécosystèmes contrastés (un bassin versant, un site expérimental agricole et une zone d'élevage/maraîchage) ont été soigneusement sélectionnés, échantillonnés et analysés selon plusieurs méthodes génétiques et chimiques.

La première partie de ce rapport sera consacrée au contexte, suivie d'une revue bibliographique associée aux thématiques majeures du stage et des objectifs de l'étude. Ensuite, le matériel et les méthodes utilisés seront décrits. Et enfin, une analyse des résultats obtenus sera présentée afin de répondre aux problématiques posées précédemment, suivie par une discussion et la présentation de perspectives et pistes d'amélioration.

# 1. Contexte

## 1.1. Structure d'accueil et thématiques

Le CIRAD (le centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) est un organisme français de recherche agronomique et de coopération internationale qui vise au développement durable des régions tropicales et méditerranéennes. Affilié avec le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, le ministère de l'Europe et des Affaires étrangères, il a pour mission principale depuis 1984 de contribuer à la résilience des agricultures pour un monde plus durable et solidaire (CIRAD, 2022). Autour de l'agriculture, six thématiques de recherche se sont développées au cours de ces dernières années. Le CIRAD est notamment l'un des référents dans les différentes filières agricoles des zones tropicales. L'une de ses thématiques est d'aborder les problématiques d'un point de vue global, en développant et en appliquant l'approche « One Health », une seule santé. Suite aux différentes épidémies et pandémies qui touchent, à la fois les animaux d'élevage, mais également les Hommes, cette démarche est plus que nécessaire pour répondre à des enjeux mondiaux (Département Systèmes biologiques du CIRAD, 2022). Les chercheurs du CIRAD veulent notamment anticiper et éviter le développement de pathogènes zoonotiques et de bactéries résistantes qui peuvent se propager au travers de différents compartiments (environnement, animal et humain).

C'est dans ce contexte que plusieurs chercheurs du CIRAD affiliés à différentes unités de recherche, ont décidé de se rassembler autour d'un projet multidisciplinaire « One Health » mené à La Réunion sur la résistance aux antibiotiques.

- L'unité de recherche ASTRE (Animal, Santé, Territoires, Risques et Ecosystèmes) est spécialisée dans l'étude des contraintes sanitaires liées aux productions animales, domestiques et sauvages, à l'interface Homme - Animal - Environnement. Dans ce contexte, elle s'intéresse notamment aux pratiques d'utilisation des antibiotiques par les éleveurs et des conséquences possibles pour l'Homme.
- L'unité de recherche Recyclage & Risque étudie le recyclage des déchets organiques, comme le fumier, afin de connaître le potentiel impact des pratiques agricoles sur l'environnement et ses paramètres physico-chimiques. Un des objectifs étant de proposer des solutions de valorisation des produits résiduels organiques (Pro) avec un impact environnemental contrôlé.
- L'unité de recherche AIDA-ESTIME (Agroécologie et Intensification Durable des cultures Annuelles - Evaluation des Systèmes de cultures, Intégrée et Multi-Echelle) travaille à l'échelle du territoire et notamment de bassins versants avec l'objectif d'optimiser dans le temps et l'espace les performances agronomiques et limiter les impacts environnementaux des systèmes de culture basés sur l'intensification agroécologique.
- L'unité mixte de recherche PVBMT (Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical) s'intéresse aux dynamiques écologiques en milieu insulaire et à l'étude de l'évolution et l'épidémiologie des microbes pathogènes émergents, grâce notamment à des outils de génomique.

L'association de ces unités permet de relier plusieurs disciplines de recherche afin d'avoir un point de vue à différentes échelles, compartiments et méthodologiques.

## 1.2. Antibiotique et Antibiorésistance

Il y a plus de 3 milliards d'années, bien avant l'*Homo sapiens*, le monde était densément peuplé de bactéries. En conditions hostiles, elles ont développé de multiples mécanismes d'adaptation pour survivre, dont notamment les antibiotiques, molécule naturelle permettant d'éliminer les bactéries concurrentes lors de la compétition pour la nourriture et l'espace. Pour ne pas être impactées par leurs propres antibiotiques, elles ont développé des gènes de résistance associés (Charbonnier & Laveissière, 2021). Les antibiotiques correspondent donc à des molécules chimiques souvent fabriquées naturellement par les microorganismes (bactéries, champignons) qui peuvent affecter différents mécanismes biochimiques vitaux des bactéries. Ils peuvent soit avoir un effet bactériostatique, bloquant leur multiplication, ou un effet bactéricide, tuant les bactéries (Sadikalay, 2018). Initialement, les antibiotiques produits naturellement par les bactéries étaient en quantité relativement faible et restaient localisés dans certains environnements.

En 1928, Alexander Fleming, découvre qu'un champignon microscopique *Penicillium notatum* produit de la pénicilline. Après la seconde guerre mondiale, les antibiotiques sont massivement utilisés par l'Homme. Ils sont classés par famille selon leur structure chimique et leur mode d'action. Les familles d'antibiotiques possédant des processus d'action similaires sont généralement associées à des mécanismes de résistance communs. Ces médicaments ne vont pas être entièrement métabolisés par l'organisme et vont se retrouver dans les excréments humains ou animaux. Par conséquent, une certaine concentration en résidus médicamenteux non métabolisés se diffusent dans l'environnement et impactent l'équilibre écologique bactérien (Charbonnier & Laveissière, 2021). L'usage important d'antibiotiques en santé humaine et animale n'induit pas la résistance mais la révèle en éliminant les bactéries sensibles et en sélectionnant les bactéries possédant des gènes de résistance (Figure 2).

L'antibiorésistance ou résistance aux antibiotiques correspond à la capacité d'un microorganisme, de manière naturelle ou acquise, à résister à l'action d'un ou plusieurs antibiotiques grâce à différentes stratégies (Figure 1). Les mécanismes conférant cette résistance impliquent généralement un ou plusieurs gènes apparus par mutation (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019) ou par acquisition de gènes de résistance exogènes (Durão et al., 2018). Ce « pool » de gènes de résistance, appelé résistome, existe pour certains depuis des milliards d'années et ne cesse d'évoluer au cours du temps (D'Costa et al., 2011).

Ensuite, une fois la résistance acquise par une bactérie, elle va pouvoir la transmettre de deux manières. Tout d'abord, la transmission peut avoir lieu « verticalement » d'une cellule bactérienne à l'autre, lors de la division cellulaire. Également, la bactérie peut réaliser une transmission « horizontale » en échangeant des gènes avec une autre bactérie appartenant ou non à la même espèce (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019) (Figure 2). Ceci peut se faire par trois types de mécanismes dits de recombinaison génétique. Le plus fréquent est la « conjugaison », deux bactéries ont un contact rapproché et s'échangent des éléments génétiques mobiles (intégrons, transposons et plasmides) (Miltgen et al., 2022). Le second mécanisme dit « la transformation », désigne une bactérie définie comme compétente capable d'incorporer de l'ADN libre provenant d'une bactérie morte. Pour finir, le troisième mécanisme, concerne l'échange de gènes par « transduction », via un virus bactériophage (Charbonnier & Laveissière, 2021).

## Les stratégies de défense d'une bactérie contre l'antibiotique

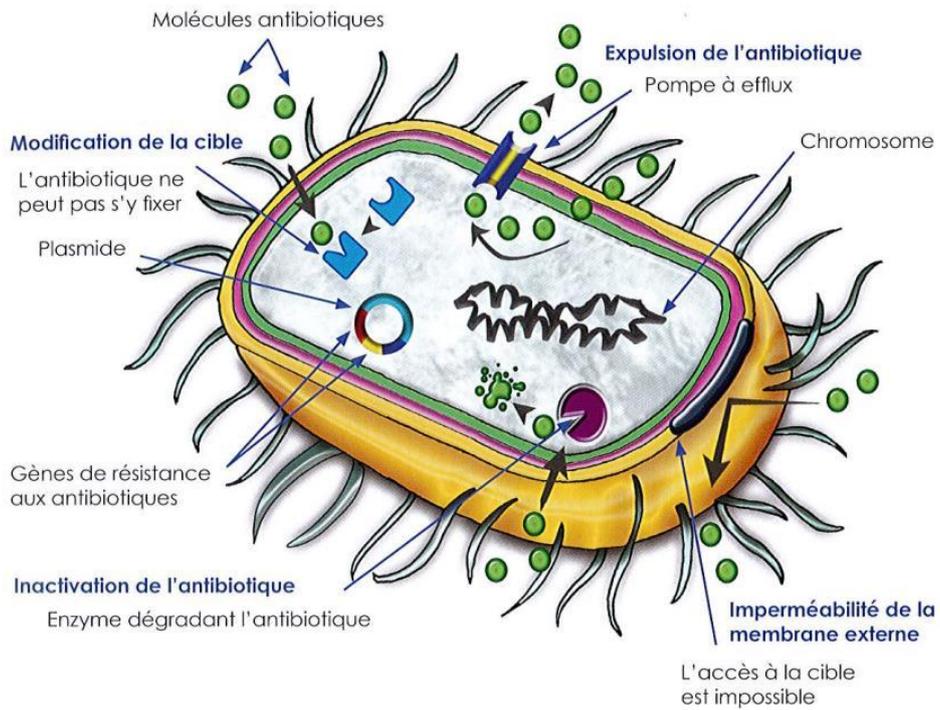


Figure 1 : Les stratégies de défense d'une bactérie contre l'antibiotique (Charbonnier & Laveissière, 2021).

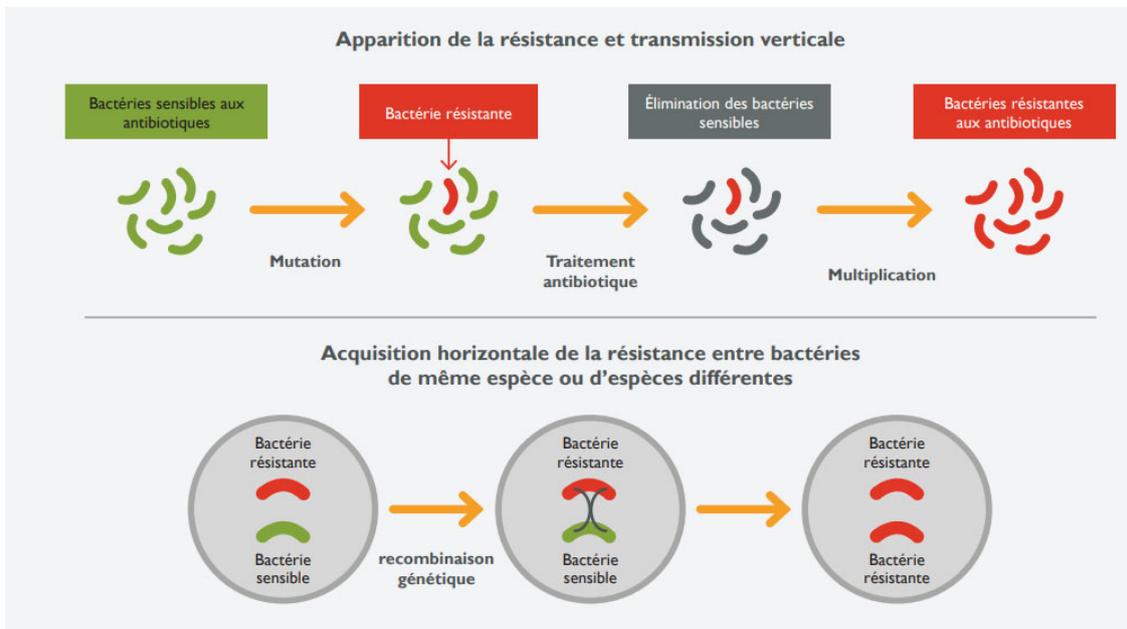


Figure 2 : Schéma du mécanisme de transmission bactérienne de l'antibiorésistance (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019).

Au sein de leurs organismes hôtes ou de l'environnement, les bactéries vont être exposées à des pressions de sélection favorisant l'apparition de mutations. Ces pressions de sélection peuvent être caractérisées de « directes », suite par exemple à la prise d'antibiotiques par l'Homme et les animaux ou bien par la présence de résidus d'antibiotiques dans les différents compartiments de l'environnement (sol, eau, etc.) (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019). Ainsi, les bactéries sont parfois naturellement résistantes, mais la présence d'antibiotiques dans leur milieu est l'une des principales causes de l'apparition et de la diffusion des gènes de résistance (Bordier et al., 2018; Founou et al., 2016; Queenan et al., 2016). De plus, les produits désinfectants et les produits phytopharmaceutiques, les additifs alimentaires pouvant contenir respectivement des bactéricides et des ETMs, tels que le zinc et le cuivre (Gaze et al., 2013; UNEP, 2022), créent des conditions favorables au développement de bactéries résistantes (Murray et al., 2022; UNEP, 2022; Wales & Davies, 2015). L'environnement des bactéries influence leur résistance aux antibiotiques. Certains ETMs (cuivre, zinc, nickel chrome, etc.) sont essentiels au bon fonctionnement cellulaire des bactéries en faible concentration. Si cette dernière est trop élevée, les ETMs deviennent toxiques pour les bactéries (Seiler & Berendonk, 2012). Ceci entraîne une pression de sélection pour la résistance aux ETMs. Les bactéries vont développer des mécanismes, comme des pompes à efflux pour rejeter les molécules toxiques de leur cellule. En raison de liens génétiques et physiologiques, ces mécanismes peuvent également fonctionner pour les résidus médicamenteux. Par conséquent, une résistance « indirecte » aux antibiotiques est induite (Poole, 2017). Ainsi, les bactéries peuvent être potentiellement résistantes à ces deux facteurs de stress.

La résistance acquise par modification de l'ADN est une réponse évolutive des bactéries suite à différentes pressions de sélection. Les bactéries résistantes auront donc un avantage évolutif dans ces milieux (Martínez et al., 2015). L'usage massif d'antibiotiques a entraîné la diffusion, notamment par des plasmides de gènes de résistance (Haenni et al., 2022) et a favorisé la sélection de bactéries possédant ces gènes de résistance car elles sont les seules à survivre (Gay, 2019). Cette diffusion de la résistance est définie par un caractère dynamique car elle se déroule entre écosystèmes variés avec des pressions de sélection différentes (environnements agricoles, urbains, hospitaliers, etc.).

L'antibiorésistance a ainsi été établie comme un problème de santé mondiale, notamment par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette dernière a mis en place un plan mondial de lutte afin de mieux comprendre cette problématique, de trouver des solutions et des alternatives à l'usage d'antibiotiques (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019). En effet, puisque les bactéries résistances peuvent être présentes chez les Hommes, les animaux, les végétaux ou dans l'environnement, différentes pratiques humaines illustrées par des flèches sur la Figure 3 représentent un risque de diffusion des gènes de résistance entre compartiments (Bordier et al., 2018; Queenan et al., 2016).



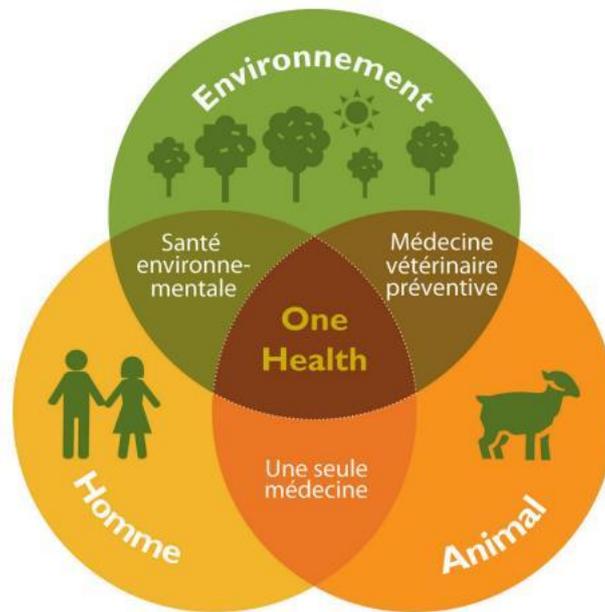


Figure 4 : Schéma conceptuel de l'approche One Health (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019).

L'antibiorésistance est donc un phénomène global et l'une des grandes thématiques du One Health. En effet, la transmission de bactéries résistantes peut avoir lieu, après contact direct, entre l'animal et l'éleveur. Cependant, le risque le plus élevé concerne la transmission indirecte, via l'alimentation (Levantidis & Decloitre, 2018). Les conséquences sur les différentes santés sont donc multiples.

#### 1.4. Santé humaine

Tout d'abord, en santé humaine, l'incorporation excessive d'antibiotiques a augmenté le nombre de souches de bactéries résistantes sur lesquelles les antibiotiques n'ont plus d'effets. Par conséquent, des maladies qui étaient faciles à soigner dans le passé deviennent à nouveau mortelles (Gay, 2019) comme par exemple la pneumonie ou la tuberculose (Bloom & Murray, 1992). Ceci engendre des changements de traitements médicaux qui vont accroître les coûts des soins et demandent une plus grande technicité. Un retard de guérison pouvant mettre en danger la vie des patients peut alors se produire (Miltgen et al., 2022). Dans ces conditions, les pays ayant déjà des problèmes pour l'accès aux soins seront encore plus touchés par cette problématique. Selon l'OMS, l'antibiorésistance entraîne déjà 700 000 morts par an au niveau mondial et si rien ne change 10 millions par an sont estimés d'ici 2050 (O'Neill, 2016), ce qui équivaut au nombre de décès dû au cancer en 2018 (Ferlay et al., 2018). Cette évolution des résistances bactériennes constitue aujourd'hui un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. En France, de nombreuses campagnes de sensibilisation contre l'usage systématique des antibiotiques ont été mises en place. Par exemple, depuis 2002, la Caisse primaire d'assurance maladie a intitulé ces campagnes « Les antibiotiques, c'est pas automatique » avec des messages télévisés afin de changer les mentalités. De plus, les médecins ont été sensibilisés à ce problème afin de limiter la prescription des antibiotiques aux seuls cas nécessaires.

## 1.5. Santé animale

En élevage, les antibiotiques ont été fortement utilisés à des fins thérapeutiques (Marszałek et al., 2019), pour prévenir et traiter des infections mais également comme promoteur de croissance. De nombreux antibiotiques utilisés en santé humaine sont également employés pour les animaux d'élevage (Miltgen, 2021). Ces médicaments prescrits, en raison de leur structure chimique, ne sont pas complètement métabolisés par les animaux, jusqu'à 60 à 90% sont excrétés dans les fèces et l'urine (Bohrer et al., 2019). Au niveau mondial, cet usage est toujours d'actualité dans les pays en développement où la demande en protéines animales augmente et où les réglementations sur l'accès aux antibiotiques et les pratiques d'élevage n'ont pas de cadre législatif adapté. Particulièrement, l'Asie du Sud-Est est considérée comme l'épicentre de nombreuses maladies infectieuses et une des sources majeures des bactéries antibiorésistantes (Bordier et al., 2018; Goutard, 2017).

L'antibiorésistance est favorisée quand la densité d'animaux d'élevage est élevée (Pappas, 2013). Par conséquent, les élevages intensifs voient augmenter l'apparition de maladies infectieuses. Ceci va diminuer la production mondiale de bétails d'environ 3 à 8% chaque année d'ici 2050, entraînant des répercussions sur le commerce mondial avec une réduction du produit intérieur brut international annuel d'environ 1 à 4% (Goutard, 2017). Mondialement, les élevages avicoles et porcins ont été identifiés pour favoriser la circulation des gènes de résistance contrairement aux élevages bovins. Ceci peut s'expliquer par une séparation plus importante entre individus chez les bovins (Hordijk et al., 2013; Stalder et al., 2017). Comme pour la santé humaine, des résistances apparaissent et en 2016, le commissaire européen à la santé, Vytenis Andriukaitis, évoque qu'environ 25 000 animaux d'élevage meurent dans l'Union Européenne par an dû à l'inefficacité des antibiotiques. De plus, des résidus d'antibiotiques ou de médicaments peuvent se retrouver dans les produits d'origine animale consommés par l'Homme comme le lait, la viande, etc.

En Europe, depuis 2006, de nouvelles directives ont été imposées pour réduire, voire interdire l'usage des antibiotiques non nécessaires pour le maintien en bonne santé de l'animal. Ainsi, les promoteurs de croissance ont été interdits dans toutes les filières d'élevage. Également, l'utilisation d'antibiotiques en curatif est soumise à une prescription vétérinaire suite à un diagnostic considérant l'évolution locale de l'antibiorésistance (Sanders et al., 2011). L'application de ces nouvelles réglementations européennes a démontré son efficacité (Dorado-García et al., 2016), bien que l'inversion des tendances des résistances ne soit pas linéaire. De plus, une réduction du taux de résistance ne correspond pas à la disparition complète des souches résistantes (Sanders et al., 2011). Pour continuer cette progression et ne pas voir se diffuser de nouveau les résistances, il faut également renforcer de bonnes conditions sanitaires et favoriser le recours à la vaccination afin d'anticiper tout développement d'infections bactériennes (Gay, 2019). Cette bonne gestion des élevages est importante pour la santé et le bien-être animal mais également pour limiter les risques de diffusion des résistances dans l'environnement et chez les Hommes.

De fait, pour les produits carnés, il a été démontré qu'ils peuvent contenir des quantités importantes de bactéries et leurs gènes de résistance. Certaines bactéries comme *Escherichia coli* peuvent survivre et se multiplier dans les aliments mis au frais pendant une semaine (Alexander et al., 2010). L'implication des aliments carnés dans la diffusion de bactéries résistantes n'a pas encore été clairement prouvée mais plusieurs études montrent une exposition plus importante aux bactéries résistantes pour les populations mangeant de la volaille (Lazarus et al., 2015; Overdeest et al., 2011) et encore plus pour du bœuf consommé cru (Evers et al., 2017).

## **1.6. Santé environnementale**

Historiquement, l'utilisation d'antibiotiques afin d'endiguer des maladies sur des cultures est assez rare. Cependant, leur usage a été mis en place sur des productions agricoles à fort impact économique. Par exemple, les États-Unis effectuent ce type de traitement contre la maladie du feu bactérien des pommiers ou la Chine contre la bactériose du riz (Comité scientifique d'Agropolis international, 2019). Ces pratiques augmentent l'antibiorésistance pouvant entraîner la perte de biodiversité des sols. Par la suite, d'autres traitements seront appliqués, ne faisant qu'accroître la pression de sélection. Il y aura donc une rétroaction négative de l'utilisation initiale (UNEP, 2022).

D'autre part, l'emploi de produits résiduels organiques (fumier, litière, etc.) ou bien de boues de stations d'épuration comme apports organiques sur des terres agricoles permet de revaloriser agronomiquement ces déchets. Cependant, leur épandage renforce la pression de sélection avec la présence d'ETMs dont notamment le cuivre et le zinc, de résidus d'antibiotiques (Frey et al., 2022) et également la propagation des gènes de résistance dans le compartiment sol et dans les eaux souterraines (Jechalke et al., 2014; Li et al., 2015; Marti et al., 2013). La réalisation de traitements des boues ou le compostage des effluents d'élevage peut faire varier la quantité de résidus d'antibiotiques et l'abondance des éléments génétiques mobiles (Evariste et al., 2020; Ezzari et al., 2017). Ceci est dû à l'emploi de traitements thermophiles (Goulas et al., 2020). Néanmoins, le transfert potentiel de résidus d'antibiotiques entraînant une pression de sélection, ou la présence de gènes de résistance pose questions sur l'avenir et la dangerosité de la qualité sanitaire des cultures. En effet, plusieurs études ont trouvé des bactéries résistantes chez des plantes cultivées telles que des tomates ou des salades (Gay et al., 2018). L'eau absorbée par les plantes serait l'un des facteurs du transport des gènes de résistance (Hu et al., 2010). Les plantes pourraient constituer un réservoir de gènes de résistance pouvant se transmettre à d'autres bactéries de l'environnement et éventuellement à l'Homme lors de leur consommation crue (Gay, 2019).

De surcroît, l'eau a été considérée comme un facteur potentiel de contamination des élevages notamment avicoles (Gay, 2019) mais aussi des terres cultivées irriguées (Kookana et al., 2014). L'eau pourrait être une source de contamination mais également un facteur de transmission des résistances. Effectivement, la principale part des bactéries fécales retrouvée dans les bassins versants d'Europe semblerait être issue d'infiltration suite à l'épandage de lisier (Wellington et al., 2013). D'autre part, des études aux Pays-Bas ont mis en évidence que la majeure partie des contaminations des eaux de surfaces proviendrait du rejet des eaux usées d'origine humaine (Dorado-García et al., 2018).

## **1.7. Bilan des connaissances actuelles mondiales**

Suite à la nouvelle réglementation européenne de 2006 sur l'emploi des antibiotiques et aux différents plans d'action mondiaux lancés en 2015 par l'OMS, le nombre d'études sur l'antibiorésistance ne cesse d'augmenter. Ainsi, il s'agit d'une prise de conscience récente sur un sujet de recherche complexe avec des multitudes d'approches possibles dû aux divers compartiments impactés (Figure 5).

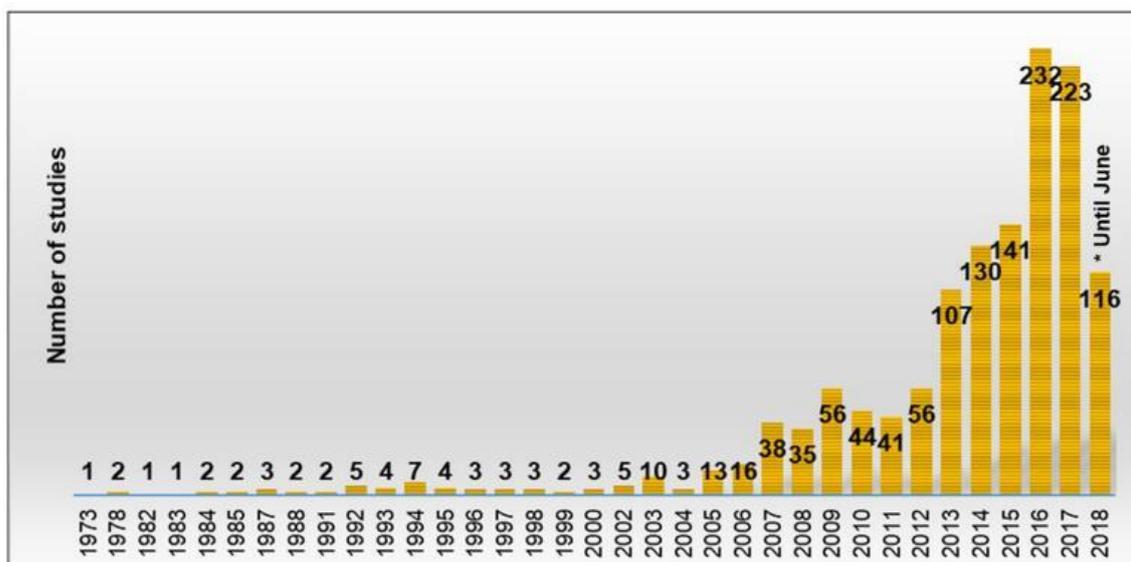


Figure 5 : Nombre d'études sur l'antibiorésistance par année de publication (\*la recherche documentaire s'est terminée le 14/06/2018)  
(Goulas et al., 2020).

À l'échelle mondiale, les études sur l'antibiorésistance restent assez cloisonnées. Elles ont permis de mettre en évidence la présence de résidus d'antibiotiques et/ou de gènes de résistance à la fois chez les Hommes, les animaux et dans l'environnement. Néanmoins, le lien entre ces trois compartiments n'est que rarement étudié. Les projets sont axés plutôt sur le lien entre deux compartiments : Homme - Animal ou Animal - Environnement. En effet, les bactéries résistantes ont été observées comme présentes en plus grande quantité chez la population humaine en contact avec les animaux d'élevage. Concernant la population générale, les gènes de résistance entre les Hommes et les animaux restent distincts (De Been et al., 2014; Huijbers et al., 2014), comme cela a été rapporté récemment à La Réunion. Certaines études dans des pays en développement comme Madagascar, où il n'y a pas de distinction marquée entre les zones d'élevage et les zones habitées, ont montré la présence de bactéries résistantes dans les différents compartiments avec des gènes de résistance en commun chez les Hommes et les animaux (Gay, 2019). Néanmoins, dans les pays à revenu élevé, l'Homme ne semble pas être impacté directement par les bactéries résistantes d'élevage mais pourrait l'être par le biais de l'environnement suite à l'épandage ou en l'absence d'épuration des eaux usées des élevages. Cette voie potentielle de contamination reste encore peu connue comme les risques suite à la consommation de viande notamment crue (Gay, 2019). De plus en plus d'études sont mises en place afin d'identifier les compartiments les plus à risques et d'essayer de comprendre leurs interconnexions complexes avec une approche nouvelle basée sur du One Health (Graham et al., 2019).

## 1.8. Site de recherche : La Réunion

L'île de La Réunion est un territoire d'outre-mer français au sud-ouest de l'océan Indien, à proximité de Madagascar. Elle est peuplée par 850 000 habitants sur une superficie de 2 500 km<sup>2</sup> (340 habitants/km<sup>2</sup>) au carrefour de l'Afrique australe et du sous-continent Indien (Miltgen et al., 2020). À La Réunion, 5 à 6% des patients humains hospitalisés sont victimes de l'antibiorésistance (Levantidis & Decloitre, 2018). Un programme de surveillance des souches de bactéries multi-résistantes, c'est-à-dire résistantes à au moins trois familles d'antibiotiques, a été mis en place par des dépistages effectués en milieu hospitalier depuis 2008 (Gay, 2019).

De plus, ces dernières années le CIRAD a commencé à réaliser à La Réunion et à une échelle régionale dans les autres territoires du sud-ouest de l'océan Indien, un état des lieux de l'antibiorésistance chez l'animal, notamment au sein des différents types d'élevage. L'un des principaux objectifs était d'étudier comment cette antibiorésistance se diffuse entre l'Homme et l'animal, et de mieux comprendre le danger sanitaire que représentent ces échanges entre les deux compartiments. Suite à ces travaux, il a été observé qu'une proportion conséquente d'élevages étaient contaminés par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques et notamment aux classes thérapeutiques utilisées chez l'Homme (Levantidis & Decloitre, 2018). Ainsi, les dernières études effectuées à La Réunion indiquent que 20% des élevages de volailles étaient contaminés par des entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamase (EBLSE), 12% des élevages de porcs et 10% en moyenne des élevages de ruminants. Ces valeurs sont comparables à celles retrouvées chez l'Homme (~30%) et dans l'environnement (dans l'eau entre 10 et 20%) (Gay, 2019).

Suite à la réduction des usages des antibiotiques depuis 2006, l'Anses a constaté une diminution des résistances entre 2011 et 2017 en France métropolitaine. Néanmoins, cette tendance reste à confirmer dans les départements d'outre-mer, non inclus dans le réseau de surveillance de l'étude (Bourély et al., 2018). Seuls les départements de La Réunion et de Mayotte ont été évalués en termes d'utilisation d'antibiotiques en élevages. La consommation d'antibiotiques est actuellement inférieure à La Réunion comparée à la métropole, ce qui explique l'évolution de la proportion d'élevages contaminés en très grande baisse depuis les années 2015 (Josse & Cardinale, 2021a). Cette réglementation plus stricte a permis une évolution favorable de la situation. Des hypothèses sur la persistance de présence de bactéries résistantes ont néanmoins été émises : l'usage d'antibiotiques pour raisons thérapeutiques en élevage, la présence d'animaux domestiques sur les exploitations et la venue de personnes extérieures à une ferme seraient des vecteurs potentiels de persistance et/ou de propagation (Gay, 2019). Également, l'utilisation d'antibiotiques au sein des élevages porcins par les éleveurs restent encore d'actualité.

L'élevage intensif cloisonné à certains secteurs géographiques semblerait limiter les contacts directs avec la population non agricole (Josse & Cardinale, 2021a). Cependant, la prévalence de souches de bactéries résistantes dans les filières porcines et avicoles de l'île ainsi que l'augmentation des résistances chez les rats proches des élevages suggère une potentielle contamination de l'environnement à proximité des zones agricoles (Gay, 2019). Néanmoins, très peu de données existent sur la présence et la diffusion de ces bactéries résistantes dans les différents compartiments (Homme, animaux et environnement) (Miltgen et al., 2022).

La Réunion correspond ainsi à un site d'études intéressant dû à son isolement géographique et par la prévalence de bactéries multi-résistantes présentes dans tous les secteurs (Miltgen et al., 2022). De plus, les différents compartiments du One Health sont assez distincts sur l'île. En effet, la majorité des habitants vivent au bord du littoral, principalement sur les côtes nord et ouest. Ensuite, deux zones d'élevage structurées, intensives et situées dans des milieux ruraux se distinguent : l'une à Dos d'Âne et l'autre à Salazie (Josse & Cardinale, 2021a). Ce dernier est l'un des trois cirques de l'île, à savoir, il correspond à une enceinte naturelle circulaire installée aux flancs de massifs montagneux. Et enfin, le sud reste assez sauvage avec peu d'élevage et quelques cultures. Il semble donc intéressant d'évaluer dans chacun de ces compartiments ce qui peut être trouvé en termes d'antibiorésistance et de vérifier si des liens existent entre eux.

## **1.9. Principe et objectifs de l'étude**

Ainsi, la thématique de l'antibiorésistance est complexe, aussi bien par le nombre de compartiments connectés que par la diversité des facteurs pouvant influencer l'apparition, la persistance et/ou le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques. À La Réunion, des études ont été réalisées, plus spécifiquement en santé humaine, dans les milieux hospitaliers, mais également en santé animale avec comme déjà dit les niveaux de résistance aux EBLSE et la vente d'antibiotiques par les cabinets vétérinaires pour chaque filière d'élevage (Josse & Cardinale, 2021a). Dans le cadre de cette étude, nos recherches sont axées sur le compartiment environnemental qui pourrait être le lien entre santé humaine et animale. Le but de ce travail est d'évaluer la présence de résidus d'antibiotiques, de certains ETMs et également de gènes de résistance dans plusieurs compartiments comme l'eau, le sol, certains Pro directement issus de l'élevage ou encore des plantes cultivées. Plus précisément, nous essayerons de répondre aux questions suivantes :

- Quels antibiotiques, ETMs et gènes de résistance peuvent être détectés pour chaque matrice étudiée (eau, sol, Pro et plante) et en quelle concentration ?
- Existe-t-il un lien direct entre la présence de résidus d'antibiotiques ou d'ETMs et celle des gènes d'antibiorésistance au sein d'un échantillon ?
- Peut-on identifier des événements de transmission entre certaines matrices étudiées ?

Il s'agit donc d'une étude exploratoire et novatrice car de telles observations n'ont jamais été réalisées sur ces compartiments au sein du territoire réunionnais. L'étude a également la volonté d'être pluridisciplinaire en regroupant des chercheurs avec des compétences spécifiques et complémentaires afin d'obtenir la meilleure image globale de l'antibiorésistance à La Réunion.

Pour mener à bien ces recherches, le choix des sites d'études apparaît fondamental. Ainsi, afin de maximiser nos chances de réaliser des observations pertinentes et représentatives de la diversité des territoires, trois agroécosystèmes contrastés ont été sélectionnés. Le premier site est un bassin versant entouré de zones agricoles et représente une approche dite « territoriale ». Le second site consiste en une expérimentation agronomique en cours depuis plusieurs années au sein de laquelle différents types d'apports (boues de station d'épuration, effluents d'élevage, apport minéral) sont appliqués de manière contrôlée sur une plantation de canne à sucre. Ce site représente une approche « contrôlée ». Finalement, le troisième site se trouve dans une zone d'élevage intensif, à l'interface avec une zone de maraîchage. Alors que les deux premiers sites avaient déjà été sélectionnés au début de mon stage, le choix du troisième site a fait partie intégrante de mon travail au travers de nombreuses enquêtes et entretiens avec des professionnels du monde agricole.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Site de recherche

Les trois sites sélectionnés sont définis comme des agroécosystèmes, c'est-à-dire des écosystèmes modifiés par l'Homme comme support de production agricole. Il est donc important de connaître le contexte agricole sur l'île de La Réunion. Les pratiques agricoles, sur cette dernière, restent raisonnées et sont en accord avec le plan Écoantibio 2 du ministère de l'agriculture qui a pour but de réduire les risques d'antibiorésistance en élevage (Josse & Cardinale, 2021a). Notre choix s'est porté sur trois sites contrastés caractérisés par une diversité des approches et des systèmes agricoles.

#### 2.1.1. Enquêtes

Le site du bassin versant (Petite-Ile) et le site de l'essai agronomique (Sainte-Marie) avaient été sélectionnés avant le début du stage car ces derniers font l'objet d'autres travaux de recherche par des unités du CIRAD. L'identification du troisième site (élevage intensif/maraîchage) a fait partie intégrante de mon travail de stage. Afin de mieux connaître les pratiques agricoles réalisées au sein des différents sites, et de choisir le lieu du 3<sup>ème</sup> site, j'ai réalisé un travail d'enquêtes auprès de différents acteurs du monde agricole réunionnais répartis sur différents lieux de l'île, comme illustré en Figure 6. En amont des rencontres avec les agriculteurs, un questionnaire a été élaboré pour obtenir un descriptif de leur exploitation avec leurs différentes activités, leurs usages d'antibiotiques et le devenir des Pro (Annexe 1). Sur cette carte, les trois sites d'études sélectionnés sont représentés par des croix vertes, les exploitations agricoles visitées non retenues par des points oranges et les autres interlocuteurs comme les coopératives agricoles et cabinets vétérinaires par des points bleus.

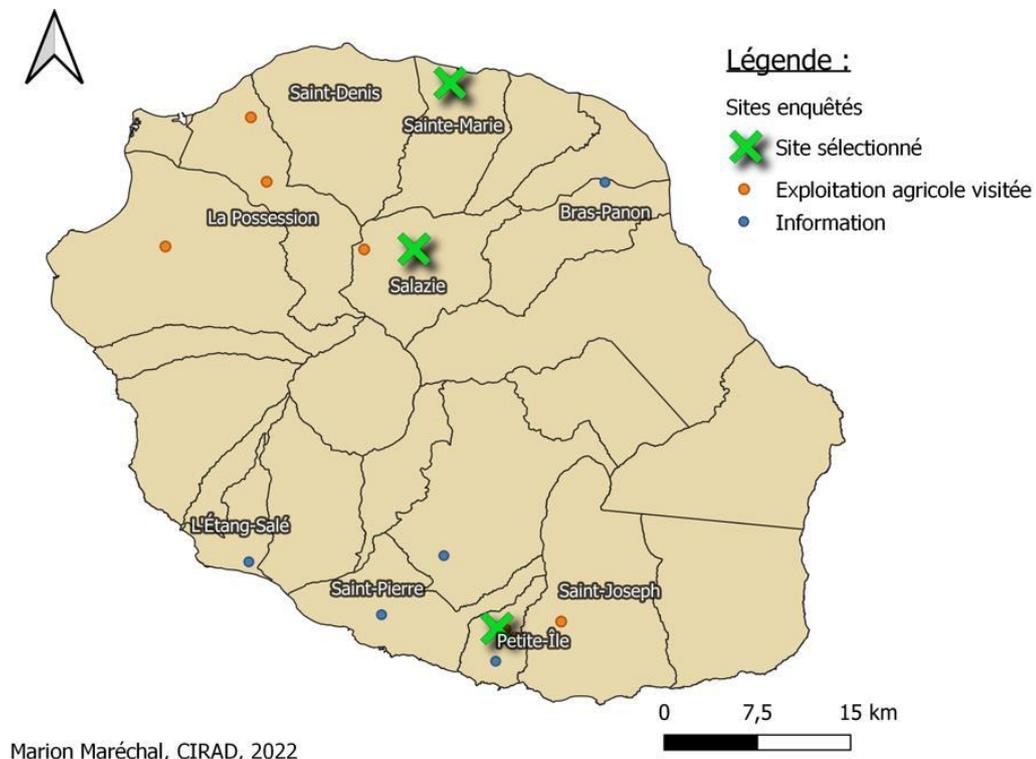


Figure 6 : Carte des sites enquêtés à La Réunion.

### 2.1.2. Petite-Ile

Le site du bassin versant a pour objectif d'analyser l'eau de points de captage et d'envisager des liens possibles avec les pratiques agricoles voisines qui pourraient avoir des répercussions sur la santé publique, suite à la consommation de cette eau par l'Homme. Il a été sélectionné car un suivi est réalisé d'amont en aval sur sa qualité de l'eau, ainsi les installations de mesure déjà mises en place par le projet Territoires Durables du CIRAD ont pu être utilisées. De plus, il s'agit d'un bassin versant diversifié en termes de type de production agricole (maraîchage, agrumes, cannes à sucre, vergers, élevages, etc.) et également une zone d'habitation est présente (Figure 7). Il est donc pertinent de l'étudier afin d'identifier si des résidus d'antibiotiques ou des gènes de résistance liés à l'agriculture ou bien à l'Homme peuvent être trouvés dans l'eau.

Ce site est localisé sur la commune de Petite-Ile dans le sud-ouest de l'île de La Réunion (Figure 6). Il s'étend sur une superficie d'environ 850 ha (Desmurs, 2021). Le CIRAD a mis en place depuis 2021, trois stations automatisées de prélèvements d'eau indiquées par des points noirs sur la Figure 7. Elles se situent à environ 400, 600 et 750 m d'altitude et sont collectées une fois par semaine. Ainsi, chaque prélèvement constitue un mélange d'eau de surface captée sur une semaine entière. Des mesures physiques (température, salinité, débit, etc.) et de présence de pesticides sont régulièrement réalisées dans le cadre d'autres projets de recherches, notamment car les deux stations les plus élevées se situent sur des captages d'eau potable. L'analyse de résidus de médicaments ou gènes de résistance n'a cependant jamais été réalisée sur ce site. Une centaine de petites exploitations agricoles d'environ 6 ha chacune sont situées sur le bassin versant. Elles possèdent des cultures de cannes à sucre (24% de la surface totale), des vergers (17%) et des cultures maraîchères (11%) (Desmurs, 2021). Ainsi, l'ensemble de la zone cultivée est traité avec des produits phytopharmaceutiques. De plus, il y a également quelques élevages, principalement bovins avec des prairies et porcins. Durant mon travail d'enquête, un éleveur porcin/bovin de la zone a été interrogé pour connaître ses pratiques d'élevage et d'épandage. Ce dernier a indiqué utiliser assez fréquemment des antibiotiques, épandre du lisier de porc et du fumier de bovin sur des parcelles de cannes à sucre et des vergers. Ce site permet d'avoir accès à des captages d'eau sur un territoire dont les pratiques agricoles sont déjà bien connues.

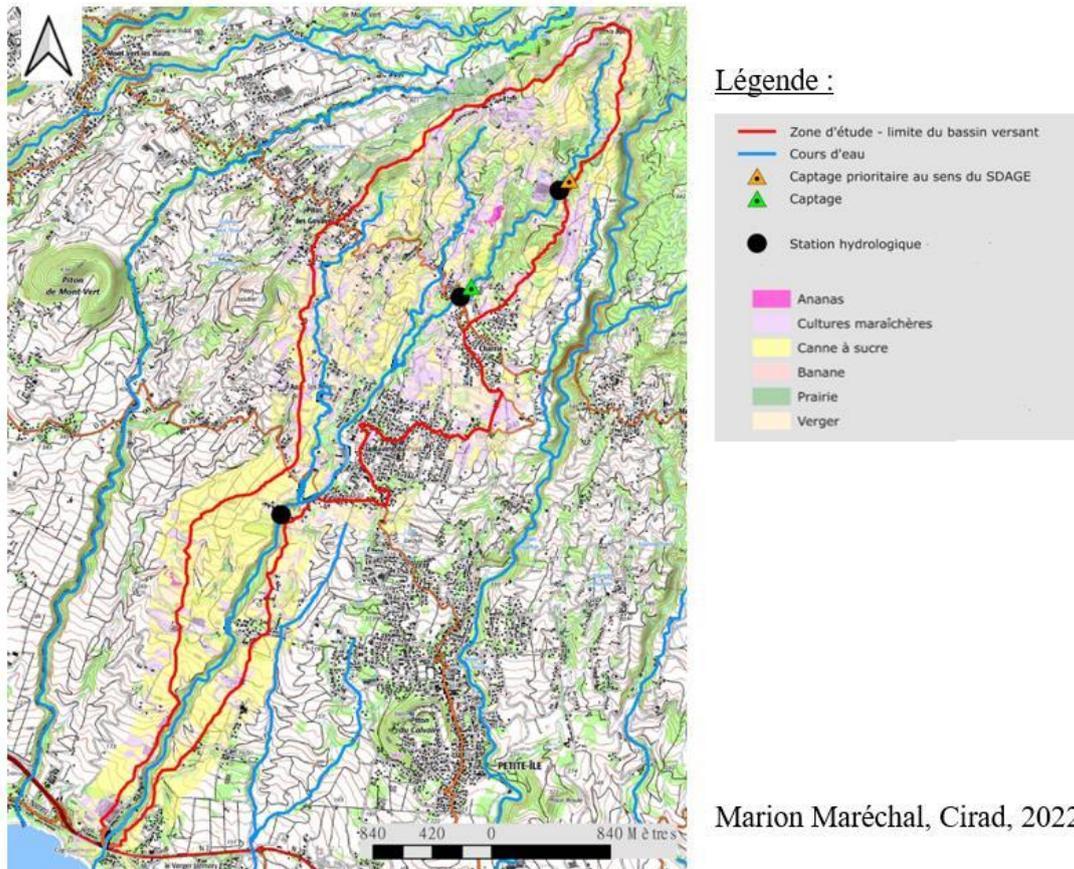


Figure 7 : Carte de l'occupation des sols du bassin versant de Petite-Ile.

### 2.1.3. Sainte-Marie

L'essai agronomique de Sainte-Marie a pour but de rechercher si l'application de produits résiduaux organiques (Pro), définis comme matières organiques d'origine résiduaux produites par les activités anthropiques (Houot, 2014), peut avoir des répercussions sur les sols amendés et l'environnement. Ce site a été choisi car les pratiques agricoles sont maîtrisées et testées depuis plusieurs années par l'équipe Recyclage & Risque du CIRAD. Une échantillothèque conservant tous les échantillons depuis le début de l'essai a permis de sélectionner les plus appropriés pour notre étude. Ce deuxième site, implanté depuis 2013 est défini comme un observatoire de recherche en environnement. L'essai se situe sur la commune de Sainte-Marie au nord-est de l'île (Figure 6). Il est intégré à un réseau de sites expérimentaux en plein champ de longue durée, nommé SOERE-PRO (Feder, 2020). Le CIRAD travaille sur ce projet en collaboration avec Runéo (filiale réunionnaise de Véolia-Eau) qui est le principal gestionnaire des stations d'épuration et de la distribution de l'eau potable sur l'île. Différents contaminants traces organiques (CTO) comme des médicaments à usage humain et vétérinaire pouvant se retrouver dans les Pro (Aabbar, 2020), il est nécessaire d'évaluer les risques d'occurrence et d'accumulation de ces CTO dans les sols amendés avec les Pro.

Sur cet essai agro-environnemental en milieu tropical, la culture implantée est la canne à sucre. Elle constitue plus de la moitié de la superficie agricole réunionnaise. Sur ce site, quatre types de Pro sont étudiés : une boue digérée, séchée, chaulée et pelletisée de la station d'épuration voisine au site (modalité BA), un compost de cette boue mélangé à du bois de palettes (modalité CB), un lisier de porc (modalité LP) et une litière de volaille (modalité LV). De plus, il y a un témoin correspondant à l'application d'une fertilisation minérale tous les ans (modalité T) et un témoin avec une absence de fertilisation minérale une fois tous les quatre ans (modalité Ta). Ainsi, par bloc, les 6 modalités sont réparties au hasard sur une parcelle chacune et répétées sur 5 blocs au total (Figure 8). Les pratiques agricoles sont les mêmes pour toutes les parcelles (Aabbar, 2020).

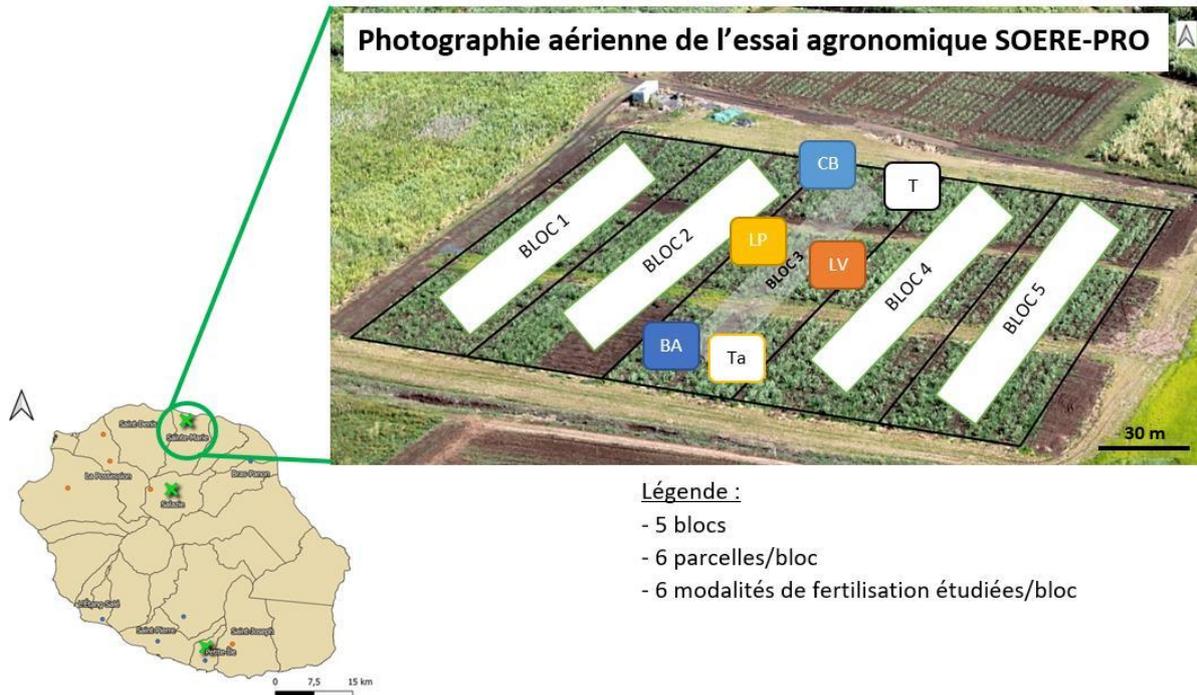


Figure 8 : Zoom sur l'essai agronomique SOERE-PRO.

Les modalités sont appliquées une fois par an après la récolte des cannes à sucre autour de novembre et avant le début du nouveau cycle de culture. Cependant, la litière de volaille et le compost de boues sont épandus tous les 4 ans car ils correspondent à un amendement organique qui a pour objectif d'améliorer la structure physique d'un sol et ses propriétés chimiques. Les autres apports sont définis comme engrais organiques visant à amener des nutriments absents dans un sol pour le développement des plantes. Les deux élevages de porc et de volaille participant à cet essai sont des grands élevages, intensifs. Pour mieux comprendre les futurs résultats, l'exploitant fournissant la litière de volaille a été interrogé sur ses pratiques. Il utilise des antibiotiques qu'en cas extrême, suite à plusieurs décès par exemple. De plus, il ne livre pas la litière des animaux ayant reçu un traitement au CIRAD. Concernant, l'éleveur porcin qui fournit le lisier, il n'a pas répondu à notre sollicitation. Néanmoins, les techniciens du CIRAD récupérant le lisier chaque année ont pu nous indiquer que des emballages d'antibiotiques ont été retrouvés dans le lisier et que les pratiques d'élevage n'étaient pas toujours maîtrisées. Ainsi, il semblerait que cette exploitation ait recours à des antibiotiques assez régulièrement.

Ce site correspond à une approche contrôlée dont les Pro, les sols et les pratiques agricoles sont finement caractérisés. Il peut ainsi permettre de mieux comprendre ce qui se passe pour chaque parcelle étudiée. Cependant, même si les pratiques optimales conseillées pour la culture de cannes à sucre sont suivies, cet essai ne représente pas, de ce fait, complètement la réalité du terrain. Ceci s'explique car il s'agit d'un essai agronomique pour la recherche où les parcelles sont isolées et beaucoup plus petites en superficie (300 m<sup>2</sup> chacune) que les parcelles classiques rencontrées sur l'île. De plus, leur environnement et les apports sont maîtrisés.

#### **2.1.4. Salazie**

Ce troisième site a pour vocation d'étudier le risque associé à l'utilisation d'effluents d'élevage dans le cadre d'une pratique agricole de type maraîchage. En effet, des résidus d'antibiotiques ou des gènes de résistance présents dans des effluents d'élevage pourraient se retrouver dans le sol ou même les plantes d'un maraîcher faisant usage de telles matières organiques pour fertiliser son sol, et ainsi représenter un risque de transfert à l'Homme via la consommation de légumes crus. Une situation d'élevage/maraîchage a été choisie, tout d'abord, pour avoir des conditions réelles, mais, également car les cultures de maraîchage peuvent recevoir des quantités d'effluents épandus par unités de surface beaucoup plus importantes comparées à la culture de cannes à sucre (Chalet & Leung, 2016). Et surtout, le maraîchage de cultures consommées crues a été favorisé car les risques sont directs pour l'Homme. Par conséquent, nous avons cherché à identifier une situation idéale dans laquelle un éleveur ayant recours aux antibiotiques produirait des effluents d'élevage valorisés en maraîchage. Jusqu'à présent, peu d'études sur l'antibiorésistance à l'interface entre les compartiments animal/plante ont été réalisées (Goulas et al., 2020).

Pour trouver ce site, une analyse bibliographique a tout d'abord été réalisée au niveau de l'utilisation des antibiotiques au sein des différentes filières d'élevage sur l'île (Josse & Cardinale, 2021a). La principale étude effectuée auprès des cabinets vétérinaires réunionnais datant de 2019 contient de précieuses données macroscopiques par filière d'élevage. Cependant, la réalité pour chaque exploitation peut être différente et les pratiques d'élevage ont pu évoluer en trois ans. C'est pourquoi, des enquêtes auprès d'au minimum deux éleveurs par filière d'élevage (cunicole, avicole, porcine et bovine) ont été menées à bien. Elles permettent de mieux comprendre également les pratiques réelles du terrain et le contexte local. Le contact des éleveurs a souvent été obtenu auprès des différentes coopératives et pour faciliter nos demandes et les interactions, une fiche explicative du projet avec un contrat d'anonymat a été rédigée pour toutes les visites (Annexe 2). Suite à ces recherches et enquêtes, il a été conclu que :

Pour la filière bovine, l'utilisation d'antibiotiques est assez rare, un peu plus fréquente pour les bovins laitiers et a lieu dans les grandes exploitations car cela engendre un coût important. Néanmoins, les animaux sont élevés généralement sur caillebotis et le lisier obtenu est épandu sur des cannes à sucre.

Pour les élevages de lapins, ces animaux étant très sensibles, l'utilisation d'antibiotiques est plus régulière, notamment à des moments clefs comme autour de la période de mise-bas. D'après les éleveuses interrogées, depuis environ un an les aliments médicamenteux ont été proscrits par la coopérative à La Réunion et remplacés par des huiles essentielles dont l'efficacité semble très prometteuse.

Pour la filière volaille, elle est la filière la plus consommatrice d'antibiotiques, à qui est destinée 36% des quantités d'antibiotiques à usage vétérinaire vendues sur l'île en 2018 (Josse & Cardinale, 2021a). D'après les vétérinaires, un dixième des élevages a recours à des antibiotiques régulièrement. Selon les éleveurs rencontrés, très peu d'antibiotiques sont employés, au maximum une fois par an sur une bande. Cependant, dans les exploitations visitées, aucun effluent d'animaux traités n'a été récemment appliqué en fertilisation dans un contexte de maraîchage.

Pour la filière porcine, elle correspond à la deuxième filière la plus consommatrice d'antibiotiques avec 25% des ventes d'antibiotiques de 2018. Mais, en termes de poids vif traité, les porcs sont largement en première position avec 47% du total des espèces traitées (Josse & Cardinale, 2021a). Les éleveurs utilisent des antibiotiques régulièrement en général lors du post-sevrage car les animaux sont plus fragiles. Quelques quantités d'antibiotiques sont injectées au cas par cas lors d'observations, par exemple, de boiteries, d'infections de peau ou de toux.

En conclusion, ce sont les élevages porcins qui utilisent le plus régulièrement des antibiotiques dans le contexte réunionnais (Gay et al., 2018). Notre choix s'est donc porté sur l'un des élevages porcins interrogés répondant à tous les critères (Annexe 1 : questionnaire avec les réponses de l'éleveur et du maraîcher sélectionnés). Il se situe dans le cirque de Salazie (Figure 6) qui est une zone à forte densité d'élevage. L'éleveur est naisseur-engraisseur de porcs sur deux bâtiments. Il utilise des antibiotiques pour les soigner assez régulièrement en traitement curatif. Deux-tiers des porcs sont sur paille et produisent du fumier. L'autre partie est sur caillebotis intégral et génère du lisier. D'autre part, l'éleveur possède trois bâtiments de poulets de chair (Figure 10) mais aucun antibiotique ne leur a été administré depuis plus de 6 ans. Néanmoins, leur alimentation contient des oligo-éléments (cuivre, zinc, fer, etc.) qui se retrouvent dans les Pro et peuvent ainsi constituer une pression de sélection favorable à l'apparition de gènes de résistance (Poole, 2017). Les poulets sont élevés sur des copeaux de bois à partir desquels de la litière est produite. Finalement, ces trois types d'effluents d'élevage sont mélangés et placés dans la station de compostage de l'exploitation. Après 6 mois, avec plusieurs retournements et montées en température, le compost obtenu est analysé par la chambre d'agriculture de La Réunion pour différents paramètres physiques, chimiques et agronomiques. Il est ainsi normalisé et vendu en tant qu'engrais organique (Figure 9) bien que les analyses réalisées ne permettent pas de détecter la présence de résidus médicamenteux ni de potentiels gènes de résistance aux antibiotiques.



*Figure 9 : Photographie de la station de compostage de l'exploitation sélectionnée.  
À gauche : un compost de 15 jours et à droite : un compost de 6 mois.*

Nous avons également rencontré un des maraîchers utilisant le compost de l'éleveur sélectionné et l'avons interrogé sur ses pratiques d'épandage (Annexe 1). Il se situe à seulement 4 km de l'élevage (Figure 10) et possède 1 ha de maraîchage plein champ avec des salades, choux, choux-raves, navets, coriandres, etc. Avant tout début de cycle cultural, il recouvre le sol du compost de notre éleveur et/ou de litières de volaille d'autres élevages, à raison d'environ 250 kg d'effluents d'élevage pour 200 m<sup>2</sup> de parcelle. Le compost est plus riche mais plus difficile à travailler. Il s'en sert essentiellement sur ses terres plutôt à tendance sableuses pour retenir l'eau. Ensuite, il retourne le sol en surface sur 5 à 10 cm puis il met de l'engrais chimique avant de poser une bâche où il fait des trous pour planter les végétaux.

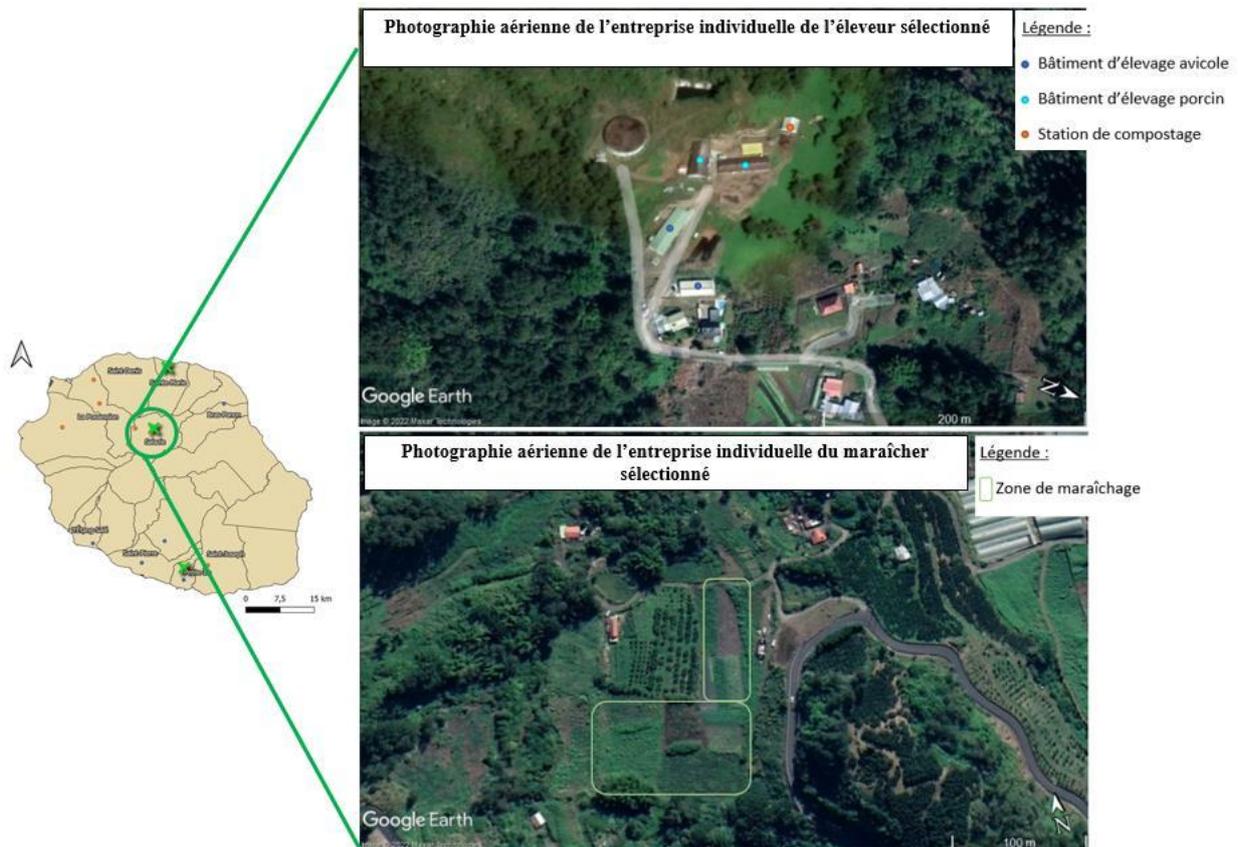


Figure 10 : Zoom sur la zone d'étude de Salazie.

L'intérêt de ce site est de réaliser un suivi des différents composants étudiés de l'élevage au maraîchage dans des conditions de pratiques agricoles réelles. Néanmoins, ces dernières ne sont connues que de manière approximative suite aux indications des éleveurs, ainsi d'autres facteurs inconnus peuvent influencer les résultats.

## 2.2. Campagnes de terrain et préparation des échantillons

Au total, 16 échantillons différents ont été récoltés sur l'ensemble des trois sites (Tableau 1), un nombre limité par le coût des différentes analyses prévues. Tous les prélèvements effectués sur le terrain ont été placés dans des glacières, aliquotés et congelés le plus rapidement possible afin de conserver au mieux la composition biologique et chimique des échantillons. La manipulation des échantillons sur le terrain et au laboratoire a été réalisée dans des conditions de stérilité visant à ne pas modifier leur composition microbienne et génétique (désinfection des outils, utilisation de gants en latex, etc.).

Tableau 1 : Récapitulatif des 16 échantillons prélevés.

| Site         | Numéro d'échantillon | Nature de l'échantillon                       | Matrice | Code     | Date prélèvement |
|--------------|----------------------|---|---------|----------|------------------|
| Sainte-Marie | S1                   | Boue de station d'épuration                   | Pro     | Boue     | 2020             |
|              | S2                   | Lisier de porc de 2020                        | Pro     | LP2020   | 2020             |
|              | S3                   | Litière de volaille de 2017                   | Pro     | LV       | 2017             |
|              | S4                   | Sol amendé par la boue                        | Sol     | SB       | 2021             |
|              | S5                   | Sol amendé par le lisier de porc 2020         | Sol     | SLP      | 2021             |
|              | S6                   | Sol amendé par la litière de volaille 2017    | Sol     | SLV      | 2018             |
|              | S7                   | Sol amendé par la fertilisation minérale      | Sol     | SFM      | 2021             |
|              | S8                   | Lisier de porc de 2018                        | Pro     | LP2018   | 2018             |
| Salazie      | S9                   | Compost de 6 mois                             | Pro     | C15      | 23/06/2022       |
|              | S10                  | Compost de 15 jours                           | Pro     | C6       | 23/06/2022       |
|              | S11                  | Sol témoin                                    | Sol     | ST       | 23/06/2022       |
|              | S12                  | Sol amendé par compost en février             | Sol     | SCF      | 23/06/2022       |
|              | S13                  | Sol amendé par compost en février et en avril | Sol     | SCA      | 23/06/2022       |
|              | S14                  | Mélange de plantes                            | Plante  | Plantes  | 23/06/2022       |
|              | S15                  | Eau d'irrigation                              | Eau     | Eau_irri | 23/06/2022       |
| Petite-Ile   | S16                  | Eau de captage                                | Eau     | Eau_capt | 10/05/2022       |

### 2.2.1. Petite-Ile

Des prélèvements d'eau ont été réalisés le 10/05/2022 sur chacune des trois stations automatiques installées au sein du bassin versant. Les prélèvements ont intentionnellement été effectués suite à une semaine pluvieuse afin de maximiser les chances de détecter des résidus d'antibiotiques ou des gènes de résistance par effet de ruissellement/infiltration (Barrios et al., 2020; Goulas et al., 2020; Haenni et al., 2022). Pour chaque station, 3 L d'eau ont été prélevés et stockés dans des bouteilles en verre. De retour au laboratoire, les échantillons ont été filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$  (sous hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination) afin de retenir les bactéries présentes dans l'eau (Figure 11). Les filtres et les eaux filtrées ont ensuite été conservés à -20 °C. Afin de limiter le coût des analyses tout en maximisant nos chances de réaliser des observations pertinentes, les trois échantillons issus des trois stations de captage ont été poolés (en proportions égales) en un seul (identifié échantillon S16, nommé Eau\_capt) pour la réalisation des différentes analyses. Les filtres ont été conditionnés dans des tubes Falcon pour l'analyse des gènes de résistance. Deux litres d'eau filtrée composite ont été préparés pour l'analyse des résidus médicamenteux et un tube Falcon de 50 ml d'eau filtrée composite précipitée avec de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  à 2,5%) a été préparé pour la recherche des ETMs.



Figure 11 : Photographies des différentes étapes du prélèvement du cours d'eau à la filtration en laboratoire.

### 2.2.2. Sainte-Marie

Pour ce site expérimental, un échantillonnage est réalisé chaque année en novembre depuis 2013 par l'équipe du CIRAD en charge de l'essai agronomique. Les sols ont été prélevés avec une tarière manuelle au niveau de l'horizon superficiel (0-10 cm) et tamisés à 4 mm. Les différents échantillons étant stockés dans une chambre froide à -20 °C, notre travail d'échantillonnage a été facilité et a consisté à choisir et conditionner les échantillons souhaités directement à partir de la collection du CIRAD. Chaque échantillon stocké dans la collection est constitué d'un mélange de 6 prélèvements réalisés sur une même parcelle. Nous avons choisi des échantillons provenant du bloc 3 (Figure 8) car il se situe dans une zone située au milieu de l'épandage et est le plus homogène. Un total de 8 échantillons constitués de 4 Pro (échantillons 1 à 3 et 8) et 4 sols (échantillons 4 à 7) ayant reçu une fertilisation ont été sélectionnés (Tableau 1).

L'échantillon S1 (Boue) est une boue de station d'épuration ayant été digérée, séchée, chaulée et pelletisée en 2020. Le sol ayant reçu ce traitement constitue l'échantillon S4 (SB) et a été prélevé en 2021. Les échantillons S2 (LP2020) et S8 (LP2018) sont du lisier de porc épandu en 2020 et 2018, respectivement sur un sol prélevé en 2021 et constituant l'échantillon S5 (SLP). Le dernier Pro est une litière de volaille datant de 2017 (échantillon S3, LV) appliquée sur un sol prélevé en 2018 (échantillon S6, SLV). Le dernier échantillon (S7, SFM) est un sol témoin sur lequel seule une fertilisation minérale a été appliquée.

Les 8 échantillons ainsi sélectionnés ont été sortis de la collection, lyophilisés, homogénéisés et conditionnés dans des tubes Falcon pour les différentes analyses : 1 g pour la recherche des gènes de résistance et 2x10 g pour l'analyse des résidus médicamenteux et des ETMs, respectivement.

### **2.2.3. Salazie**

Sept échantillons ont été prélevés le 23/06/2022 chez l'éleveur et le maraîcher sélectionnés sur ce troisième site. Chez l'éleveur, nous avons prélevé deux échantillons de compost datant de 15 jours (échantillon S9, C15) et 6 mois (échantillon S10, C6), respectivement. Afin de constituer un échantillonnage le plus homogène et représentatif possible, chaque échantillon a été composé d'un mélange de 15 prélèvements réalisés à différents endroits et profondeurs du tas de compost selon un parcours circulaire à l'aide d'une tarière et d'une pelle à main. Les différentes matières organiques mélangées pour la préparation du compost (litière de volaille, fumier et lisier de porc) ont également été prélevées et conservées séparément mais ne seront pas analysées dans le cadre de ce travail de stage. Chez le maraîcher, nous avons tout d'abord réalisé trois échantillonnages de sols en suivant la même procédure : chaque échantillon a été composé de 15 prélèvements aléatoirement réalisés sur l'horizon superficiel (0-15 cm) de la parcelle à l'aide d'une tarière (Figure 13). Le premier (échantillon S11, ST) est un sol dit témoin, nu provenant d'une ancienne parcelle de bananiers, arrêlée il y a 3 ans sur lequel aucun apport de matière organique n'a, aux dires de l'agriculteur, été réalisé. Les deux autres prélèvements ont été réalisés sur une zone constituée d'un sol sableux et composée de deux bandes de 40 m \* 4,2 m (Figure 12) ayant reçu des apports de compost de notre éleveur en février 2022 (échantillon S12, SCF) et en février et avril 2022 (échantillon S13, SCA), respectivement. Ensuite, différents végétaux (aériens : 3 types de salades & de la coriandre ; racinaires : navets & choux-raves) ont été aléatoirement prélevés sur les deux bandes étudiées, constituant l'échantillon S14 (Plantes). Finalement, le dernier échantillon a été constitué d'eau d'irrigation (3 L) utilisée sur l'exploitation et provenant du captage le plus proche (S15, Eau\_irri).

De retour au laboratoire, les différents prélèvements ont été conditionnés de façon similaire aux autres sites, à l'exception de la phase de lyophilisation qui n'a pas été réalisée. Les sols ont été tamisés à 4 mm avant d'être répartis dans des tubes Falcon contenant 1 g (pour la recherche des gènes de résistance) et 2x10 g (pour l'analyse des résidus d'antibiotiques et des ETMs) (Figure 13). Les échantillons de composts ont suivi le même conditionnement. Les échantillons de plantes ont été grossièrement nettoyés. Les parties consommées par l'Homme ont été découpées en petits morceaux et mélangées pour obtenir un échantillon composite composé d'environ 500 g de végétaux aériens et de 400 g de végétaux racinaires (Figure 14). Ce dernier a ensuite été conditionné en tube Falcon de 1 et 10 g pour la réalisation des différentes analyses. Finalement, l'eau d'irrigation a subi le même protocole de filtration que celle prélevée sur le bassin versant (cf. 2.2.1.). L'ensemble des échantillons ont ensuite été placés à -20 °C.

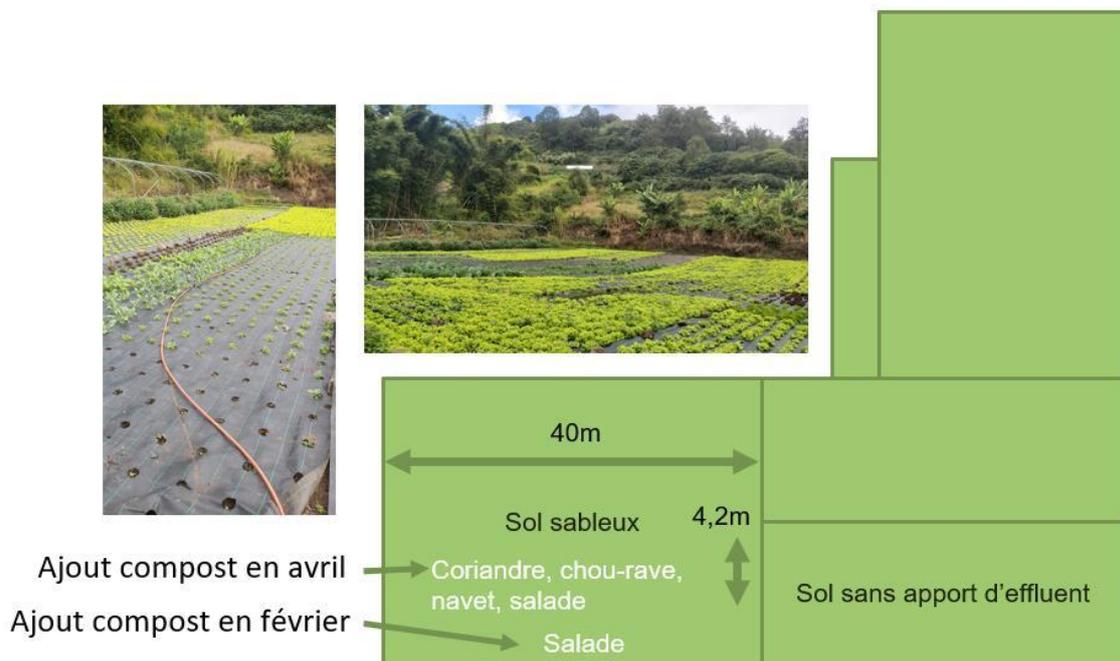


Figure 12 : Schéma et photographies de la zone d'échantillonnage chez le maraîcher de Salazie.



Figure 13 : Photographies des différentes étapes, de gauche à droite, du prélèvement des sols à la tarière, du sol tamisé à 4 mm et de l'aliquote en tube Falcon de 50 mL.



*Figure 14 : Photographies des différentes étapes, de gauche à droite, du prélèvement des salades, coriandres, choux-raves et navets, aliquote du mélange des végétaux en tube Falcon de 50 mL.*

## **2.3. Analyses des échantillons**

L'ensemble des 16 échantillons ont été analysés selon un socle commun de trois méthodologies différentes par plusieurs laboratoires partenaires. Dans un premier temps, une analyse génétique a été réalisée pour détecter la présence de différents gènes de résistance aux antibiotiques. Ensuite, des analyses biochimiques ont été conduites dans le but de doser un certain nombre de résidus d'antibiotiques et d'éléments traces métalliques (ETMs). Pour les analyses de gènes de résistance et de résidus d'antibiotiques, les échantillons ont été expédiés dans de la glace carbonique (-80 °C) afin de préserver la composition biologique et chimique des échantillons.

### **2.3.1. Analyse des gènes de résistance**

L'analyse des gènes de résistance a été réalisée par un laboratoire finlandais, Resistomap (Resistomap Oy, 2020) sélectionné pour sa grande expérience dans la surveillance de la résistance aux antibiotiques à partir de différents échantillons environnementaux. La méthode employée est le profilage génétique à haut débit par PCR en temps réel sur SmartChip (qPCR). La qPCR a commencé à être appliquée au milieu des années 2000 dans le but de quantifier directement les gènes d'antibiorésistance dans divers échantillons environnementaux (Liguori et al., 2022). Ainsi, elle permet de détecter de manière très sensible et de quantifier les gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes associés aux éléments génétiques mobiles (Kasuga et al., 2022; Majlander et al., 2021). Le laboratoire dispose d'une liste de plus de 600 gènes cibles. L'analyse se fait sur une puce pouvant cibler jusqu'à 384 gènes pour 4 échantillons. Le laboratoire propose une puce « standard » répondant à la demande de la plupart de ses clients. Néanmoins, il est possible de créer sa propre puce en choisissant les gènes souhaités.

Pour réaliser ce choix, une étude bibliographique a tout d'abord été réalisée afin d'identifier les gènes, plasmides et intégrons les plus fréquemment étudiés et détectés dans l'environnement au niveau mondial (Goulas et al., 2020) ainsi qu'à La Réunion (Gay et al., 2018; Miltgen et al., 2020). Ensuite, l'analyse des familles d'antibiotiques les plus employées sur le territoire réunionnais a permis de compléter la liste des gènes à inclure. Nous avons également intégré des gènes de résistance aux ETMs, notamment associés au cuivre et au zinc qui sont les deux plus cités dans la littérature. Ces derniers font partie de la catégorie des Multiple Drug Resistance (MDR). Ils correspondent à des gènes associés à des pompes à efflux, des pompes qui se situent au niveau des membranes plasmiques des microorganismes et qui permettent de rejeter des molécules toxiques de la cellule. Dans cette catégorie, il existe notamment un gène de résistance spécifique à un composé chimique, nommé ammonium quaternaire, qui est présent dans la majorité des produits désinfectants utilisés au sein des exploitations agricoles. En plus des différents gènes de résistance sélectionnés, nous avons inclus 10 gènes spécifiques à certains taxons bactériens qui permettront de réaliser une rapide description taxonomique des échantillons. Finalement, 3 gènes de ménages (présents chez toutes les bactéries) ciblant l'ARN ribosomique 16S ont également été intégrés dans le but de pouvoir calculer l'abondance relative de chacun des gènes résistance détectés (Pärnänen et al., 2019). La liste totale des gènes sélectionnés est donnée en Annexe 3. En plus de la catégorie « Multiple Drug Resistance » (MDR, N = 41) renfermant des gènes de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques, les autres gènes de résistance sélectionnés sont associés aux familles d'antibiotiques suivantes : Aminoglycoside (AMI, N = 62), Béta-Lactamine (BL, N = 66), Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLSB, N = 47), Phénicol (PHE, N = 22), Quinolone (QUI, N = 11), Sulfonamide (SUL, N = 9), Tétracycline (TET, N = 32), Triméthoprime (TRI, N = 18) & Vancomycine (VAN, N = 24). Il y a donc 349 gènes associés à des résistances aux familles d'antibiotiques citées précédemment (Figure 15).

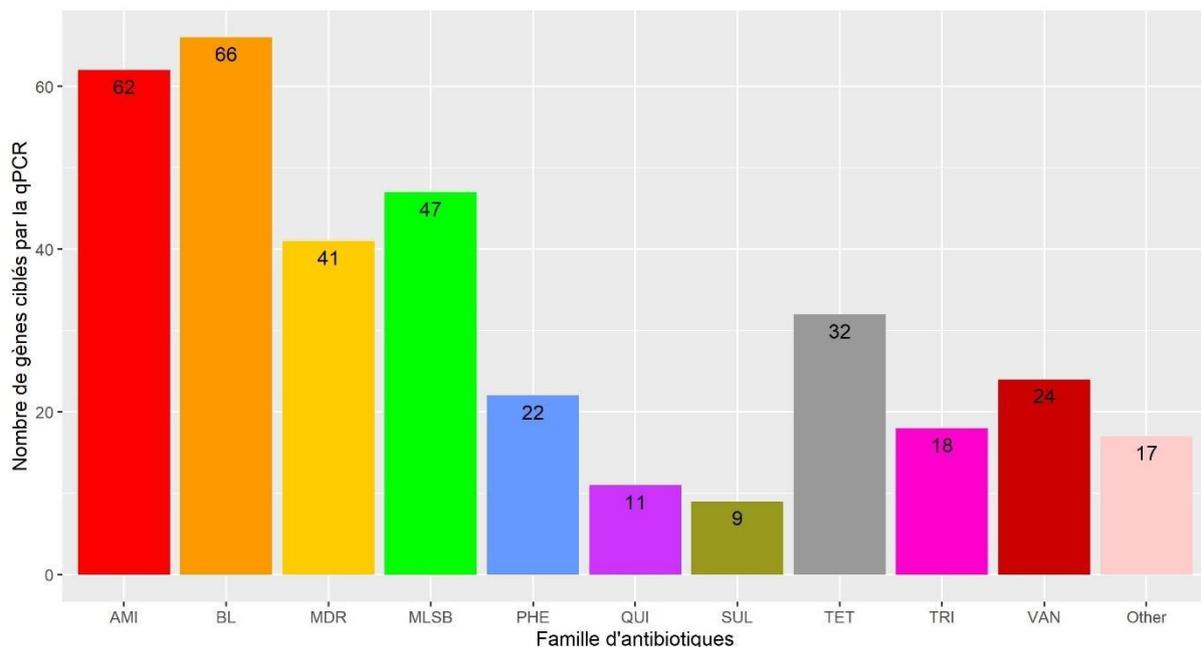


Figure 15 : Nombre de gènes de résistance ciblés par famille d'antibiotiques.

Une extraction de l'ADN total a été réalisée pour chacun des échantillons à l'aide d'un protocole et d'un kit adaptés à la nature variable des prélèvements. Les différents ADN ont ensuite été dosés et dilués afin de normaliser la quantité d'ADN entre les différents échantillons pour l'analyse en qPCR dont l'objectif d'amplifier grâce à une enzyme, la Taq polymérase, la cible de chacun des 384 fragments sélectionnés et inclus dans la « Smartchip ». Un total de trois répétitions pour chacune des réactions a été réalisé. Si l'ADN cible est amplifié, le résultat est constitué d'une valeur dite *Ct* pour « Cycle Threshold », correspondant au nombre de cycles d'amplification minimum pour pouvoir détecter l'ADN amplifié (lorsque le signal de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond). Ainsi, plus la quantité d'ADN initiale sera faible, plus le *Ct* sera élevé et inversement. Une valeur de *Ct* peut être analysée de façon binaire si on définit un seuil (amplifié ou non amplifié, donc gène présent ou absent), ou continu (un gradient de *Ct*) ce qui peut donner une indication de la quantité relative des gènes les uns par rapport aux autres, lorsque le nombre de copies des gènes au sein des différents individus est analysé.

### **2.3.2. Analyse des résidus d'antibiotiques**

L'analyse des résidus d'antibiotiques a été confiée à un laboratoire prestataire du laboratoire Resistomap. Ce dernier propose la détection de 52 résidus d'antibiotiques différents (Annexe 4) appartenant aux grandes familles d'antibiotiques suivantes : Béta-Lactamine, Macrolide, Phénicol, Quinolone, Sulfonamide & Tétracycline. Pour quantifier ces résidus, une extraction des résidus à partir des matrices solides a été réalisée. Ensuite, une chromatographie en phase liquide visant à séparer les constituants d'un échantillon, en les entraînant par un liquide à travers un solide divisé situé dans la colonne chromatographique a été accomplie. Finalement, les composants sont détectés et quantifiés par la technique de spectrométrie de masse, une méthode fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision.

### **2.3.3. Analyse des ETMs**

Deux types d'analyses réalisées par des laboratoires du CIRAD vont permettre de doser les ETMs dans les différents échantillons.

D'une part, la quantité des ETMs totaux a été mesurée pour le cuivre, le zinc, le nickel, le plomb, le chrome et le cadmium. Différents protocoles de minéralisation ont été appliqués selon la matrice étudiée : une minéralisation triacide (Lopez & Valette, 2020) pour les sols et les effluents d'élevage, et une minéralisation par double calcination (Séguret, 2021) pour les végétaux. L'ensemble des échantillons incluant les échantillons d'eau ont ensuite été dosés par méthode ICP-AES. L'ICP (Inductively Coupled Plasma) correspond à une technique analytique à plasma à couplage inductif qui sert à mesurer la teneur d'un élément inorganique présent dans un échantillon. Cette technique est couplée à de la spectrométrie à émission atomique (AES) qui mesure les longueurs d'ondes émises par les ions (FILAB, 2022).

En plus de la quantité totale, une mesure de la fraction disponible des ETMs, dont les végétaux ont accès pour leur développement, a également été réalisée pour le cuivre et le zinc sur les échantillons de sol et de Pro. Pour ce faire, une extraction à l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA) a été effectuée avant un dosage par spectrométrie d'absorption atomique (Légier, 2003).

## 2.4. Traitement des données

Le logiciel R (R Core Team, 2022) a été utilisé pour analyser les données et tenter de mettre en évidence des tendances dans les différents résultats. R est un langage de programmation qui permet de traiter et d'organiser un ensemble de données, de les représenter graphiquement et d'y appliquer des tests statistiques. Ce langage est couramment utilisé par les statisticiens, ainsi que par la communauté scientifique et universitaire.

Les données issues de l'analyse génétique par qPCR ont été filtrées en ne conservant que les réactions caractérisées par un  $Ct \leq 27$  et en calculant un  $Ct_{moyen}$  sur les 3 répétitions pour chaque gène ciblé ( $N = 384$ ) et chaque échantillon ( $N = 16$ ). La valeur seuil de  $Ct = 27$  a précédemment été proposée comme limite de quantification associée à un nombre de 100 copies d'un gène dans un échantillon (Stedtfeld et al., 2008). Ainsi, les réactions caractérisées par un  $Ct_{moyen} > 27$  ont été transformées en données manquantes et associées à l'absence d'un gène dans un échantillon. En plus des données de présence/absence, la statistique d'abondance relative de chacun des différents gènes de résistance aux antibiotiques ciblés dans les différents échantillons ( $\Delta Ct$ ) a été calculée selon la formule suivante (Livak & Schmittgen, 2001) :

$$\Delta Ct = 2^{(Ct_{moyen} \text{ gène de référence} - Ct_{moyen} \text{ gène d'intérêt})}$$

Le gène de référence choisi est un gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) fréquemment utilisé en raison de sa présence et car il très conservé dans toutes les bactéries. L'utilisation de l'abondance relative permet de normaliser la mesure de présence de gènes d'antibiorésistance entre échantillons caractérisés par une composition microbienne différente.

Ainsi, les données de gènes de résistance ont été analysées à différentes échelles (échantillon, matrice et site) afin de générer différentes statistiques résumées et représentations graphiques descriptives à l'aide du package R ggplot2 (Wickham, 2009). De plus, des tests statistiques non paramétriques de Kruskal-Wallis et de Conover-Iman, ont permis respectivement de voir si la matrice ou le site ont un effet sur la moyenne de l'abondance relative et de comparer les échantillons deux à deux. Ensuite, une analyse en composantes principales (ACP) visant à déterminer la structuration des données sans *a priori* a été réalisée grâce aux packages FactoMineR et factoextra. L'ACP est une méthode d'analyse de la famille des statistiques multivariées qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites « corrélées » en statistique) en nouvelles variables décorréelées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées « composantes principales » ou axes principaux. L'ACP permet donc de résumer l'information en réduisant le nombre de variables. Il s'agit d'une approche à la fois géométrique (les variables étant représentées dans un nouvel espace, selon des directions d'inertie maximale) et statistique (la recherche portant sur des axes indépendants expliquant au mieux la variabilité des données).

Finalement, afin de tenter d'établir des corrélations entre la présence de gènes de résistance aux antibiotiques et d'ETMs, des régressions linéaires ont été réalisées à l'aide de la fonction lm du package stats.

### 3. Résultats

#### 3.1. Analyses génétiques

##### 3.1.1. Composition taxonomique des échantillons

L'inclusion dans l'analyse de 10 gènes spécifiques à certains taxons bactériens nous a tout d'abord permis de réaliser une rapide description taxonomique des échantillons. Il est cependant important de noter que ces 10 gènes ciblent différents niveaux taxonomiques : le Phylum (*Bacteroidetes* & *Firmicutes*), le Genre (*Campylobacter*, *Enterococci*, *Staphylococci* & *Streptomyces*) ou encore l'espèce (*A. baumannii*, *K. pneumoniae* & *P. aeruginosa*). Les gènes taxonomiques détectés sur chacun des 16 échantillons sont représentés sur la Figure 16. Ainsi, la composition bactérienne varie selon l'échantillon, avec un minimum de 2 gènes détectés pour les échantillons « Boue » et « Eau\_irri » et un maximum de 6 gènes détectés pour les échantillons « SFM », « LP2018 » et « C15 ». Parmi les 10 gènes étudiés, 3 (*Campylobacter* & *Streptomyces* 1&2) n'ont été détectés dans aucun des échantillons. A l'inverse, les 2 gènes ciblant les Phylums (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*) ont été détectés pour l'ensemble des 16 échantillons. L'ensemble des taxons détectés correspondent à des bactéries ubiquistes, c'est-à-dire connues pour coloniser un spectre large d'environnement comme le microbiote intestinal, le sol ou l'eau. Il est cependant important de se rappeler que de nombreuses autres bactéries, non ciblées par les 10 gènes taxonomiques utilisés, sont probablement présentes et viendraient compléter le microbiote naturel des échantillons analysés.

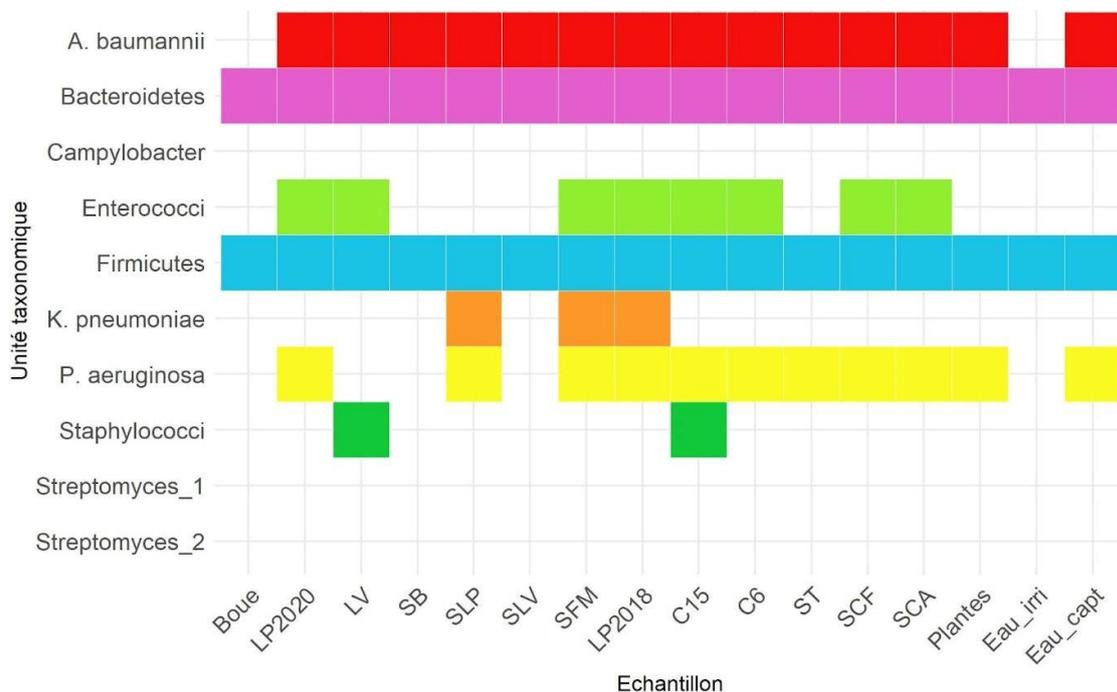


Figure 16 : Présence ou absence des gènes taxonomiques par échantillon.

### 3.1.2. Présence des gènes de résistance

L'analyse de détection des gènes par qPCR nécessite une concentration minimale d'ADN de  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Sur les 16 échantillons analysés, deux échantillons (S1 et S15) présentent des concentrations d'ADN bien inférieures à la valeur requise (Tableau 2). L'échantillon S1 est une boue de station d'épuration qui a subi plusieurs traitements incluant des montées en température importantes. Il est possible que de telles conditions puissent avoir tuées une grande partie des bactéries, entraînant la dégradation rapide de leurs acides nucléiques et expliquant ainsi une concentration en ADN très faible. Concernant l'échantillon S15, il correspond à de l'eau directement prélevée dans un captage pour irriguer des champs de maraîchage. Il est possible que la quantité de microorganismes dans l'eau ne soit pas suffisante pour atteindre le seuil requis pour la suite de l'analyse.

Tableau 2 : Concentration d'ADN extrait ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) pour chaque échantillon.

| Echantillon                                  | S1  | S2    | S3    | S4   | S5   | S6   | S7   | S8    | S9    | S10   | S11  | S12  | S13  | S14  | S15 | S16 |
|--|-----|-------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|-----|
| [ADN] ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) | 0,9 | 199,3 | 178,3 | 23,6 | 24,7 | 10,6 | 15,3 | 216,1 | 174,3 | 155,1 | 67,4 | 30,7 | 19,2 | 67,1 | 4,3 | 9,8 |

Le nombre total de gènes détectés (caractérisés par une mesure de  $C_t \leq 27$ , cf 2.4.) pour les différentes familles d'antibiotiques au sein des 16 échantillons est représenté en Figure 17. Les deux échantillons présentant des concentrations trop faibles en ADN (Boue et Eau\_irri) présentent un nombre réduit (13 et 29, respectivement) de gènes détectés et seront exclus de la suite des analyses. Pour les 14 échantillons restants, le nombre moyen de gènes détectés par échantillon est de 220 sur les 349 représentant des différentes familles d'antibiotiques. Le minimum de gènes détectés est de 138 pour l'échantillon de sol « SLV » et le maximum est de 298 pour l'échantillon de litière de porc « LP2018 ».

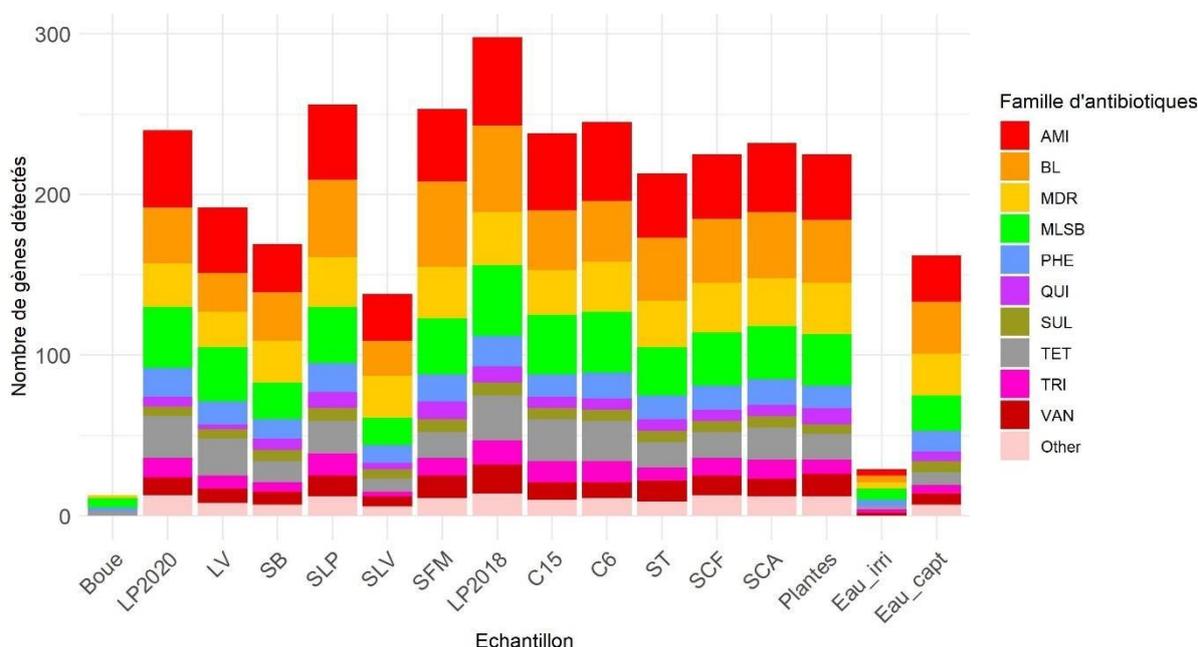


Figure 17 : Nombre de gènes détectés par famille d'antibiotiques pour chaque échantillon.

La proportion des différentes familles d'antibiotiques détectées au sein des 14 échantillons apparaît globalement très homogène (Figure 18). L'ensemble des familles d'antibiotiques ciblées sont présentes parmi les gènes détectés pour chacun des échantillons.

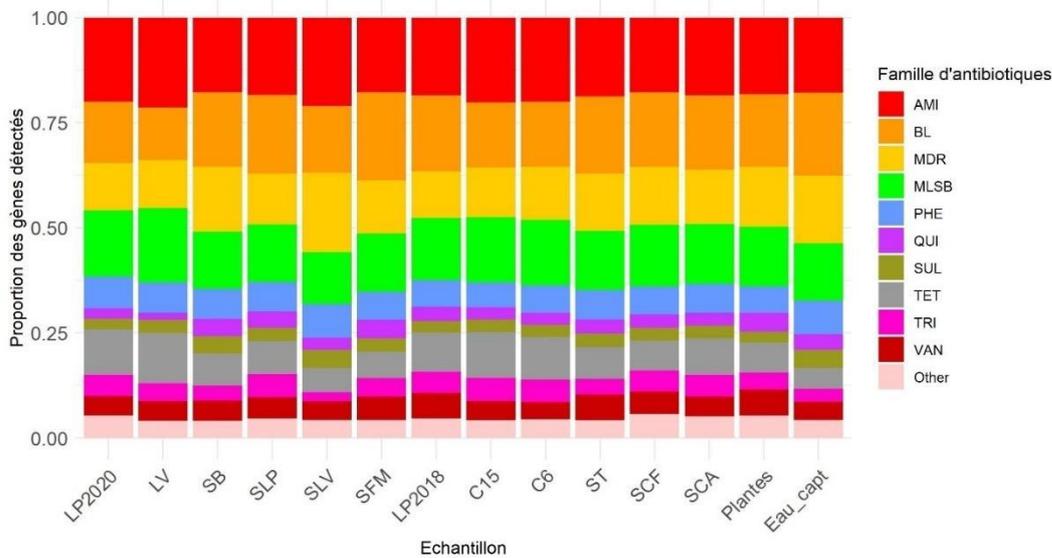


Figure 18 : Proportion des gènes détectés par famille d'antibiotiques au sein de chaque échantillon.

Le nombre de gènes détectés pour chaque famille d'antibiotiques et pour chaque échantillon est détaillé sur la *heatmap* de la Figure 19. La *heatmap*, ou carte de fréquentation en français, permet d'associer l'intensité d'une grandeur, ici le nombre de gènes détectés, avec un nuancier de couleur afin d'obtenir un aspect visuel plus facile à lire qu'un tableau de données. Les 6 échantillons avec le plus grand nombre de gènes détectés (Figure 17 : LP2020, SLP, SFM, LP2018, C15, C6), contiennent au moins 45 gènes de la famille des aminoglycoside (AMI) sur les 62 analysés.

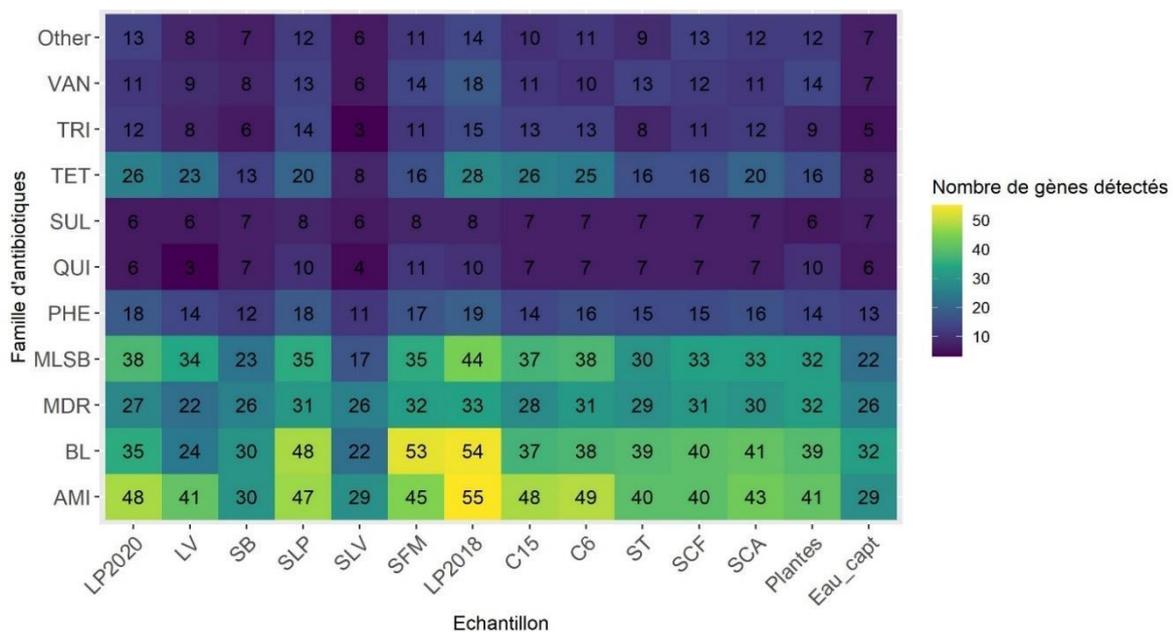


Figure 19 : Nombre de gènes détectés par famille d'antibiotiques pour chaque échantillon.

Après avoir analysé le nombre de gènes détectés par échantillon, intéressons-nous à leur distribution par famille d'antibiotiques. Le pourcentage de présence de chaque gène sur l'ensemble des échantillons est illustré sur la Figure 20. Sur ce *barplot*, ou diagramme à barres, chaque pic correspond à un gène. Ainsi, parmi les 349 gènes de résistance aux antibiotiques, 110 gènes sont présents dans tous les échantillons (100%), 30 gènes n'ont jamais été détectés (0%, pas de barre) et le reste présentent des prévalences variables.

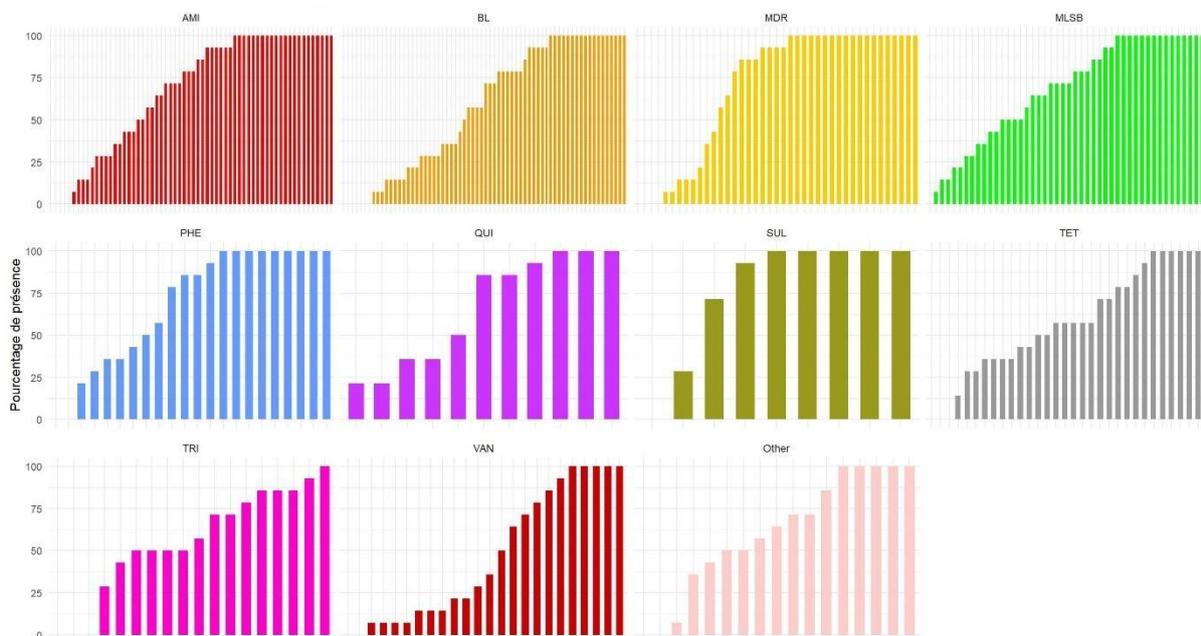


Figure 20 : Pourcentage de présence de chaque gène ciblé aux antibiotiques dans l'ensemble des 14 échantillons. Les gènes sont ordonnés par leur pourcentage de présence au sein de chaque famille.

### 3.1.3. Abondance relative des gènes de résistance

L'abondance relative de chacun des gènes de résistance a été calculée en normalisant les valeurs de *Ct* par celles mesurées sur un gène de référence : l'ARNr 16S. Ainsi, une valeur d'abondance égale à 1 signifie que la quantité du gène cible équivaut à celle du gène de référence. Une valeur d'abondance relative supérieure à 1 indique au contraire que le gène cible est plus abondant que le gène de référence, et inversement si elle est inférieure à 1. Pour une meilleure visualisation des données, les valeurs d'abondance relative ont été transformées en  $\log_{10}$  et représentées sur un *violin plot*, ou diagramme en violon. Ce type de graphique permet de visualiser la distribution globale des données, plus le violon est large plus la densité des points est importante. La majorité des gènes cibles présentent un  $\log_{10}$  de l'abondance relative inférieure à 0, c'est-à-dire qu'ils sont en quantité inférieure par rapport au gène de référence. Ceci semble cohérent car le gène de référence 16S est présent dans l'ensemble des bactéries (souvent en plusieurs copies) alors que les gènes de résistance ne le sont pas forcément. La moyenne du  $\log_{10}$  de l'abondance relative (représentée par un point noir) est la plus élevée pour les échantillons de sol ayant reçu du lisier de porc (SLP) et une fertilisation minérale (SFM), et elle est la plus faible pour l'échantillon composite de plantes (Figure 21). Une telle représentation a également été réalisée indépendamment pour chaque famille d'antibiotiques (Annexe 5).

Seuls 2 gènes ont été détectés avec une abondance relative supérieure à 1 ( $\log > 0$ ), soit en quantité supérieure à celle du gène de référence : le gène *catQ* (résistance aux phénicoles) présentant une abondance de 12,78 dans l'échantillon d'eau de Petite-Ile et le gène *aadA7* (résistance aux aminoglycosides) avec une abondance de 1,42 dans l'échantillon SFM du site de Sainte-Marie.

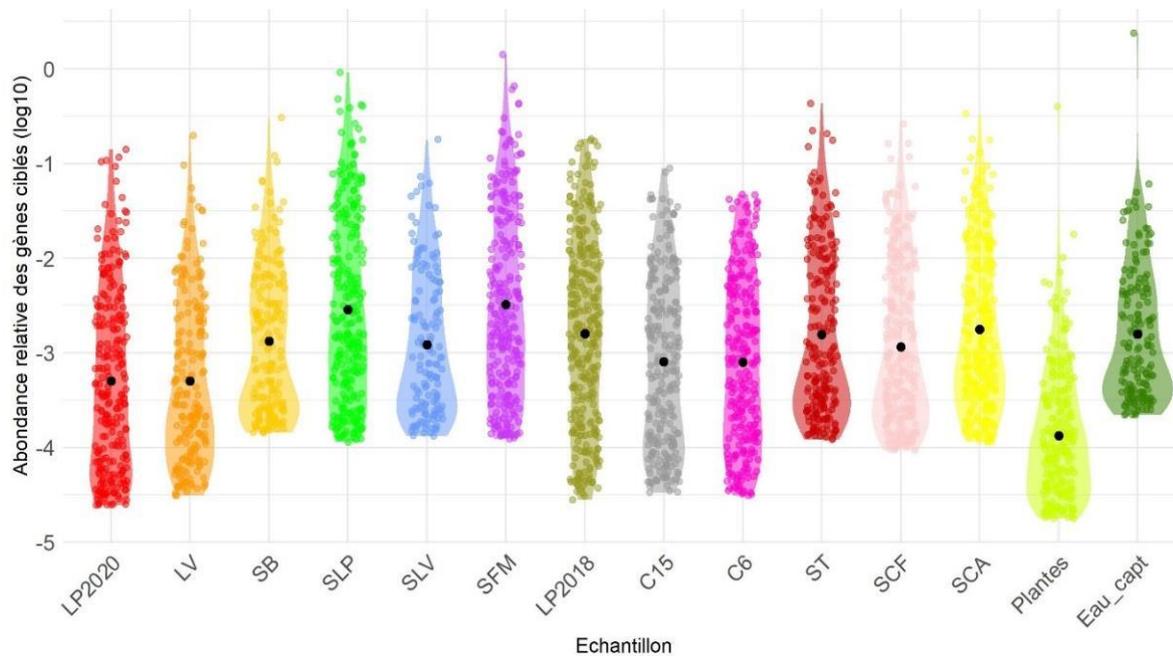


Figure 21: Abondance relative des gènes ciblés ( $\log_{10}$ ) par échantillon. Le point noir indique la moyenne de l'abondance relative.

Afin de pouvoir identifier les gènes les plus abondants pour chaque famille d'antibiotiques et chaque échantillon, un graphique de type *heatmap* représentant l'abondance relative de chaque gène a été réalisé (Annexe 6). Au vu du grand nombre de gènes analysés, cette figure est difficile à visualiser en totalité dans ce rapport. Pour illustration, un graphique ne contenant que les gènes des familles phénicoles (PHE) et quinolones (QUI) est présenté en Figure 22. Par exemple, le gène *catQ* des phénicoles présente une abondance élevée dans les échantillons Eau\_capt et Plantes mais il est absent des autres échantillons.

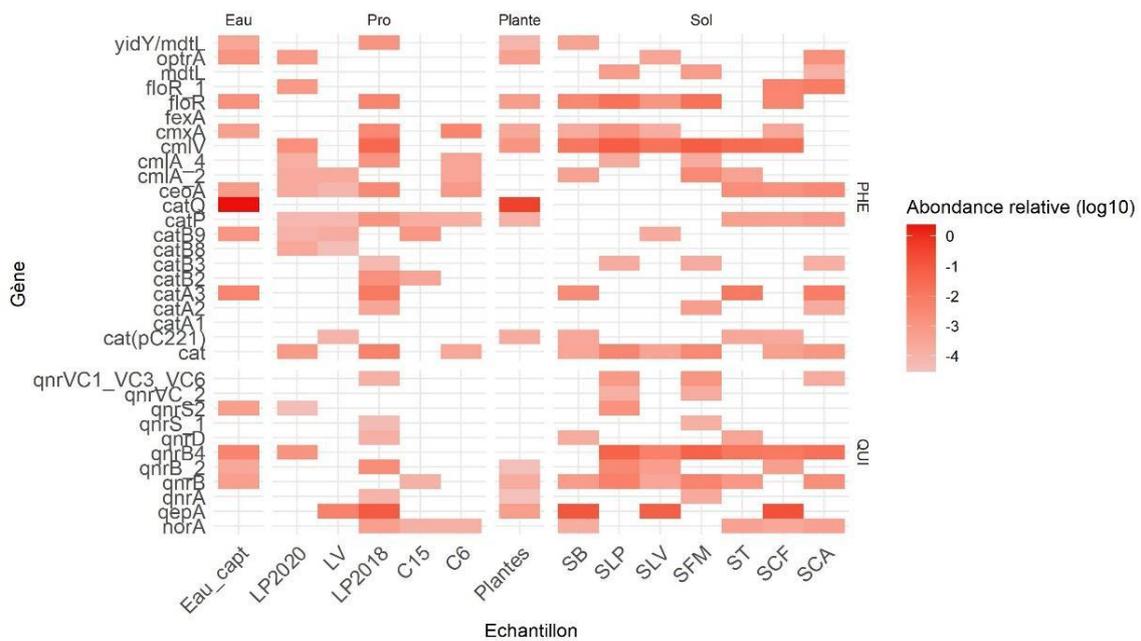


Figure 22 : Abondance relative des gènes ciblés ( $\log_{10}$ ) pour les familles d'antibiotiques phénicolés (PHE) et quinolones (QUI), par matrice et par échantillon.

Dans le but d'explorer davantage la distribution de l'abondance relative des différents gènes de résistance aux antibiotiques dans nos échantillons, des graphiques catégorisés par matrice ont été réalisés. Le *violin plot* de la Figure 23 permet notamment de suggérer la présence d'une abondance relative en gènes de résistance aux antibiotiques moyenne supérieure dans les matrices Eau et Sol à celles pour les Pro, elle-même supérieure à celle dans la Plante.

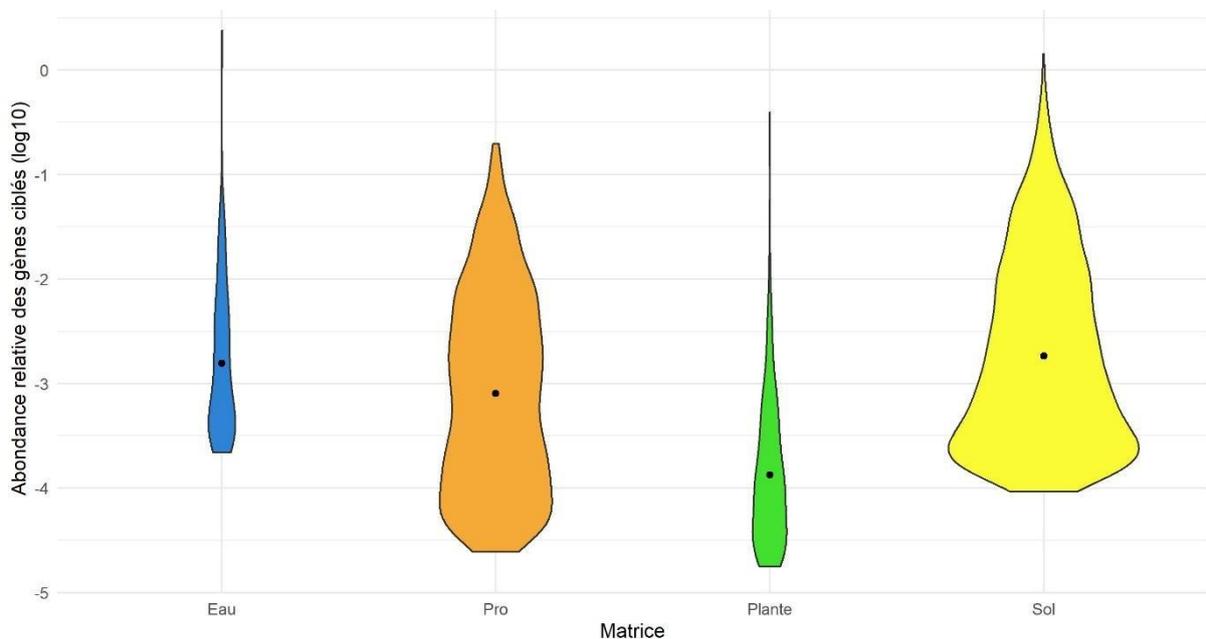


Figure 23 : Abondance relative des gènes ciblés ( $\log_{10}$ ) pour chaque matrice. L'aire de chaque violon est proportionnelle au nombre de gènes par matrice.

Dans le but de déterminer si la matrice a un effet statistique sur la moyenne des abondances relatives des gènes de résistance, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été effectué avec comme seuil d'erreur 5%. Le résultat significatif de ce dernier (p-value :  $P < 2,2^{-16}$ ) indique un effet significatif de la matrice sur la moyenne des abondances relatives (log10).

Le test de Conover-Iman qui est un test de rangs sur les médianes, a ensuite été réalisé afin de comparer les matrices deux à deux. La méthode de Holm a été retenue dans ce test pour corriger la hausse du risque  $\alpha$  (risque de rejeter à tort  $H_0$ , pas de différence entre la moyenne des 2 matrices, alors qu'elle est vraie), dû à la multiplicité des tests réalisés. Les résultats obtenus (Tableau 3) indiquent que l'abondance relative des gènes de résistance n'est pas significativement différente entre les matrices Eau et Sol (p-value :  $P > 0,025$ ), à l'inverse de toutes les autres paires comparées (p-value :  $P < 0,025$ ).

Tableau 3 : Résultats du test de Conover-Iman pour les comparaisons deux à deux d'abondance relative des gènes de résistance entre matrices.

|           |          | Comparison of x by group<br>(Benjamini-Hochberg) |                      |                      |
|-----------|----------|--|----------------------|----------------------|
| Col Mean- | Row Mean | Eau  | Plante               | Pro                  |
|           | Plante   | 12.58795<br>0.0000*                              |                      |                      |
|           | Pro      | 4.678007<br>0.0000*                              | -12.47819<br>0.0000* |                      |
|           | sol      | -0.032565<br>0.4870                              | -18.16932<br>0.0000* | -10.18222<br>0.0000* |

alpha = 0.05  
Reject Ho if p <= alpha/2

Finalement, des *barplots* représentant les abondances relatives des gènes de résistance pour chaque famille d'antibiotiques et matrice échantillonnée ont été réalisés (Figure 24). Cette représentation permet d'identifier une abondance relative accrue des gènes de résistance affiliés à la famille des pénicols (PHE) dans les matrices Eau et Plante. La matrice Pro renferme principalement des gènes des familles d'antibiotiques aminoglycoside (AMI), macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) et tétracycline (TET). Un pattern similaire est observé dans la matrice Sol avec une abondance plus grande pour les gènes de résistance associés aux familles d'antibiotiques AMI et MLSB.

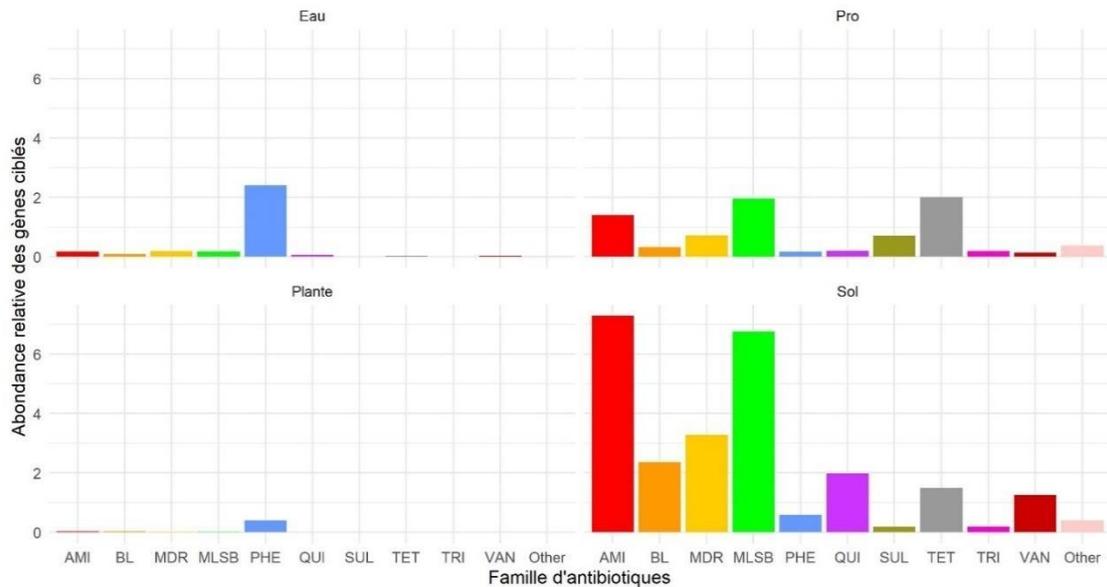


Figure 24 : Abondance relative des gènes ciblés pour chaque famille d'antibiotiques par matrice.

### 3.1.4. Analyse en composantes principales

Après avoir représenté la présence et l'abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques détectés en fonction de différentes catégories (échantillon, matrice, site, famille d'antibiotiques, etc.), nous avons cherché à étudier la structuration des données sans *a priori* en réalisant une analyse en composantes principales (ACP) sur les données d'abondance relative. La première étape d'une ACP consiste à synthétiser l'information du jeu de données analysé en un nombre de nouvelles variables appelées composantes principales. Dans notre cas de figure, les deux premières dimensions contribuent à expliquer plus de 90% de la variance totale mesurée entre les échantillons (Figure 25). Ainsi, seulement les dimensions 1 et 2 sont sélectionnées pour la suite de l'ACP.

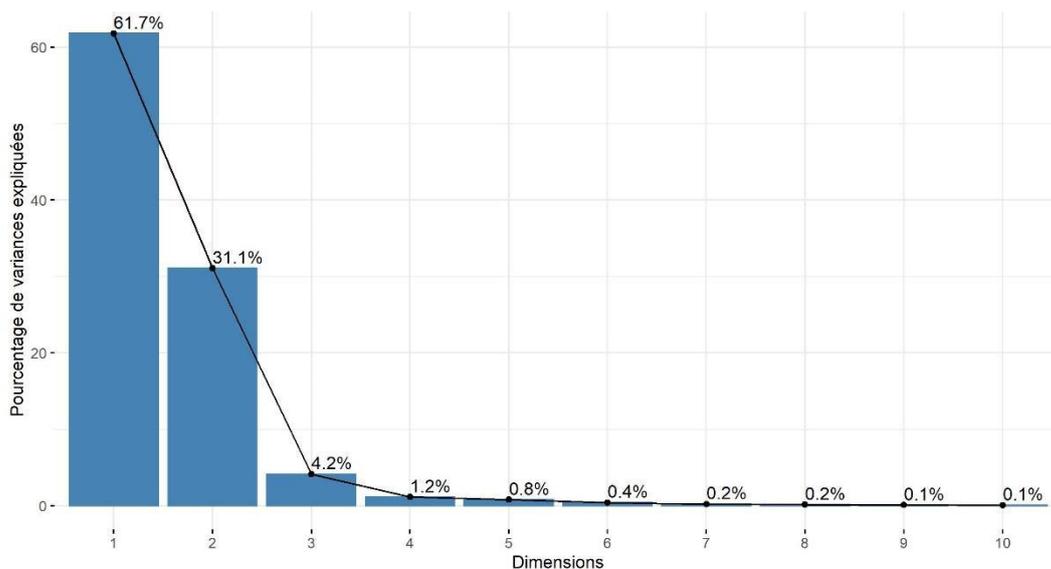


Figure 25 : Pourcentage explicatif de la variance entre échantillons pour chaque dimension de l'ACP.

La projection des différents échantillons sur les deux axes principaux de l'ACP est présentée en Figure 26. L'échantillon du site de Petite-Ile se retrouve isolé alors que les échantillons des deux autres sites apparaissent mélangés. Une structuration plus nette associée à la matrice d'origine (Figure 27) a été mise en évidence, avec les échantillons issus des différentes matrices se différenciant au sein de groupes distincts. Finalement, l'analyse ACP permet également d'identifier les variables (ici les gènes) qui contribuent le plus à la structuration mise en évidence. Ainsi, le gène AY412 (aadA7) impliqué dans la résistance aux aminoglycosides (AMI), contribue fortement à expliquer la variance entre échantillons pour la dimension 1 et donc au regroupement des échantillons S5 et S7 (SLP et SFM) qui possèdent ce gène en plus grande abondance que les autres. D'autre part, le gène codé AY562 (catQ), impliqué dans la résistance à la famille des phénicolés (PHE) contribue le plus à expliquer la variance entre échantillons pour la dimension 2. Ce gène, plus abondant relativement dans l'échantillon 16 (eau du bassin versant de Petite-Ile) contribue fortement à sa position isolée sur la dimension 2.

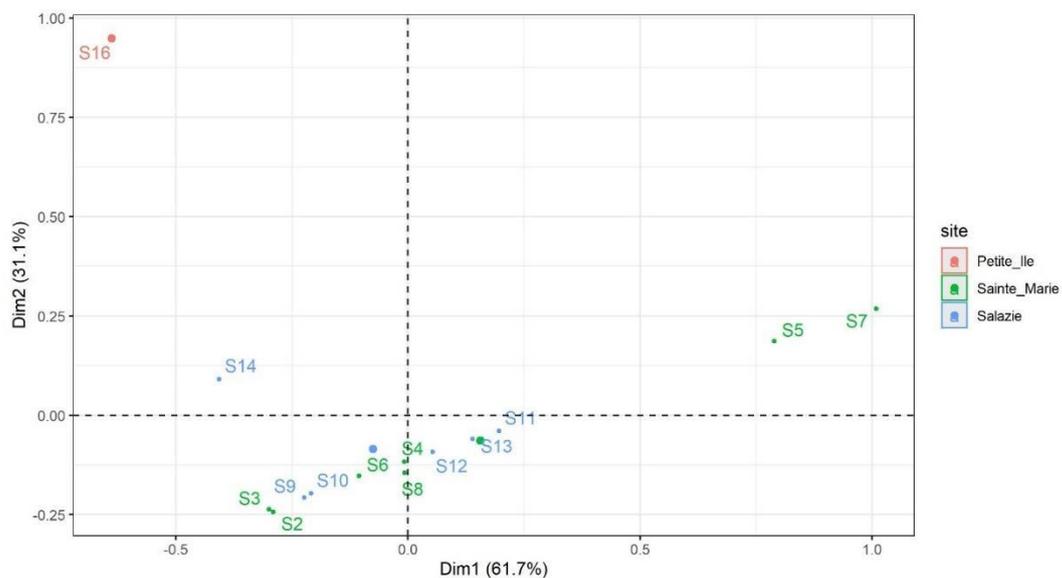


Figure 26: ACP des échantillons colorés par site pour les dimensions 1 et 2.

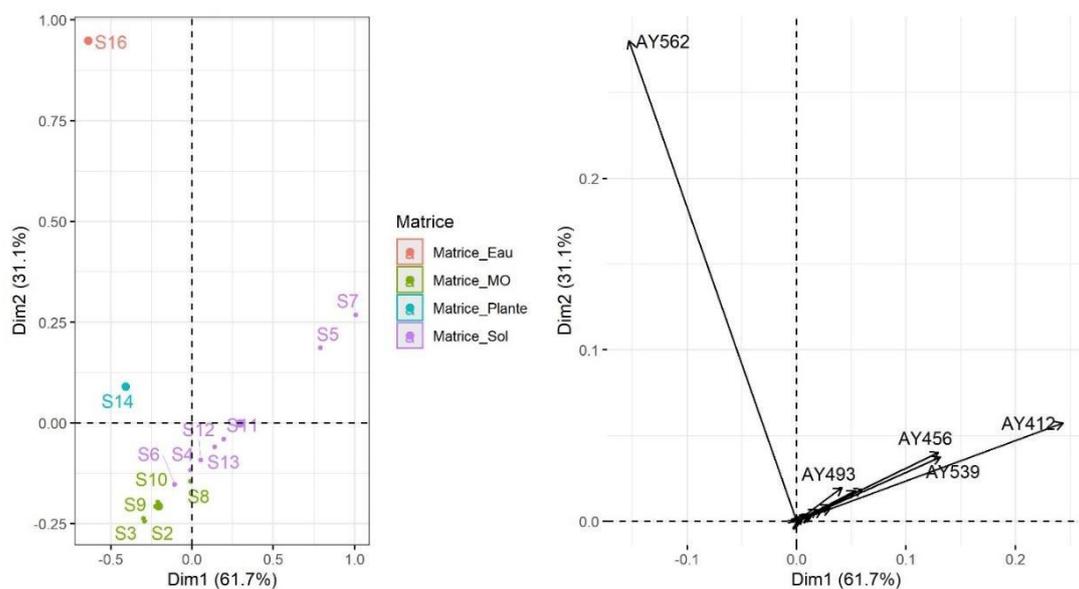


Figure 27: ACP des échantillons colorés par matrice (à gauche) et contribution majoritaire des gènes (à droite) pour les dimensions 1 et 2.

### 3.2. Analyse des résidus d'antibiotiques

L'analyse des résidus d'antibiotiques a été réalisée sur les 16 échantillons pour 52 antibiotiques de 8 différentes familles. Parmi ces derniers, seulement 7 échantillons ont au moins un résidu détecté, avec une valeur représentée en gras dans le Tableau 4 ; dans le cas contraire la valeur limite de quantification de la concentration est affichée. Ainsi, sur les 52 résidus d'antibiotiques recherchés, seulement 8 ont été révélés, appartenant à 4 familles d'antibiotiques différentes. Ces éléments ont été retrouvés majoritairement dans les Pro, 5 sur les 7 échantillons positifs, et dans 2 sols.

Tout d'abord, la dicloxacilline (famille des Béta-lactamines), utilisée en médecine humaine pour traiter les infections de la peau et dentaires a été détectée avec une concentration de 15,4 ng.g<sup>-1</sup> dans la litière de volaille. Ensuite, l'azithromycine (famille des macrolides-lincosamides-streptogramins B), employé en médecine humaine pour traiter de nombreux types d'infections affectant la gorge, les bronches, les appareils génitaux, etc., a été retrouvé dans les boues de station d'épuration avec la norfloxacine, et l'ofloxacine (famille des quinolones) prescrits en médecine humaine pour soigner respectivement des infections oculaires, urinaires et digestives. La tiamuline (MLSB), utilisé en médecine vétérinaire, en particulier chez les porcs et les volailles pour les maladies respiratoires, a été retrouvé dans les lisiers de porc de 2018 et 2020, et également dans le compost de 6 mois. L'acide oxolinique (QUI) est prescrit en médecine humaine pour traiter les infections aiguës et chroniques des voies urinaires. Il est aussi employé en médecine vétérinaire dans les élevages porcins et avicoles sous prescription. Des résidus de cet antibiotique ont été mis en évidence dans les lisiers de porcs de 2018 et 2020. Pour la famille des sulfonamides, le sulfamerazine, utilisé en médecine vétérinaire, a été détecté dans le sol témoin et dans le sol ayant reçu un compost en avril du site de Salazie. Et enfin, pour la même famille, le sulfamethizole prescrit en médecine vétérinaire pour les chats et les chiens a été quantifié dans le sol ayant reçu un compost en avril du site de Salazie.

*Tableau 4 : Concentration des antibiotiques (ng.g<sup>-1</sup>) seulement pour les échantillons présentant des valeurs supérieures à la limite de quantification.*

| Famille d'antibiotiques | Antibiotique mesuré (ng.g <sup>-1</sup> ) | Boue        | LP2020      | LV          | LP2018      | C6          | ST          | SCA         |
|-------------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| BL                      | Dicloxacilline                            | < 1,96      | < 1,96      | <b>15,4</b> | < 1,96      | < 1,96      | < 1,96      | < 1,96      |
| MLSB                    | Azithromycine                             | <b>91,7</b> | < 6,5       | < 6,5       | < 6,5       | < 6,5       | < 6,5       | < 6,5       |
| MLSB                    | Tiamuline                                 | < 3,3       | <b>9,45</b> | < 3,3       | <b>23,5</b> | <b>26,4</b> | < 3,3       | < 3,3       |
| QUI                     | Norfloxacine                              | <b>162</b>  | < 5,1       | < 5,1       | < 5,1       | < 5,1       | < 5,1       | < 5,1       |
| QUI                     | Ofloxacine                                | <b>1601</b> | < 0,9       | < 0,9       | < 0,9       | < 0,9       | < 0,9       | < 0,9       |
| QUI                     | Acide oxolinique                          | < 5,8       | <b>609</b>  | < 5,8       | <b>1257</b> | < 5,8       | < 5,8       | < 5,8       |
| SUL                     | Sulfamerazine                             | < 2,8       | < 2,8       | < 2,8       | < 2,8       | < 2,8       | <b>47,8</b> | <b>80,1</b> |
| SUL                     | Sulfamethizole                            | < 3,0       | < 3,0       | < 3,0       | < 3,0       | < 3,0       | < 3,0       | <b>35,7</b> |

### 3.3. Analyse des ETMs

Les résultats des dosages des ETMs totaux n'ont malheureusement pas pu être délivrés à temps pour être analysés dans le cadre de ce stage. Seuls les dosages du cuivre et zinc disponibles ont pu être réalisés pour les échantillons de 1 à 13 (Pro et Sol). Pour ces deux ETMs, les concentrations sont bien supérieures dans les Pro que dans les sols (Tableau 5), avec des valeurs maximales pour les deux lisiers de porc (LP2020 et LP2018).

Tableau 5 : Concentration en zinc et cuivre disponibles pour les échantillons de 1 à 13.

| Numéro d'échantillon | Matrice | Code   | Zn dispo (mg.kg <sup>-1</sup> MS) | Cu dispo (mg.kg <sup>-1</sup> MS) |
|----------------------|---------|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| S1                   | Pro     | Boue   | 175,5                             | 68,15                             |
| S2                   | Pro     | LP2020 | 1176,82                           | 150,34                            |
| S3                   | Pro     | LV     | 273,19                            | 35,21                             |
| S4                   | Sol     | SB     | 4,11                              | 2,61                              |
| S5                   | Sol     | SLP    | 5,13                              | 2,8                               |
| S6                   | Sol     | SLV    | 1,83                              | 1,71                              |
| S7                   | Sol     | SFM    | 4,96                              | 3,02                              |
| S8                   | Pro     | LP2018 | 795,89                            | 160,05                            |
| S9                   | Pro     | C15    | 421,7                             | 34,35                             |
| S10                  | Pro     | C6     | 414,16                            | 27,24                             |
| S11                  | Sol     | ST     | 2,91                              | 1,68                              |
| S12                  | Sol     | SCF    | 6,88                              | 1,34                              |
| S13                  | Sol     | SCA    | 8,42                              | 2,07                              |

Les concentrations obtenues en mg.kg<sup>-1</sup> de matière sèche pour le zinc et le cuivre disponibles sont corrélées positivement (voir modèle linéaire de l'Annexe 7, avec un R<sup>2</sup> ajusté de 0,92, soit 92% de variance expliquée). Ainsi, lorsque la concentration de cuivre disponible est élevée, la concentration de zinc disponible l'est aussi.

### 3.4. Analyses combinées

Après avoir analysé séparément les résultats des gènes de résistance aux antibiotiques, des résidus d'antibiotiques et des ETMs, nous avons tenté d'explorer certains liens entre ces différentes données.

#### 3.4.1. Analyse combinée entre les résidus d'antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques

Au vu du nombre réduit de résidus détectés pour seulement une partie des échantillons, il n'a pas été possible de réaliser les tests statistiques génériques de corrélation. Cependant, pour chaque échantillon où un résidu a été détecté (Tableau 4), le nombre et l'abondance des gènes de résistance associés à sa famille (Figure 19 et Annexe 5) ont été examinés afin de voir si un lien paraît émerger.

Des résidus de dicloxacilline, de la famille des Béta-lactamines ont été détectés dans l'échantillon de litière de volaille (LV) alors que ce dernier présente les plus faibles valeurs, en nombre et abondance, de gènes détectés pour cette famille d'antibiotiques. Dans les échantillons LP2020, LP2018 et C6, des résidus de tiamuline (famille des MLSB) ont été détectés. Ces trois échantillons sont également ceux avec le plus grand nombre de gènes détectés pour cette famille d'antibiotiques. Néanmoins, en termes d'abondance relative, ils ne correspondent pas aux échantillons avec la valeur la plus élevée. De plus, dans les lisiers, des résidus d'acide oxolinique, famille des quinolones, sont quantifiés mais leur abondance relative pour cette famille ne diffère pas des autres échantillons. De même, pour les sols ST et SCA ayant des résidus de sulfonamides, ils n'ont pas une abondance relative distinguable. Pour l'échantillon de boue, les gènes de résistance associés à la famille MLSB sont les plus nombreux pour cet échantillon et des résidus d'un antibiotique de la même famille (azithromycine) ont été détectés. Des résidus d'antibiotiques de la famille des quinolones sont présents mais aucun gène associé à cette famille n'a été trouvé (Tableau 4 et Figure 17). Néanmoins, cet échantillon présente une concentration inférieure au minimum requis d'analyse, ce qui pourrait entraîner un biais aux observations. En conclusion, aucun lien évident ne semble se dessiner avec le nombre ou l'abondance relative des gènes de résistance associés aux résidus trouvés.

### **3.4.2. Analyse combinée entre les ETMs et les gènes de résistance aux antibiotiques**

Les concentrations de cuivre et zinc disponibles mesurés dans les différents échantillons ont été comparées à l'abondance relative de certains gènes de résistance associés à la famille MDR (Multi-drug resistance) connus pour être impliqués dans la résistance à ces deux ETMs (copA, pcoA et tcrB pour le cuivre ; czcA pour le zinc). Aucune corrélation significative ( $p$ -value :  $P > 0.05$ ) n'a pu être mesurée entre les concentrations en ETMs disponibles et les gènes de résistance associés testés (Annexe 8 et Annexe 9).

## 4. Discussion

A La Réunion, les quelques études scientifiques précédemment réalisées sur la thématique de l'antibiorésistance ont été menées à l'échelle du compartiment humain, plus particulièrement en milieu hospitalier (Cabanès et al., 2012; Miltgen et al., 2020) ou animal, en santé vétérinaire (Gay et al., 2017; Josse & Cardinale, 2021b). La seule étude de type « One-Health » intégrant des données humaines, animales et environnementales (via les eaux usées) a révélé une absence de lien majeur entre ces différents compartiments (Miltgen et al., 2022). Notre travail avait pour vocation d'étudier l'influence de certaines pratiques agricoles, une autre composante du compartiment environnemental, comme un lien potentiel entre santés humaines et animales (Thanner et al., 2016). Pour cela, quatre types de matrices (eau, sol, Pro et plante), à l'interface avec les trois compartiments du One Health, ont été prélevés dans plusieurs localisations de l'île et analysés génétiquement et chimiquement, conférant à notre étude un caractère exploratoire et novateur. Plus précisément, cette dernière avait pour but (i) d'évaluer la présence de gènes de résistance, résidus d'antibiotiques, ETMs dans les échantillons récoltés (ii) de déterminer l'existence de liens entre ces différentes mesures et (iii) de tenter d'identifier de potentiels évènements de transmission entre les différentes matrices étudiées.

### 4.1. Quels sont les gènes de résistance, antibiotiques et ETMs détectés dans les différentes matrices étudiées ?

La présence d'un nombre important de gènes de résistance a été identifiée au sein de toutes les différentes matrices (Pro, sol, plante et eau) échantillonnées dans les agroécosystèmes réunionnais. En effet, sur les 349 gènes recherchés, entre 138 (39%) et 220 (63%) ont été détectés dans les différents échantillons analysés, avec un total de 110 gènes (31%) présents dans l'ensemble des 14 échantillons (Figure 17). La diversité des gènes de résistance identifiés couvre l'ensemble des familles d'antibiotiques recherchées (Annexe 6), incluant certaines molécules d'importance critique en santé humaine comme les macrolides (gènes *mphA* & *erm*), céphalosporines (*bla*-TEM and *bla*CTX-M), aminoglycosides (gènes *aph* & *aad* genes), tétracycline (gènes *tet*) ou encore la vancomycine (gène *vanA*). A titre de comparaison, deux études réalisées sur des matrices similaires en Finlande (Muurinen et al., 2017) et en Chine (Zhu et al., 2013) ont respectivement détecté jusqu'à 130/363 (35%) et 149/244 (61%) de gènes de résistance aux antibiotiques en utilisant la même méthode d'analyse moléculaire.

Malgré un nombre important de gènes de résistance aux antibiotiques détectés, ces derniers ont été caractérisés par une abondance relative globalement assez faible, mais hétérogène selon les matrices considérées (Figure 24). Pour les Pro, l'abondance relative la plus élevée a été observée pour les familles d'antibiotiques des tétracyclines, macrolides-lincosamides-streptogramins B et aminoglycosides. Cette observation apparaît pertinente puisque ces familles d'antibiotiques sont connus pour être parmi les plus utilisés en élevage pour soigner les animaux en France et à La Réunion (Grave et al., 2010; Josse & Cardinale, 2021a). Les échantillons de sols ont montré un profil globalement similaire aux Pro, avec notamment une abondance relative élevée des gènes MDR associés à des résistances à plusieurs familles d'antibiotiques. Cette observation apparaît aussi cohérente avec plusieurs études ayant décrites une forte prévalence de gènes et bactéries MDR dans les sols (Walsh & Duffy, 2013).

Les matrices eau et plante ont été caractérisées par des gènes de résistance à la famille des phénicolés se distinguant en termes d'abondance relative. Les médicaments de cette famille ont un spectre d'action très large mais ils peuvent entraîner des effets secondaires sévères comme provoquer des insuffisances médullaires et aussi de nombreuses souches de résistantes existent. C'est pourquoi, aujourd'hui dans l'Union Européenne, ces antibiotiques ne sont utilisés qu'en cas de maladies graves et souvent en deuxième intention. Les phénicolés sont donc actuellement très rarement utilisés en santé animale et en santé humaine. De façon surprenante, plusieurs gènes de résistance associés à cette famille, dont notamment le gène *catQ* (AY562) ont été détectés en forte abondance dans l'eau de captage (site de Petite-Ile) et dans le mélange de plantes cultivées sur le site de Salazie. La raison de la présence de ces gènes reste inconnue mais représente un risque potentiel de transmission à l'Homme via la consommation d'eau ou de végétaux. De futures investigations devront être menées pour tenter de mieux comprendre les causes et les risques associés à la présence de ces gènes de résistance aux antibiotiques dans les agroécosystèmes réunionnais.

Pour chaque famille d'antibiotiques, les gènes de résistance ayant été ciblés dans le cadre de ce travail ont précédemment été décrits dans la littérature associée à un ou plusieurs compartiments, description ayant permis à notre prestataire Resistomap de proposer leur détection par puce qPCR. Sur le territoire réunionnais, une étude de référence a été menée dans le but d'étudier par séquençage complet de 410 souches, la prévalence et la circulation des gènes de résistance chez les bactéries *Escherichia coli* provenant des Hommes, des animaux d'élevage et des eaux usées entre 2015 et 2018 (Miltgen et al., 2022). Nos résultats apparaissent en accord avec cette précédente étude puisque la totalité des gènes détectés en forte prévalence par cette précédente étude ont également été observés dans notre travail. Dans la majorité des cas, nous retrouvons même des pourcentages de présence bien supérieurs à ceux observés précédemment. Par exemple, le gène *blaCTX-M-1*, de la famille des Béta-lactamines, présent dans 75% des échantillons animaux et 10% des eaux usées, a été détecté dans tous les échantillons. Certains autres gènes de résistance absents des échantillons animaux chez Miltgen et al. (2022) ont été fortement détectés dans nos échantillons, comme les gènes *blaCMY* et *blaNDM* (respectivement dans 78% et 92% de nos échantillons). Des observations similaires ont également été constatées pour certains autres gènes de la famille des aminoglycosides (*aad*, *aph*), quinolones (*qnr*) et sulfamides (*sul*).

L'ensemble des échantillons a également été analysé par des méthodes chimiques dans le but de détecter d'éventuels résidus d'antibiotiques. Seulement 8 molécules, parmi les 52 analysées, ont été détectées dans 7 des 16 matrices échantillonnées (5 Pro et 2 sols). Ainsi, aucun résidu n'a été détecté dans les échantillons de plantes et d'eau. Trois résidus d'antibiotiques, employés en santé humaine, ont été quantifiés avec des concentrations élevées dans la boue de station d'épuration après traitement (Tableau 4). Ce résultat semble indiquer que l'emploi des antibiotiques par l'Homme entraîne la présence de résidus médicamenteux dans les déjections humaines qui peuvent persister même après traitement comme précédemment observé avec des molécules de norfloxacine et d'ofloxacine sur le même site expérimental de Sainte-Marie (Aabbar, 2020). De façon intéressante, nos résultats indiquent que ce processus n'est pas exclusif à la santé humaine puisque d'autres résidus (tiamuline, acide oxolinique et dicloxaciline), utilisés pour soigner les animaux, ont été détectés dans les deux lisiers de porc et dans la litière de volaille épandus sur ce même site ainsi que dans un échantillon de compost prélevé sur le site de Salazie. Cette observation illustre le fait que l'emploi d'antibiotiques en médecine vétérinaire ou animale peut conduire à la présence de résidus d'antibiotiques dans les déjections qui persistent dans les Pro, même après traitements thermophiles (chaulage, compostage) (Bourdat-Deschamps et al., 2017).

La question du devenir et des risques associés à la valorisation de ces effluents apparaît donc essentielle. Finalement, deux antibiotiques de la famille des sulfamides (la sulfamerazine et le sulfaméthizole) ont été détectés dans les sols échantillonnés à Salazie, incluant le sol témoin. Ce résultat suggère que la présence de ces résidus n'est pas directement associée à l'épandage du compost puisqu'aucun de ces deux résidus n'a été détecté dans le compost analysé. L'hypothèse que les résidus trouvés dans les Pro pourraient se trouver également dans les sols n'est pas démontrée dans nos échantillons. Néanmoins, le fait de trouver plus de résidus d'antibiotiques dans les Pro que dans les sols a également été démontré dans le passé sur le site de Sainte-Marie (Aabbar, 2020).

Pour les ETMs, le cuivre et le zinc disponibles ont des concentrations particulièrement élevées dans les Pro. L'usage d'oligo-éléments tels que le cuivre et le zinc dans l'alimentation animale est commun. De plus, en accord avec nos résultats, il est connu que ces éléments se retrouvent dans les déjections animales (Founou et al., 2016; Zhu et al., 2013). L'apport de Pro au sol ne semble pas avoir d'effet sur le cuivre et le zinc disponibles dans le sol de l'essai de Sainte-Marie puisque les concentrations en Cu et Zn disponibles de sols amendés (SB, SLP, SLV) ne sont pas clairement supérieures à celles du sol témoin (SFM) n'ayant reçu qu'une fertilisation minérale (Tableau 5). En revanche, sur le site de Salazie, l'apport de compost semble avoir généré une augmentation de la concentration en Cu et Zn disponibles dans les sols amendés (SCF et SCA) relativement au sol non amendé (ST).

#### **4.2. Existe-t-il un lien direct entre la présence de résidus d'antibiotiques ou d'ETMs et celle des gènes d'antibiorésistance ?**

Dans la littérature, de nombreux auteurs suggèrent une influence de la présence de résidus d'antibiotiques comme l'une des principales causes de l'apparition et de la diffusion des gènes de résistance (Founou et al., 2016; Rodriguez-Mozaz et al., 2015). Dans une étude réalisée sur des sols et Pro échantillonnés dans des fermes de porc en Chine, les auteurs ont mis en évidence une forte corrélation entre les concentrations d'antibiotiques détectés et l'abondance des gènes de résistance associés (Zhu et al., 2013). Ce phénomène est plutôt logique puisque la présence d'antibiotiques dans un environnement, peut, en fonction de sa concentration, constituer une pression de sélection majeure qui va pénaliser le développement des bactéries sensibles au détriment de celles porteuses de gènes de résistance. Cependant, en réalisant des observations croisées de nos résultats, aucun lien évident entre la présence de résidus d'antibiotiques et l'abondance en gènes de résistance associée n'a semblé apparaître. Une absence similaire de relation directe entre l'abondance de résidus et de gènes a précédemment été décrite dans une étude européenne réalisée sur des échantillons d'eau usée (Pärnänen et al., 2019). L'existence d'un tel patron pourrait suggérer que la majorité des gènes de résistances mesurés dans nos échantillons ont émergé dans un environnement (ou une matrice) différent de celui dans lequel ils ont été détectés.

D'autres corrélations, cette fois-ci entre des concentrations en ETMs comme le cuivre et le zinc et l'abondance en gènes de résistance ont été fréquemment décrites et discutées dans la littérature (Baker-Austin et al., 2006; Poole, 2017). Un des mécanismes proposés pour expliquer une telle corrélation concerne l'existence chez les bactéries de mécanismes communs comme des pompes à efflux permettant de rejeter dans le milieu extracellulaire aussi bien les ETMs que les molécules d'antibiotiques. Aucune corrélation significative entre les concentrations en cuivre et zinc disponibles et les gènes de résistance directement associés à ces ETMs n'a été trouvée dans le cadre de cette étude.

Cependant, d'autres gènes appartenant à la catégorie MDR (Multi-drug resistance), contenant notamment certains gènes codant pour des pompes à efflux, pourraient être impliqués dans la résistance conjointe aux antibiotiques et aux ETMs. Ainsi, il pourrait être intéressant de tester sans *a priori* l'existence de corrélations entre l'abondance de tous les gènes de la catégorie des Multi-drug resistance et les concentrations mesurées en ETMs. Ce type d'approche sans *a priori* est fréquemment considéré en sciences pour tenter de mettre en évidence des corrélations entre un nombre élevé de variables. Dans ce contexte, il est important de réaliser des corrections statistiques spécifiques aux comparaisons multiples et/ou multicollinéarités (Noble, 2009).

### **4.3. Peut-on identifier des événements de transmission de gènes de résistance entre les matrices étudiées ?**

Les différents échantillons analysés dans le cadre de cette étude ont été spécifiquement choisis pour tester certaines hypothèses et mettre en évidence de possibles liens de transmissions de gènes d'antibiorésistance entre les matrices étudiées.

Tout d'abord, l'une des hypothèses était que les Pro provenant directement des déjections des animaux contiendraient des gènes de résistance en plus grand nombre et abondance relative que les sols, comme précédemment décrit dans des études similaires réalisées en Finlande (Muurinen et al., 2017) et en Chine (Zhu et al., 2013). Une telle tendance n'a pas été clairement observée dans le cadre de cette étude, certains sols possédant plus de gènes de résistance que certains Pro aussi bien en nombre qu'en abondance relative. De plus, les différents échantillons de sols étaient « associés » à un Pro spécifique avec lequel ils avaient été fertilisés. De façon intéressante, l'abondance relative en gènes de résistance aux antibiotiques mesurée dans les sols s'est toujours montrée supérieure à celle du Pro associé, que l'échantillonnage ait été réalisé un an (site de Sainte-Marie) ou seulement quelques mois après l'épandage (site de Salazie).

Ensuite, pour le site de Sainte-Marie et de Salazie, deux sols témoins (SFM et ST) ont été intégrés dans l'étude avec l'attendu que, n'ayant reçu aucun Pro, ces derniers devraient être appauvris en gènes de résistance en comparaison aux sols fertilisés, comme précédemment observé en Chine et en Finlande (Muurinen et al., 2017; Zhu et al., 2013). Les résultats de notre étude apparaissent ici aussi en contradiction avec cet attendu puisque les sols témoins présentent une quantité et une abondance relative en gènes de résistance comparable, voire supérieure aux sols traités. Une telle observation pourrait s'expliquer par un phénomène de disparition relativement rapide des gènes de résistance aux antibiotiques apportés par amendements (Heuer & Smalla, 2007; Muurinen et al., 2017). Nos résultats apparaissent en accord avec ce phénomène, puisque sur le site de Salazie, la quantité et l'abondance de gènes de résistance s'est montrée légèrement plus grande en nombre et en abondance relative pour le sol amendé en avril que pour celui amendé en février. Une hypothèse alternative, non exclusive pourrait être liée aux conditions climatiques puisque par période de fortes pluies et/ou cyclones, des phénomènes de saturation des sols en eau et de ruissellement vont potentiellement causer un mélange des Pro, sols et/ou des gènes de résistance entre parcelles voisines.

Un autre lien entre échantillons concerne les deux prélèvements de composts (C6 et C15) datant de 6 mois (fin de processus) ou 15 jours (début de processus), respectivement. Le processus de compostage étant caractérisé par plusieurs cycles de montées en chaleur, une réduction du nombre et de l'abondance des bactéries et donc des gènes de résistance pourrait être attendue comme précédemment décrit dans la littérature (Gou et al., 2018; Goulas et al., 2020). Cependant, aucune différence en nombre ou en abondance de gènes de résistance n'a permis de vérifier cette hypothèse dans le cadre de notre étude.

Malgré tous ces liens attendus entre échantillons, la réalisation de l'analyse en composantes principales (ACP) suggère la matrice (eau, sol, Pro, plante) comme le facteur principal expliquant la structuration des différents échantillons sur la base de la variance mesurée entre l'ensemble des abondances relatives des gènes de résistance (Figure 27). Ainsi, les échantillons forment des groupes caractérisés par leur matrice d'origine, plutôt que par les pratiques agricoles qui les lient entre eux. Ce résultat suggère que les pratiques agricoles ne sont probablement pas le facteur principal structurant la distribution des gènes d'antibiorésistance dans les agroécosystèmes réunionnais. De futures investigations seront nécessaires pour tenter d'élucider la présence et la nature d'évènements de transmission des gènes de résistance aux antibiotiques entre les différents compartiments du One-Health à La Réunion.

#### **4.4. Limites de l'étude et perspectives**

Une première limite inhérente au caractère exploratoire de cette étude concerne la taille de l'échantillonnage et la réalisation de prélèvements uniques. L'inclusion de répétitions pourrait permettre de confirmer les résultats obtenus. De plus, d'autres prélèvements réalisés à plusieurs moments de l'année pourraient permettre de tester un effet de la saisonnalité. De la même façon, la réalisation de prélèvements sur plusieurs élevages/maraîchages pourrait permettre de comparer nos observations sur d'autres sites et/ou filières d'élevage.

Une seconde limite de l'étude concerne la comparaison des échantillons sur la base du nombre ou de l'abondance en gènes de résistance détectés. Bien que ces statistiques soient utiles pour décrire et comparer plusieurs échantillons entre eux, ils ne sont pas totalement adaptés à la mise en évidence de liens de transmission entre échantillons. En effet, deux échantillons peuvent être caractérisés par un nombre et une abondance relative similaire, tout en étant composés de gènes différents ou présents en fréquences variables. Pour pallier cette limite, des différences de composition génétique entre échantillons ont été proposées dans le but de comparer leurs abondances relatives relativement à un témoin avec la formule :

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{échantillon}) - \Delta Ct(\text{témoin})$  (Zhu et al., 2013). Dans cette formule,  $\Delta Ct$  correspond à l'abondance relative de chacun des gènes et l'échantillon témoin est souvent le sol non fertilisé. Une telle statistique, appelée « enrichissement en gènes » pourrait se montrer pertinente pour tenter d'identifier plus précisément des liens entre échantillons issus de différentes pratiques agricoles sur notre jeu de données.

La méthode génétique de détection des gènes basée sur la qPCR considérée s'est montrée adaptée au caractère exploratoire de ce travail. En effet, un nombre important de gènes ont pu être ciblés sans avoir à isoler certaines espèces bactériennes au laboratoire. Cependant, cette méthode nous a permis d'estimer une abondance que relativement à un gène de référence, ce qui dans le cas de variations du nombre de copies des gènes de résistance ou du gène de référence au sein des différents génomes bactériens peut représenter un biais.

En perspective, une autre méthode d'analyse moléculaire basée sur le séquençage complet de génomes bactériens pourrait s'avérer intéressante, notamment pour tester la proximité génétique existant entre les bactéries isolées dans des compartiments différents et faciliter la mise en évidence de liens de transmissions entre ces dernières (Subbiah et al., 2020). En parallèle, la mise en culture de bactéries permettrait de tester au laboratoire le phénotype de ces dernières car la présence d'un gène de résistance peut être associé à différents niveaux de résistance aux antibiotiques.

Finalement, il apparaît important de tester d'autres méthodes statistiques que l'analyse en composantes principales (ACP) utilisée dans le cadre de ce travail. Par exemple, des méthodes comme l'analyse factorielle des correspondances (AFC) ou bien l'analyse en coordonnées principales (PCoA), bien que similaire sur le principe, sont basées sur différentes manières de calculer les distances entre individus. Ainsi, il serait intéressant de comparer les résultats obtenus avec ces différentes méthodes afin de vérifier si le même regroupement entre échantillons s'opère.

Pour terminer, en plus des résidus d'antibiotiques et des ETMs, certaines études commencent à s'intéresser aux résidus médicamenteux non-antibiotiques qui pourraient avoir des impacts sur l'abondance ou la transmission des gènes d'antibiorésistance. Parmi ces médicaments, les anti-inflammatoires, connus pour être consommés en forte quantité par les Hommes mais également employés en élevage, sont de plus en plus étudiés pour leurs liens possibles avec les gènes de résistance. Il a notamment été démontré que la présence d'anti-inflammatoires facilite la propagation de la résistance aux antibiotiques par l'absorption de gènes exogènes (Wang et al., 2020). De plus, ces anti-inflammatoires, dont notamment l'ibuprofène, ont précédemment été retrouvés dans plusieurs matrices environnementales comme les eaux usées (Verlicchi et al., 2012). Au sein de site de Sainte-Marie, trois résidus d'anti-inflammatoires (fluxinine, diclofénac et ibuprofène) sont également régulièrement recherchés et la fluxinine a été trouvée dans 50% des échantillons de Pro (Aabbar, 2020). L'inclusion de tels résidus d'anti-inflammatoires semble être une perspective pertinente pour de futures études.

## Conclusion

Cette étude exploratoire a mis en lumière la présence d'un grand nombre de gènes de résistance aux antibiotiques dans différentes matrices du territoire réunionnais. Même si l'abondance relative de ces gènes reste faible, toutes les familles d'antibiotiques ciblées incluant certaines molécules d'importance critique en santé humaine ont été détectées via plusieurs gènes de résistance associés. Parmi ces gènes, la forte abondance du gène *catQ* (famille des phénicolés) dans l'eau et les plantes analysées à destination de la consommation humaine apparaît inquiétante. En effet, cette situation représente un risque de transmission de gènes de résistance à l'Homme pouvant entraîner des complications pour soigner certains patients et avoir de sérieuses conséquences pour la santé publique. Les Pro d'origine humaine et animale ont révélé contenir des résidus d'antibiotiques. Ceci confirme que l'utilisation d'antibiotiques en santé humaine et animale entraîne la présence de résidus dans les excréments et que le devenir dans l'environnement des Pro qui en résultent doit être particulièrement considéré et étudié.

Par ailleurs, les ETMs (cuivre et zinc disponibles) ont également été identifiés en forte concentration dans les Pro d'élevage. Cette constatation peut s'expliquer par l'emploi de ces ETMs en compléments alimentaires d'élevage. Le lien entre la présence de ces ETMs et l'abondance des différents gènes de résistance aux antibiotiques devra être étudié de façon plus précise. Notre étude a permis de distinguer un regroupement des variables, dans notre cas : les gènes de résistance, par matrice étudiée, malgré des origines géographiques différentes. De façon surprenante, nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un lien direct entre les pratiques agricoles considérées dans le cadre de cette étude et la distribution des gènes de résistance observée. Au contraire, la distribution des gènes de résistance semble associée à chacune des matrices étudiées, malgré des origines géographiques différentes.

Pour conclure, cette étude novatrice a permis d'identifier des situations potentiellement dangereuses pour la santé publique. Des investigations plus approfondies pour comprendre, d'une part, la présence et la transmission des gènes entre compartiments et d'autre part, les liens entre les différentes pressions de sélection existantes (résidus d'antibiotiques, ETMs) et les gènes de résistance identifiés, seront nécessaires. Ainsi, une meilleure connaissance des facteurs de distribution des gènes de résistance permettra de mieux gérer le devenir des Pro et d'améliorer les pratiques agricoles sur le territoire réunionnais. D'un point de vue plus général, il paraît aujourd'hui indispensable de repenser les pratiques d'usage des antibiotiques afin d'en garantir l'efficacité thérapeutique. Dans ce contexte, l'instauration de systèmes de surveillance comme réalisée dans le cadre de cette étude permet de documenter les résistances aux antibiotiques en circulation, de suivre leur dissémination et d'envisager des actions à mettre en place pour les contenir. Au niveau mondial, la surveillance de la résistance aux antibiotiques est encore trop peu développée et le manque de données de qualité est un frein à la mise en place de méthodes de lutttes efficaces et durables. De plus, plusieurs enquêtes de l'OMS ont montré que l'antibiorésistance reste un mécanisme biologique relativement abstrait et difficile à comprendre pour un large public qui ignore que de tels médicaments peuvent avoir des conséquences négatives lorsque utilisés de façon non appropriés. Pour combler ces lacunes, il apparaît important de mener différentes actions pédagogiques auprès des citoyens et des professionnels de la santé humaine, animale, agricole et environnementale afin de sensibiliser chacun aux risques de l'antibiorésistance.

## Références bibliographiques

- Aabbar, I.** (2020). *Devenir des contaminants traces organiques dans le sol d'un essai agronomique recevant des apports de produits résiduels organiques à La Réunion.*
- Alexander, T. W., Inglis, G. D., Yanke, L. J., Topp, E., Read, R. R., Reuter, T., & McAllister, T. A.** (2010). Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.008>
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V.** (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Barrios, R. E., Khuntia, H. K., Bartelt-Hunt, S. L., Gilley, J. E., Schmidt, A. M., Snow, D. D., & Li, X.** (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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136505>
- Bloom, B. R., & Murray, C. J. L.** (1992). Tuberculosis : Commentary on a Reemergent Killer  
Published by : American Association for the Advancement of Science Tuberculosis :  
Commentary on a Reemergent Killer. *Science | AAAS*, 257(5073), 1055–1064. <https://www.jstor.org/stable/2879832%0AJSTOR>
- Bohrer, R. E. G., Carissimi, E., Lopez, D. A. R., Wolff, D. B., Da Silva, D. M., & Prestes, O. D.** (2019). Composting of swine waste in the treatment of veterinary drug residues. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(6), 2813–2830. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6p2813>
- Bordier, M., Binot, A., Pauchard, Q., Nguyen, D. T., Trung, T. N., Fortané, N., & Goutard, F. L.** (2018). Antibiotic resistance in Vietnam : Moving towards a One Health surveillance system. *BMC Public Health*, 18(1136). <https://doi.org/10.1186/s12889-018-6022-4>
- Bourdat-Deschamps, M., Ferhi, S., Bernet, N., Feder, F., Crouzet, O., Patureau, D., Montenach, D., Moussard, G. D., Mercier, V., Benoit, P., & Houot, S.** (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>
- Bourély, C., Cazeau, Géraldine Gay, E., Haenni, Marisa Jarrige, Nathalie Jouy, E., Lupo, A., & Madec, J.-Y.** (2018). *Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales.*
- Cabanes, F., Lemant, J., Picot, S., Simac, C., Cousty, J., Jalin, L., Naze, F., Boisson, V., Cresta, M. P., André, H., Thibault, L., Tixier, F., Winer, A., Antok, E., & Michault, A.** (2012). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella metallo-beta-lactamase* (NDM-1) producers on reunion island. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3812. <https://doi.org/10.1128/JCM.01029-12>
- Charbonnier, G., & Laveissière, G.** (2021). *Antibiotiques et bactéries : Une histoire de résistance.*
- Chalet, G., & Leung, J.** (2016). La culture des légumes : chou , carotte , salade , tomate. *Agreste La Réunion, N° 100.*
- CIRAD.** (2022). *Mission et stratégie | Cirad.* <https://www.cirad.fr/nous-connaître/mission-et-strategie>

- Comité scientifique d'Agropolis international.** (2019). Santé globale. Homme, animal, plantes, environnement : pour des approches intégrées de la santé. *Les Dossiers d'Agropolis International*.  
[https://rhizotest.cirad.fr/content/download/4151/31065/version/2/file/Les+dossiers+d'Agropolis\\_Agronomie.pdf%0Ahttp://www.americanbanker.com/issues/179\\_124/which-city-is-the-next-big-fintech-hub-new-york-stakes-its-claim-1068345-1.html%5Cnhttp://www.ncbi](https://rhizotest.cirad.fr/content/download/4151/31065/version/2/file/Les+dossiers+d'Agropolis_Agronomie.pdf%0Ahttp://www.americanbanker.com/issues/179_124/which-city-is-the-next-big-fintech-hub-new-york-stakes-its-claim-1068345-1.html%5Cnhttp://www.ncbi).
- D'costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D.** (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461.  
<https://doi.org/10.1038/nature10388>
- De Been, M., Lanza, V. \* F., De Toro, M., Scharringa, J., Dohmen, W., Du, Y., Hu, J., Lei, Y., Li, N., Tooming-Klunderud, A., Heederik, D. J. J., Fluit, A. C., Bonten, M. J. M., Willems, R. J. L., De La Cruz, F., & Van Schaik, W.** (2014). Dissemination of Cephalosporin Resistance Genes between Escherichia coli Strains from Farm Animals and Humans by Specific Plasmid Lineages. *PLOS Genetics*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004776>
- Département Systèmes biologiques du CIRAD.** (2022). *Il est plus urgent que jamais d'adopter les approches « One Health »*. <https://www.cirad.fr/espace-presse/communiqués-de-presse/2022/conseil-scientifique-contribution-une-seule-santé?fbclid=IwAR0J9xzaxWCZ-51w7bFvov82CQfOiCESd5eE5RdFlmrAM-IRJtDhioYtrNQ>
- Desmurs, M.** (2021). *Contribution de la télédétection à l'étude de la pollution de l'eau liée aux pratiques agricoles à l'échelle d'un bassin versant à l'île de La Réunion*.
- Dorado-García, A., Mevius, D. J., H Jacobs, J. J., Van Geijlswijk, I. M., Mouton, J. W., Wagenaar, J. A., & Heederik, D. J.** (2016). Quantitative assessment of antimicrobial resistance in livestock during the course of a nationwide antimicrobial use reduction in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 3607 – 3619. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw308>
- Dorado-García, A., Smid, J. H., Van Pelt, W., Bonten, M. J. M., Fluit, A. C., Van Den Bunt, G., Wagenaar, J. A., Hordijk, J., Dierikx, C. M., Veldman, K. T., De Koeijer, A., Dohmen, W., Schmitt, H., Liakopoulos, A., Pacholewicz, E., Lam, T. J. G. M., Velthuis, A. G., Heuvelink, A., Gonggrijp, M. A., ... Heederik, D. J. J.** (2018). Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from humans, animals, food and the environment : A pooled analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 339–347. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx397>
- Durão, P., Balbontín, R., & Gordo, I.** (2018). Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, 26(8), 677–691.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005>
- Evariste, L., Mottier, A., Lagier, L., Cadarsi, S., Barret, M., Sarrieu, C., Soula, B., Mouchet, F., Flahaut, E., Pinelli, E., & Gauthier, L.** (2020). Assessment of graphene oxide ecotoxicity at several trophic levels using aquatic microcosms. *Carbon*, 156, 261–271.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.09.051>
- Evers, E. G., Pielat, A., Smid, J. H., Van Duijkeren, E., Vennemann, F. B. C., Wijnands, L. M., & Chardon, J. E.** (2017). Comparative Exposure Assessment of ESBL-Producing Escherichia coli through Meat Consumption. *PLOS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169589>
- Ezzariai, A., Barret, M., Merlina, G., Pinelli, E., & Hafidi, M.** (2017). Evaluation of the antibiotics effects on the physical and chemical parameters during the co-composting of sewage sludge with palm wastes in a bioreactor. *Waste Management*, 68, 388–397.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.036>

- Feder, F.** (2020). *SOERE PRO - Réunion*. <https://www6.inrae.fr/valor-pro/Les-sites-experimentaux/SOERE-PRO-Reunion>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F.** (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018 : GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, *144*, 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- FILAB.** (2022). *Laboratoire d'analyses par ICP (ICP-MS et ICP-AES)*. <https://filab.fr/nos-moyens-techniques/laboratoire-danalyses-par-icp-icp-ms-et-icp-aes-icp-oes/>
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y.** (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain : A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*, *7*(1881). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Frey, L., Tanunchai, B., & Glaser, B.** (2022). Antibiotics residues in pig slurry and manure and its environmental contamination potential. A meta-analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, *42*(31). <https://doi.org/10.1007/s13593-022-00762-y>
- Gay, N.** (2019). *Homme, animal, environnement : quel est le principal réservoir d'Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu dans le Sud-Ouest de l'océan Indien ?*
- Gay, N., Belmonte, O., Collard, J.-M., Halifa, M., Issack, M. I., Mindjae, S., Palmyre, P., Ibrahim, A. A., Rasamoelina, H., Flachet, L., Filleul, L., & Cardinale, E.** (2017). Review of Antibiotic Resistance in the Indian Ocean Commission : A Human and Animal Health issue. *Frontiers in Public Health*, *5*(162). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00162>
- Gay, N., Leclaire, A., Laval, M., Miltgen, G., Jégo, M., Stéphane, R., Jaubert, J., Belmonte, O., & Cardinale, E.** (2018). Risk factors of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase producing Enterobacteriaceae occurrence in farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016-2017. *Veterinary Sciences*, *5*(22). <https://doi.org/10.3390/vetsci5010022>
- Gaze, W. H., Krone, S. M., Joakim Larsson, D. G., Li, X. Z., Robinson, J. A., Simonet, P., Smalla, K., Timinouni, M., Topp, E., Wellington, E. M., Wright, G. D., & Zhu, Y. G.** (2013). Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(7). <https://doi.org/10.3201/eid1907.120871>
- Gou, M., Hu, H. W., Zhang, Y. J., Wang, J. T., Hayden, H., Tang, Y. Q., & He, J. Z.** (2018). Aerobic composting reduces antibiotic resistance genes in cattle manure and the resistome dissemination in agricultural soils. *Science of the Total Environment*, *612*, 1300–1310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.028>
- Goulas, A., Belhadi, D., Descamps, A., Andremont, A., Benoit, P., Courtois, S., Dagot, C., Grall, N., Makowski, D., Nazaret, S., Nélieu, S., Patureau, D., Petit, F., Roose-Amsaleg, C., Vittecoq, M., Livoreil, B., & Laouénan, C.** (2020). How effective are strategies to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review. *Environmental Evidence*, *9*(4). <https://doi.org/10.1186/s13750-020-0187-x>
- Goutard, F.** (2017). Antimicrobial policy interventions in food animal production in South East Asia. *The BMJ*, *358*, 36–41. <https://doi.org/10.1136/bmj.j3544>
- Graham, D. W., Bergeron, G., Bourassa, M. W., Dickson, J., Gomes, F., Howe, A., Kahn, L. H., Morley, P. S., Scott, H. M., Simjee, S., Singer, R. S., Smith, T. C., Storrs, C., & Wittum, T. E.** (2019). Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1441*, 17–30. <https://doi.org/10.1111/NYAS.14036>

- Grave, K., Torren-Edo, J., & Mackay, D.** (2010). Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*, 2037–2040. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq247>
- Haenni, M., Dagot, C., Chesneau, O., Bibbal, D., Labanowski, J., Vialette, M., Bouchard, D., Martin-Laurent, F., Calsat, L., Nazaret, S., Petit, F., Pourcher, A. M., Togola, A., Bachelot, M., Topp, E., & Hocquet, D.** (2022). Environmental contamination in a high-income country (France) by antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes: Status and possible causes. *Environment International*, *159*(107047). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107047>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L.** (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, *4*, 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Heuer, H., & Smalla, K.** (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, *9*(3), 657–666. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x>
- Hordijk, J., Mevius, D. J., Kant, A., H Bos, M. E., Graveland, H., Bosman, A. B., Hartskeerl, C. M., J Heederik, D. J., & Wagenaar, J. A.** (2013). Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves : a longitudinal approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*, 2468–2476. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt219>
- Houot, S.** (2014). *Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier.*
- Hu, X., Zhou, Q., & Luo, Y.** (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, *158*(9), 2992–2998. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.023>
- Huijbers, P. M. C., Graat, E. A. M., Haenen, A. P. J., Van Santen, M. G., Van Essen-Zandbergen, A., Mevius, D. J., Van Duijkeren, E., & Van Hoek, A. H. A. M.** (2014). Extended-spectrum and AmpC b-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*, 2669–2675. <https://doi.org/10.1093/jac/dku178>
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K.** (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, *22*(9), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>
- Josse, D., & Cardinale, É.** (2021a). *Usage d'antibiotiques et résistance bactérienne dans les élevages à la Réunion et Mayotte (projet AntibioDOM); Rapport n°1 : Usage d'antibiotiques et indicateurs d'exposition aux antibiotiques des animaux d'élevage à la Réunion et Mayotte.*
- Josse, D., & Cardinale, É.** (2021b). *Usage d'antibiotiques et résistance bactérienne dans les élevages à la Réunion et Mayotte (projet AntibioDOM); Rapport n°2 : analyse de la multi-résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes animales et étude sur la présence des EBLSE en élev.*
- Kasuga, I., Nagasawa, K., Suzuki, M., Kurisu, F., & Furumai, H.** (2022). High-Throughput Screening of Antimicrobial Resistance Genes and Their Association With Class 1 Integrons in Urban Rivers in Japan. *Frontiers in Environmental Science*, *10*(825372). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.825372>

- Kookana, R. S., Williams, M., Boxall, A. B. A., Larsson, D. G. J., Gaw, S., Choi, K., Yamamoto, H., Thatikonda, S., Zhu, Y. G., & Carriquiriborde, P.** (2014). Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: An examination of risk factors in low-, middle- and high-income countries. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0586>
- Lazarus, B., Paterson, D. L., Mollinger, J. L., & Rogers, B. A.** (2015). Do Human Extraintestinal *Escherichia coli* Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins Originate From Food-Producing Animals? A Systematic Review. *Clinical Infectious Diseases*, 60(3), 439–452. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu785>
- Légier, P.** (2003). *Procédure opérationnelle : Extraction des oligos-éléments : Méthode au D.T.P.A.*
- Levantidis, R., & Decloitre, L.** (2018). One Health, une seule santé pour l'Homme et l'animal. *AGRONEWS, Édition Réunion-Mayotte / Océan Indien*.
- Li, C., Chen, J., Wang, J., Ma, Z., Han, P., Luan, Y., & Lu, A.** (2015). Occurrence of antibiotics in soils and manures from greenhouse vegetable production bases of Beijing, China and an associated risk assessment. *Science of the Total Environment*, 521–522, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.070>
- Liguori, K., Keenum, I., Davis, B. C., Calarco, J., Milligan, E., Harwood, V. J., & Pruden, A.** (2022). Antimicrobial Resistance Monitoring of Water Environments: A Framework for Standardized Methods and Quality Control. *Environmental Science & Technology*, 56(13), 9149–9160. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08918>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopez, L., & Valette, M.** (2020). *Détermination des éléments totaux dans les sols, sédiments, roches, boues et autres solides*.
- Majlander, J., Anttila, V. J., Nurmi, W., Seppälä, A., Tiedje, J., & Muziasari, W.** (2021). Routine wastewater-based monitoring of antibiotic resistance in two Finnish hospitals: focus on carbapenem resistance genes and genes associated with bacteria causing hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 117, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.09.008>
- Marszałek, M., Kowalski, Z., & Makara, A.** (2019). The Possibility of Contamination of Water-Soil Environment as a Result of the Use of Pig Slurry. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 26(2), 313–330. <https://doi.org/10.1515/eces-2019-0022>
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., & Topp, E.** (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5701–5709. <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13>
- Martínez, J. L., Coque, T. M., & Baquero, F.** (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 116–123. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
- Miltgen, G.** (2021). *Émergence et dynamique de diffusion des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans les DOM du sud-ouest de l'océan Indien dans une approche One Health*.

- Miltgen, G., Cholley, P., Martak, D., Thouverez, M., Seraphin, P., Leclaire, A., Traversier, N., Roquebert, B., Jaffar-Bandjee, M.-C., Lugagne, N., Cimon, C. Ben, Ramiandrisoa, M., Picot, S., Lignereux, A., Masson, G., Allyn, J., Allou, N., Mavingui, P., Belmonte, O., ... Hocquet, D.** (2020). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae circulating in the Reunion Island, a French territory in the Southwest Indian Ocean. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(36). <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0703-3>
- Miltgen, G., Martak, D., Valot, B., & Kamus, L.** (2022). One Health compartmental analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* on Reunion Island reveals partitioning between humans and livestock. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77, 1254–1262. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac054>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., & Browne, A. J.** (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Muurinen, J., Stedtfeld, R., Karkman, A., Pärnänen, K., Tiedje, J., & Virta, M.** (2017). Influence of Manure Application on the Environmental Resistome under Finnish Agricultural Practice with Restricted Antibiotic Use. *Environmental Science and Technology*, 51, 5989–5999. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00551>
- Noble, W. S.** (2009). How does multiple testing correction work? *Nature Biotechnology*, 27(12). <https://doi.org/10.1038/nbt1209-1135>
- O’Neill, J.** (2016). *Tackling drug-resistant infections globally : final report and recommendations.*
- Overdeest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., van der Zwaluw, K., Huijsdens, X., & Kluytmans, J.** (2011). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1216–1222. <https://doi.org/10.3201/eid1707.110209>
- Pappas, G.** (2013). Socio-economic, industrial and cultural parameters of pig-borne infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 19, 605–610. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12262>
- Pärnänen, K. M. M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T. U., Cacace, D., Do, T. T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J. L., Michael, S. G., Michael-Kordatou, I., O’Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørum, H., ... Manaia, C. M.** (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science Advances*, 5(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>
- 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>
- Queenan, K., Häslér, B., & Rushton, J.** (2016). A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance : is there a business case for it? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48, 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.014>
- Resistomap Oy.** (2020). *Resistomap.* <https://www.resistomap.com/>

- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Barceló, D., & Balcázar, J. L.** (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- 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.*
- Sanders, P., Bousquet-Melou, A., Chauvin, C., & Toutain, P. L.** (2011). Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Productions Animales*, 24(2), 199–204.
- Séguret, E.** (2021). *Procédure Opérationnelle Détermination par simple et double calcination des éléments minéraux dans les matrices végétales et organiques.*
- Seiler, C., & Berendonk, T. U.** (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>
- Stalder, T., Rogers, L. M., Renfrow, C., Yano, H., Smith, Z., & Top, E. M.** (2017). Emerging patterns of plasmid-host coevolution that stabilize antibiotic resistance. *Scientific Reports*, 7(4853). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04662-0>
- Stedtfeld, R. D., Baushke, S. W., Tourlousse, D. M., Miller, S. M., Stedtfeld, T. M., Gulari, E., Tiedje, J. M., & Hashsham, S. A.** (2008). Development and experimental validation of a predictive threshold cycle equation for quantification of virulence and marker genes by high-throughput nanoliter-volume PCR on the OpenArray platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3831–3838. <https://doi.org/10.1128/AEM.02743-07>
- Subbiah, M., Caudell, M. A., Mair, C., Davis, M. A., Matthews, L., Quinlan, R. J., Quinlan, M. B., Lyimo, B., Buza, J., Keyyu, J., & Call, D. R.** (2020). Antimicrobial resistant enteric bacteria are widely distributed amongst people, animals and the environment in Tanzania. *Nature Communications*, 11(228). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13995-5>
- Team, R. C.** (2022). *R: A language and environment for statistical computing.* <https://www.r-project.org/>
- Thanner, S., Drissner, D., & Walsh, F.** (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02227-15>
- UNEP.** (2022). Environmental Dimensions of Antimicrobial Resistance : Summary for Policymakers. In *United Nations Environment Programme* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.3201/eid0707.017727>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E.** (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater : Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment*, 429, 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Wales, A. D., & Davies, R. H.** (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 4, 567–604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>
- Walsh, F., & Duffy, B.** (2013). The Culturable Soil Antibiotic Resistome: A Community of Multi-Drug Resistant Bacteria. *PLOS One*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065567>

- Wang, Y., Lu, J., Engelstädter, J., Zhang, S., Ding, P., Mao, L., Yuan, Z., Bond, P. L., & Guo, J.** (2020). Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. *The ISME Journal*, *14*, 2179–2196. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0679-2>
- Wellington, E. M. H., Boxall, A. B. A., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A. S., Jones, D. L., Lee, N. M., Otten, W., Thomas, C. M., & Williams, A. P.** (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*, 155–165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
- Wickham, H.** (2009). Elegant Graphics for Data Analysis : ggplot2. In *Applied Spatial Data Analysis with R*.
- Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., Hashsham, S. A., & Tiedje, J. M.** (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(9), 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>
- Zinsstag, J., Schelling, E., & Tanner, M.** (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*, *101*, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

## Annexes

### *Annexe 1 : Questionnaire pour les agriculteurs avec les réponses de l'éleveur et du maraîcher sélectionnés à Salazie.*

#### Questionnaire agriculteurs

**But :** Enquête sur l'utilisation des antibiotiques et la gestion des effluents d'élevage pour, par la suite, orienter nos recherches en laboratoire et sélectionner certaines exploitations afin d'effectuer des prélèvements.

Les informations collectées ne seront pas diffusées et resteront au sein du Cirad afin d'orienter la suite de l'étude.

#### INFORMATIONS GENERALES

Date de l'enquête : X

|             |                                   |
|-------------|-----------------------------------|
| Nom, prénom | Eleveur et maraîcher sélectionnés |
| Adresse EA  | X                                 |
| EA          | X                                 |
| Tel         | X                                 |
| Mail        | X                                 |

Informations sur l'exploitation :

|  |   |
|--|---|
| Localisation de l'exploitation et du parcellaire (identification des ilots et coordonnées GPS) | X X   |
| Typologie de l'EA si existante   | Poulets de chair, porcin naisseur/engraisseur |

#### Composition du système de production et organisation du travail

- Existence de signe de qualité et d'origine sur un ou plusieurs produits ?  
Non

|   |  |
|---|--|
| Composition du système de production (élevage, cultures) et autres activités en % | 50% En <b>porcin</b> : naisseur et engraisseur. Sur ce site depuis 1989.<br>50% En <b>avicole</b> : poulets de chair depuis 1991 et 2012 (2 <sup>ème</sup> bâtiment) |
|---|--|

## Productions animales

Quel type d'élevage avez-vous sur votre exploitation ? (Distinguer le nombre d'adultes et de jeunes, remplir le tableau ci-dessous)

| Type d'élevage  | Nombre d'adultes et âge   | Nombre de jeunes et âge  |
|---|---|--|
| Bovin laitier   |   |  |
| Bovin viande naisseur   |   |  |
| Bovin viande engraisseur  |   |  |
| Ovin  |   |  |
| Caprin  |   |  |
| Porcin naisseur (nb truie) + nbbatiment+ nb bandes/an                                   |   |  |
| Porcin naisseur/ engraisseur (nbtruie, nb porcs charcutiers) + nbbatiment+ nb bandes/an | <p>32 truies = 5 bandes de 6 truies</p> <p>De la naissance à abattage ~6mois (180j) ~85 kg de carcasse</p> <p>2 bâtiments : - 311 m<sup>2</sup> -&gt; 2 maternités, 2 postsevragés et 1 gestantation – 400 m<sup>2</sup> pour engraisseur</p> | <p>Taux de renouvellement de 30% par an pour avoir cheptel assez jeune et bien portant. Truies arrivent à 5-6 mois, mise en reproduction à 8 mois (~140 kg) et restent entre 2,5 et 3 ans. Font environ une dizaine de petits.</p> <p>9-12 semaines en postsevragé puis en engraissement. Les truies seront vendues en réforme.</p> <p>Pour le renouvellement, la CPPR fournit les cochettes pour ne pas détériorer les races. Cochette Cadina et verrat Titan. IA en général et un verrat pour détection de chaleurs.</p> |
| Volaille (bâtiment en m <sup>2</sup> , nb de têtespar bâtiment)                         | <p>Entre 4 et 4,5 bandes/an, sur 650 m<sup>2</sup>, 2 bâtiments avec 7 300 sur 400 m<sup>2</sup> automatisés et 3 800 poulets sur 217 m<sup>2</sup> manuels donc environ 11 000 poulets par lot. Restent environ 50j sur site (45-52j).</p>   | <p>Poulets de chair 757 jaune jaune. Essaie de faire arriver les 2 bâtiments en même temps.</p>  |
| Lapin (nb cages mères)  |   |  |
| Autres (préciser) :   |   |  |

## Traitements

1. Concernant vos animaux, votre vétérinaire vous prescrit-il souvent des antibiotiques ?

Passent pour vide sanitaire une fois par an ou si on l'appelle.

Si oui :

2. Est-ce suite à votre demande ou passe-t-il régulièrement ? De manière préventive ou curative ? Pour quelle raison ? A quelle fréquence ? Sur quelle période de l'année ?

Pour les **porcs** :

- Série de vaccination.
- Antibiotiques : Shotapen (pénicilline et dihydrostreptomycine), Vetrimoxin (amoxicilline) et intramicine (benzylpénicilline et dihydrostreptomycine) surtout des pénicillines. Utilisés en cas de boiteries, infections de peau, toux. Si l'éleveur voit symptômes, prend la température, juge de quel problème il s'agit (respiratoire, peau, boiterie). Antibiotique couplé à anti-inflammatoire : Dexafort.

Appelle le vétérinaire la plupart du temps mais si reconnaît symptômes sur 1 ou 2 porcs l'éleveur s'en occupe car dispose d'un stock d'antibiotiques. Le vétérinaire interviendra et fera une ordonnance si un décès ou de nombreux animaux malades.

Traitement de sous la mère jusqu'à l'abattoir mais le plus fréquent en post sevrage car plus fragiles. Pratiquement pas d'antibiotiques en engraissement. En maternité, les porcins se mordent et donc infections. Traitement au cas par cas. L'éleveur traitera avec 1 mL de Shotapen et 0,5 mL de Dexafort pour soulager la douleur.

En post-sevrage, antibiotique utilisé pour lutter contre streptocoques fortement installés dans exploitation. A cette étape le porc pèse entre 20 et 30 kg et on va lui injecter 2,5 – 3 mL qui est fait 3 fois donc 9 mL de Vetrimoxin.

Puis, en engraissement, très peu utilisé, au cas par cas, par exemple dû à problème sur flanc.

Très peu d'antibiotiques (en quantité).

Pour les **poulets** : pas d'antibiotique donné, la dernière fois il y a au moins 6 ans. Va donner de la vitamine et de l'aspirine (anti-inflammatoire). Série de vaccin (Newcastel, Gamboro et au moins 3 autres). Si élevage bien tenu avec une bonne hygiène, pas d'utilisation d'antibiotique nécessaire.

Essaie au maximum d'éviter d'utiliser des antibiotiques car manipulations contraignantes et coûtent chers.

Le vétérinaire lui définit des protocoles selon âge et symptômes.

Utiliser qu'en curatif.

3. Quel est le nom et le contact de votre vétérinaire ? (tel, mail, adresse)

Pour volaille : Vincent Gallard

Pour porc : M. Mallec de Vétorun

4. Connaissez-vous les antibiotiques employés ? si oui, lesquels ?

Voir 2.

5. Savez-vous si l'utilisation des antibiotiques varie-t-elle en fonction de l'âge de l'animal et de sa période de naissance ?

Plus utilisés chez les porcs en post-sevrage qu'en engraissement.

6. Avez-vous l'impression d'utiliser moins d'antibiotiques qu'auparavant ? suite par exemple à des campagnes de sensibilisation. Ou d'employer des méthodes alternatives ?

Il n'y a plus de préventif.

Pas d'alternative utilisée.

7. Utilisez-vous des compléments alimentaires à bases de oligo-éléments/métaux ? si oui, lesquels ?

Alimentation complète avec oligo-éléments dedans à tout âge. Pas de supplément en vitamine.

Pour les truies P47, P11 pour sevrage et P21 pour engraissement. Mélange de plein de céréales (lui demander fiche technique).

Dedans par exemple : zinc, cuivre.

8. Avez-vous un registre par animal et les quantités données d'antibiotiques et de compléments alimentaires ? si oui est-il possible d'en avoir l'accès ?

Registre par bande. 5 bandes de 6 truies avec leur carrière à chacune.

### Effluents d'élevage

Quelle litière utilisez-vous pour chaque production ? (remplir le tableau ci-dessous en cochant la(les)bonne(s) case(s) et en indiquant le % et/ou en tonne)

| Type d'élevage   | Paille de canne  | Refus fourrages | Copeaux ou Sciure  | Broyat de déchets verts | Autres (préciser ex. cartons)                         |
|--|--|-----------------|--|-------------------------|---|
| Bovin laitier  |  |                 |  |                         |   |
| Bovin viande naisseur                                      |  |                 |  |                         |   |
| Bovin viande engraisseur                                   |  |                 |  |                         |   |
| Ovin   |  |                 |  |                         |   |
| Caprin   |  |                 |  |                         |   |
| Porcin (naisseur ou naisseur engraisseur)                  | Depuis 1 an, bâtiment d'engraissement 2/3 sur paille de cannes à sucre |                 |  |                         | Bâtiment naisseur, postsevrage : caillebotis integral |
| Volaille (poules pondeuses ou volailles de chair ou autre) |  |                 | 100% copeaux de bois de cryptomeria, naturels, non traités |                         |   |
| Lapin  |  |                 |  |                         |   |
| Autres (préciser) :  |  |                 |  |                         |   |

Quel(s) effluent(s) d'élevage obtenez-vous ? (remplir le tableau ci-dessous en cochant la(les) bonne(s) case(s) et en indiquant le %)

| Type d'effluent  | Lisier                               | Fumier                             | Fiente | Litière                               | Traitement (compostage, méthanisation, co-substrat...)              |
|--|--------------------------------------|------------------------------------|--------|---------------------------------------|---|
| Bovin laitier  |                                      |                                    |        |                                       |   |
| Bovin viande naisseur                                      |                                      |                                    |        |                                       |   |
| Bovin viande engraisseur                                   |                                      |                                    |        |                                       |   |
| Ovin   |                                      |                                    |        |                                       |   |
| Caprin   |                                      |                                    |        |                                       |   |
| Porcin (naisseur ou naisseur engraisseur)                  | 1 bâtiment + 1/3 de l'autre bâtiment | 2/3 bâtiment avec cannes de paille |        |                                       | Réalise du compost (potatium plus haut de 0,6 par rapport la norme) |
| Volaille (poules pondeuses ou volailles de chair ou autre) |                                      |                                    |        | 100% fientes de volaille avec copeaux |   |
| Lapin  |                                      |                                    |        |                                       |   |
| Autres (préciser) :  |                                      |                                    |        |                                       |   |

## Gestion des effluents d'élevage

1. Les effluents d'élevage sont-ils tous mélangés au même endroit, peu importe les âges des animaux ?

Les 3 effluents d'élevage sont mélangés dans une plateforme de compostage de 100 m<sup>2</sup>.

La litière de volaille est récupérée à chaque fin de bande.

Pour les porcs, les effluents sont récupérés dès qu'un lot part ou si livraison de paillage. En engraissement, c'est tous les 3 mois. En postsevrage, c'est tous les 2 mois et en maternité tous les mois.

Si vous réalisez du compostage :

2. Comment compostez-vous ? (Effluents mélangés avec quoi, nombre d'andins, fréquence de retournement, en combien de temps, toujours le même procédé)

Prend la litière de volaille qu'il mélange avec du lisier puis rajoute du fumier de porc et du lisier de porc. La litière de volaille est très importante car le fumier de porc est trop aéré et ne retient pas le lisier de porc. => 50 m<sup>2</sup> de litière de volaille + 50 m<sup>2</sup> de fumier de porc + 24 m<sup>2</sup> de lisier de porc.

Le compost est placé dans un silo de compostage avec des sondes de température. Il doit atteindre les 55 °C pendant 15 jours. Il ne faut pas dépasser les 70 °C qui peuvent détruire les molécules qui rendent le compost riche. Puis retourne le tas pour oxygéner puis attend que ça remonte à 55 °C et laisse pendant 15j. Ce retournement est effectué 3 à 4 fois pour réussir à bien dégrader les pailles de cannes à sucre.

Silo de compostage : 5\*10\*1 m avec pour hauteur de compost jusqu'à 2 m.

Retournement par andin de 10\*5 m.

Projet personnel accompagné par la CPPR.

Prend 6 mois pour avoir un compost normé.

3. Avez-vous des variables de suivi du compostage ? Si oui, lesquelles ?

La température est le facteur de suivi du compostage.

Analyse le NPK, Salmonelle, champignons, métaux lourds par le laboratoire Auréa.

## Hygiène

1. A l'entrée des bâtiments d'élevages, y a-t-il des bacs désinfectants ?  
Oui.

2. Si oui : de quoi sont-ils composés (javel, bactéricide, ...) ?

Même produit que pour désinfection des bâtiments (Mefisto).

3. A quelle fréquence les changez-vous ?

15j

4. Sont-ils évacués dans la fosse à lisier/fiente ou poche à eaux usées ?

Comme les eaux de lavage.

5. Avec quoi nettoyez-vous vos bâtiments (javel, bactéricide, ...) ? A quelle fréquence ?

Pour porcs et poulets, utilise désinfectants (Mefisto) et insecticides (Solfac) à chaque départ d'une bande ou d'un lot.

Tous les 50j pour les poulets avec 1 à 2 semaines de vide sanitaire. Pour les porcs, à chaque fois qu'un paillage est installé ou un lot est vendu -> Tous les 3 mois en engraissement, en post-sevrage tous les 2 mois et en maternité tous les mois. Les salles où sont les porcs sont plus petites donc en 3h une salle est nettoyée pour le prochain lot.

6. Les déchets sont-ils évacués dans la fosse à lisier/fiente ou poche à eaux usées ?

Pour les bâtiments des porcs, eaux de lavage va dans des fosses et pour les poulets vont dans des poches d'eau de récupération d'eau de lavage. Ces eaux sont utilisées pour réhumidifier le compost et épandues sur 10 ha de cannes à sucre mais il veut dans l'avenir tout utiliser sur son exploitation. Pas de filtre utilisé.

Bien séparées des eaux de pluies.

## Le devenir des effluents

1. Vos effluents d'élevage sont-ils épandus directement sur les parcelles de votre exploitation ou en dehors (en % et/ou en tonne) ? Dans le second cas, sont-ils transformés avant d'être épandus ?

10 ha de lisier de porc épandu sur cannes à sucre à Mare à poule d'eau.

Le compost est entièrement livré par l'éleveur auprès de maraîchers de Salazie et un à Saint André.  
Plus besoin de plan d'épandage quand c'est un compost normé.

Si vendus :

2. A qui : contrat ou non avec préteurs de terres (clients réguliers, d'opportunités) ? Contact (nom, tel, mail, adresse). A quelle catégorie d'exploitant (canniers, maraîchers, particuliers, etc) ?

Que pour professionnel : 6 à 7 agriculteurs sont livrés possédant chacun 5 à 10 ha de maraîchage.

Les maraîchers cultivent de la salade, chou, courgette, chouchou, tomate, citrouille, concombre, etc.  
En général, en plein champ, ils épandent le compost, le mélangent avec la terre puis la recouvre avec un tapis de sol pour éviter la pousse des mauvaises herbes.

3. Quand ?

Le compost nécessite au moins 6 mois pour être de bonne qualité et aux normes. Il n'a pas d'odeur. Il est ainsi agréable à travailler pour les maraîchers.

4. A quelle fréquence ?

Livre ou stock sous bâche avant livraison.

Les maraîchers aiment utiliser ce type de compost car il permet de garder un taux d'humidité important ainsi les plantes ont accès à de l'eau facilement au cours de leur développement.

## Productions Végétales

Quel **type de cultures** avez-vous sur votre exploitation ? (Distinguer pour chaque ligne la surface totale et épanachable exprimées en hectares) :

| Culture                              | Surface totale (ha),<br>nombre de<br>parcelle/serre, type de<br>culture  | Surface épanachable (ha),<br>nombre de parcelle/serre,<br>type de culture |
|--------------------------------------|--|---|
| Canne à sucre :                      |  |   |
| Verger :                             |  |   |
| Maraichage plein champ :             | 1 ha de terrain travaillé sur 4 ha d'exploitation. Toute l'année : salade, betterave. Selon saison, courgette, chou, oignon vert, haricot vert, concombre, coriander, navet, chou-rave | 1 ha  |
| Maraichage sous abris pleine-terre : |  |   |
| Maraichage sous abris hors-sol :     |  |   |
| Prairies pâturées :                  |  |   |
| Prairies fauchées :                  |  |   |
| Productions florales :               |  |   |
| Autres (préciser) :                  |  |   |

### Les intrants

- Utilisez-vous des effluents d'élevage sur vos parcelles ?

Oui

Si oui,

- D'où proviennent-ils ? (Votre exploitation, autre exploitation : contact (nom, tel, mail, adresse)) Quelle catégorie d'élevage (porcin, avicole, bovin, cunicole) ?

Différents éleveurs : compost de l'éleveur sélectionné et litière de volaille de différents éleveurs de Salazie.

Veillez remplir le tableau ci-dessous :

| Culture                              | Quel type d'effluent utilisez-vous ? | A quelle dose ?   | Pour quelle fréquence ?       | A quelle moment ? (avant, pendant, après la culture)                                 |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------------|--|
| Canne à sucre :                      |                                      |   |                               |  |
| Verger :                             |                                      |   |                               |  |
| Maraichage plein champ :             | Compost et/ou litière de volaille    | 200-300 kg d'effluent pour une parcelle de 200 m <sup>2</sup> | Dépend des moments de l'année | Avant la culture en général. Très rarement pour le chou, lors de la culture au trou. |
| Maraichage sous abris pleine-terre : |                                      |   |                               |  |
| Maraichage sous abris hors-sol :     |                                      |   |                               |  |
| Prairies pâturées :                  |                                      |   |                               |  |
| Prairies fauchées :                  |                                      |   |                               |  |
| Productions florales :               |                                      |   |                               |  |
| Autres (préciser) :                  |                                      |   |                               |  |

Pratique : recouvre le sol de compost ou litière de volaille, retourne le sol en surface (5-10 cm) puis met de l'engrais chimique et enfin pose une bâche où il fait des trous pour planter les végétaux.

*Annexe 2 : Fiche de consentement pour la réalisation d'enquêtes et de prélèvements d'échantillons.*



**AUTORISATION D'ENQUÊTE ET DE COLLECTE  
D'ÉCHANTILLONS**

**Dans le cadre de la mission d'intérêt public dont il est investi pour la recherche en agronomie au service du développement des régions chaudes, le CIRAD mène une étude exploratoire sur la dynamique des résidus médicamenteux et des résistances aux antibiotiques dans les agroécosystèmes Réunionnais, en partenariat avec les RITA.**

**L'objectif de cette étude est d'évaluer la présence de résidus médicamenteux et de gènes de résistance aux antibiotiques au sein de trois agroécosystèmes de l'île de La Réunion.**

Cette étude s'inscrit dans le cadre du stage de fin d'études de Marion Maréchal, en dernière année d'école d'ingénieur à l'Institut Agro Dijon, en dominante : Ressources, Données, Diagnostics et Changements Climatiques. Elle sera chargée de réaliser des enquêtes sur l'utilisation des antibiotiques et la gestion des effluents d'élevage auprès des agriculteurs avec comme accompagnants éventuels un technicien et des chercheurs du Cirad. Puis, elle réalisera des prélèvements (effluents d'élevage, sols, végétaux, eaux chez des éleveurs, maraîchers) sur les exploitations sélectionnées. Des analyses de laboratoire seront réalisées sur ces prélèvements afin d'étudier la présence de résidus médicamenteux et de gènes de résistance aux antibiotiques.

**Les informations collectées seront restituées aux agriculteurs concernés et ne seront pas diffusées : elles resteront au sein du Cirad afin d'orienter la suite des études sur cette thématique.**

Durée de l'étude : **6 mois** à compter du 21/03/2022

Responsables de l'étude : **Thierry Baldet, Adrien Rieux et Valérie Soti**

Stagiaire : **Marion Maréchal**

Adresse à contacter pour obtenir des informations sur l'étude **Email : [thierry.baldet@cirad.fr](mailto:thierry.baldet@cirad.fr), [adrien.rioux@cirad.fr](mailto:adrien.rioux@cirad.fr), [valerie.soti@cirad.fr](mailto:valerie.soti@cirad.fr) et [marion.marechal@cirad.fr](mailto:marion.marechal@cirad.fr) ; Pôle de Protection de Plantes ,7 chemin d l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, tel : 0669068965 (Marion Maréchal)**

Bénéfices éventuels pour les agriculteurs : **Valoriser ses produits**

Risques pour les agriculteurs : **Aucun**

Accès aux résultats : **Résultats confidentiels restitués aux éleveurs concernés et permettant d'orienter de prochaines études**

**Autorisation**

Je, soussigné(e),

Nom, prénom(s) : .....

Contact (téléphone, email) .....

- Autorise par la présente l'accès à mon exploitation située (adresse et point GPS) : .....

Période de l'accès autorisé :

..... pour la collecte

d'échantillons **d'effluents d'élevage, sols, végétaux et eaux**.

- Je suis informé(e) que mes informations personnelles figurant sur le présent document (nom, prénom, email, téléphone, adresse et GPS de l'exploitation) seront utilisées par le Cirad, sur le fondement de l'intérêt public de recherche poursuivi par le projet, afin de me contacter en cas de nécessité pour la conduite de l'étude. Ces données seront conservées toute la durée du projet, stockées sur un support informatique dont l'accès est protégé (lisible uniquement par l'équipe de chercheurs) et ne seront pas divulguées à des tiers. Je peux demander l'accès, la rectification ou la suppression de ces informations personnelles à tout moment en contactant les responsables de l'étude. Pour toute information ou exercice de vos droits sur les traitements de données personnelles gérés par le CIRAD, vous pouvez contacter son délégué à la protection des données à l'adresse [dpo@cirad.fr](mailto:dpo@cirad.fr).
- Je suis informé(e) que je peux retirer cette autorisation de prélèvement à tout moment.

Fait à ..... le .....

Signatures :

**L'agriculteur**

L'agent de terrain

*Annexe 3 : Tableau des gènes de résistance choisis pour l'analyse réalisée par le laboratoire Resistomap.*

|          |                 |                |       |               |                |
|----------|-----------------|----------------|-------|---------------|----------------|
| id_assay | gene            | class          | AY412 | aadA7         | Aminoglycoside |
| AY600    | 16S rRNA2       | 16S rRNA       | AY413 | aadB          | Aminoglycoside |
| AY1      | 16S rRNA        | 16S rRNA       | AY414 | ant4-ib       | Aminoglycoside |
| AY624    | 16S rRNA3       | 16S rRNA       | AY415 | ant6-ia       | Aminoglycoside |
| AY14     | aph             | Aminoglycoside | AY416 | ant6-ib       | Aminoglycoside |
| AY27     | acc             | Aminoglycoside | AY417 | aph_viii      | Aminoglycoside |
| AY2      | aacC2           | Aminoglycoside | AY418 | aph(3'')-ia   | Aminoglycoside |
| AY4      | aacA/aphD       | Aminoglycoside | AY419 | aph3-ib       | Aminoglycoside |
| AY6      | aac(6')-II      | Aminoglycoside | AY420 | aph3-iii      | Aminoglycoside |
| AY7      | aphA3_1         | Aminoglycoside | AY421 | aph3-viia     | Aminoglycoside |
| AY9      | aadA2_1         | Aminoglycoside | AY422 | aph3-via      | Aminoglycoside |
| AY10     | aadA_1          | Aminoglycoside | AY423 | aph4-ia       | Aminoglycoside |
| AY13     | aadD            | Aminoglycoside | AY424 | aph4-ib       | Aminoglycoside |
| AY15     | aadA9_1         | Aminoglycoside | AY426 | apmA          | Aminoglycoside |
| AY17     | aphA1/7         | Aminoglycoside | AY427 | armA_1        | Aminoglycoside |
| AY21     | aadE            | Aminoglycoside | AY428 | aph9-ia       | Aminoglycoside |
| AY22     | str             | Aminoglycoside | AY3   | aacC4         | Aminoglycoside |
| AY23     | strA            | Aminoglycoside | AY602 | armA_2        | Aminoglycoside |
| AY24     | strB            | Aminoglycoside | AY603 | rmtB          | Aminoglycoside |
| AY328    | aadA5_2         | Aminoglycoside | AY8   | aac(6')-Ib_1  | Aminoglycoside |
| AY330    | aph(2')-Ib      | Aminoglycoside | AY98  | ampC_1        | Beta Lactam    |
| AY331    | aadA2_3         | Aminoglycoside | AY100 | ampC_2        | Beta Lactam    |
| AY385    | aac(6')-Iy      | Aminoglycoside | AY104 | blaSHV_1      | Beta Lactam    |
| AY386    | aac(6')II1      | Aminoglycoside | AY110 | blaOXA10_1    | Beta Lactam    |
| AY388    | aac3-IVa        | Aminoglycoside | AY121 | blaCTX-M_1    | Beta Lactam    |
| AY389    | aph6-ia         | Aminoglycoside | AY97  | cfiA          | Beta Lactam    |
| AY390    | spcN            | Aminoglycoside | AY101 | blaMOX/blaCMY | Beta Lactam    |
| AY391    | aac(3)-ib       | Aminoglycoside | AY102 | blaOCH        | Beta Lactam    |
| AY392    | aac(3)-id_ie    | Aminoglycoside | AY103 | blaPAO        | Beta Lactam    |
| AY393    | aac(3)-iid_iiia | Aminoglycoside | AY105 | blaVEB        | Beta Lactam    |
| AY394    | aac(3)-xa_1     | Aminoglycoside | AY107 | blaROB        | Beta Lactam    |
| AY396    | aac(6)-ig       | Aminoglycoside | AY108 | blaOXY        | Beta Lactam    |
| AY397    | aac(6)-iic      | Aminoglycoside | AY109 | blaPSE        | Beta Lactam    |
| AY398    | aac(6)-ij       | Aminoglycoside | AY111 | cphA_1        | Beta Lactam    |
| AY399    | aac(6)-im       | Aminoglycoside | AY113 | bla-L1        | Beta Lactam    |
| AY400    | aac(6)-ir       | Aminoglycoside | AY114 | cfxA          | Beta Lactam    |
| AY401    | aac(6)-is_iu_ix | Aminoglycoside | AY115 | cepA          | Beta Lactam    |
| AY402    | aac(6)-iv_ih    | Aminoglycoside | AY117 | ampC/blaDHA   | Beta Lactam    |
| AY403    | aac(6)-iw       | Aminoglycoside | AY125 | blaGES        | Beta Lactam    |
| AY404    | aac(6)-iz       | Aminoglycoside | AY126 | blaSFO        | Beta Lactam    |
| AY406    | aac6-aph2       | Aminoglycoside | AY127 | blaTLA        | Beta Lactam    |
| AY407    | aacA43          | Aminoglycoside | AY128 | blaZ          | Beta Lactam    |
| AY408    | aadA10          | Aminoglycoside | AY129 | blaVIM        | Beta Lactam    |
| AY409    | aadA16          | Aminoglycoside | AY131 | pbp5          | Beta Lactam    |
| AY410    | aadA1_2         | Aminoglycoside | AY132 | pbp           | Beta Lactam    |
| AY411    | aadA6           | Aminoglycoside | AY133 | mecA          | Beta Lactam    |

|       |                      |             |       |              |     |
|-------|----------------------|-------------|-------|--------------|-----|
| AY134 | blaCTX-M_5           | Beta Lactam | AY233 | qacA/qacB    | MDR |
| AY138 | penA                 | Beta Lactam | AY238 | qac          | MDR |
| AY147 | blaCTX-M_8           | Beta Lactam | AY42  | pmrA         | MDR |
| AY152 | blaNDM               | Beta Lactam | AY199 | acrB_1       | MDR |
| AY336 | blaACC               | Beta Lactam | AY201 | acrF         | MDR |
| AY338 | bla1                 | Beta Lactam | AY202 | adeA         | MDR |
| AY339 | blaCMY_2             | Beta Lactam | AY206 | cmr          | MDR |
| AY430 | ampC_cefa            | Beta Lactam | AY207 | acrA_1       | MDR |
| AY431 | blaSME               | Beta Lactam | AY208 | emrD_1       | MDR |
| AY432 | blaCTX-M             | Beta Lactam | AY211 | mdtE         | MDR |
| AY433 | blaFOX               | Beta Lactam | AY215 | mexA         | MDR |
| AY434 | imiR_2               | Beta Lactam | AY219 | emrB/qacA_1  | MDR |
| AY435 | blaOXA51             | Beta Lactam | AY222 | mtrE         | MDR |
| AY436 | blaOXY1              | Beta Lactam | AY224 | oprD         | MDR |
| AY437 | blaPER               | Beta Lactam | AY226 | ttgA         | MDR |
| AY438 | blaSHV11             | Beta Lactam | AY227 | mepA         | MDR |
| AY439 | blaTEM               | Beta Lactam | AY228 | mexE         | MDR |
| AY440 | blaKPC               | Beta Lactam | AY234 | cfr          | MDR |
| AY441 | beta_ccra            | Beta Lactam | AY240 | mexB         | MDR |
| AY442 | bl1acc               | Beta Lactam | AY350 | mexA         | MDR |
| AY443 | beta_B2              | Beta Lactam | AY353 | tolC_2       | MDR |
| AY444 | blaACT               | Beta Lactam | AY355 | acrR_1       | MDR |
| AY445 | blaB                 | Beta Lactam | AY360 | marR_3       | MDR |
| AY446 | blaCARB              | Beta Lactam | AY482 | oqxA         | MDR |
| AY447 | blaGOB               | Beta Lactam | AY483 | adel         | MDR |
| AY448 | blaHERA              | Beta Lactam | AY484 | bexA/norM    | MDR |
| AY449 | blaIMI               | Beta Lactam | AY485 | mdtA         | MDR |
| AY450 | blaIND               | Beta Lactam | AY486 | mdtH         | MDR |
| AY451 | blaLEN               | Beta Lactam | AY487 | cefa_qacelta | MDR |
| AY452 | blaMIR               | Beta Lactam | AY488 | qacA/B       | MDR |
| AY453 | blaBEL-<br>nonmobile | Beta Lactam | AY489 | qacF/H       | MDR |
| AY454 | blaADC-<br>nonmobile | Beta Lactam | AY490 | arsA         | MDR |
| AY601 | blaOXA48             | Beta Lactam | AY491 | cadC         | MDR |
| AY612 | blaOXA23             | Beta Lactam | AY492 | copA         | MDR |
| AY613 | blaOXA24             | Beta Lactam | AY493 | czcA         | MDR |
| AY614 | blaOXA48_2           | Beta Lactam | AY494 | pbrT         | MDR |
| AY615 | blaOXA51_2           | Beta Lactam | AY495 | pcoA         | MDR |
| AY616 | blaOXA54             | Beta Lactam | AY497 | sugE         | MDR |
| AY617 | blaOXA55             | Beta Lactam | AY498 | trcB         | MDR |
| AY618 | blaOXA58_2           | Beta Lactam | AY499 | terW         | MDR |
| AY289 | int1_2               | Integrans   | AY212 | mdtG_1       | MDR |
| AY293 | int1_1               | Integrans   | AY298 | IS613        | MGE |
| AY500 | int13                | Integrans   | AY299 | tnpA_1       | MGE |
| AY294 | int2_2               | Integrans   | AY316 | lncN_rep     | MGE |
|       |                      |             | AY317 | lncN_oriT    | MGE |
|       |                      |             | AY318 | lncP_oriT    | MGE |

|       |             |      |       |            |          |
|-------|-------------|------|-------|------------|----------|
| AY319 | IncQ_oriT   | MGE  | AY545 | ermC_2     | MLSB     |
| AY320 | IncW_trwAB  | MGE  | AY546 | ermX_2     | MLSB     |
| AY321 | pAMBL       | MGE  | AY547 | ermB_3     | MLSB     |
| AY324 | pAKD1       | MGE  | AY548 | ermO       | MLSB     |
| AY504 | IncI1_repl1 | MGE  | AY549 | lnuF       | MLSB     |
| AY505 | IncN_korA   | MGE  | AY550 | lsaC       | MLSB     |
| AY513 | IS3         | MGE  | AY551 | mefB       | MLSB     |
| AY514 | IS5/IS1182  | MGE  | AY552 | msrD       | MLSB     |
| AY521 | IncF_FIC    | MGE  | AY553 | msrE       | MLSB     |
| AY523 | Tn3         | MGE  | AY554 | vat(A)     | MLSB     |
| AY524 | Tn5403      | MGE  | AY43  | ermD_1     | MLSB     |
| AY526 | traN        | MGE  | AY56  | ermB_1     | MLSB     |
| AY527 | trbC        | MGE  | AY65  | mefA_1     | MLSB     |
| AY44  | ermD/K      | MLSB | AY71  | vgaA_1     | MLSB     |
| AY46  | ermF_1      | MLSB | AY142 | ttgB       | Other    |
| AY53  | lmrA_1      | MLSB | AY186 | nisB_1     | Other    |
| AY54  | erm36       | MLSB | AY188 | nimE       | Other    |
| AY57  | ermT_1      | MLSB | AY191 | merA       | Other    |
| AY58  | msrC_1      | MLSB | AY197 | crAss56    | Other    |
| AY61  | mphB        | MLSB | AY198 | crAss64    | Other    |
| AY66  | msrA_1      | MLSB | AY204 | sat4       | Other    |
| AY68  | ermX_1      | MLSB | AY218 | qacED1_1   | Other    |
| AY72  | vgaB_1      | MLSB | AY236 | qacED1_3   | Other    |
| AY73  | pncA        | MLSB | AY465 | bacA       | Other    |
| AY75  | lnuA_1      | MLSB | AY466 | mcr1       | Other    |
| AY77  | vatE_2      | MLSB | AY467 | mcr2       | Other    |
| AY83  | ermY        | MLSB | AY468 | fosB       | Other    |
| AY90  | ermA/ermTR  | MLSB | AY469 | fosX       | Other    |
| AY91  | oleC        | MLSB | AY470 | arr3       | Other    |
| AY92  | carB        | MLSB | AY471 | arr2       | Other    |
| AY94  | pikR2       | MLSB | AY472 | fabK       | Other    |
| AY528 | ereA        | MLSB | AY29  | catB3      | Phenicol |
| AY530 | erm34       | MLSB | AY30  | catB8      | Phenicol |
| AY531 | erm35       | MLSB | AY31  | ceoA       | Phenicol |
| AY532 | ermA        | MLSB | AY35  | cmlA_2     | Phenicol |
| AY533 | ermB_2      | MLSB | AY37  | cmxA       | Phenicol |
| AY534 | ermD        | MLSB | AY38  | catA1      | Phenicol |
| AY535 | ermF        | MLSB | AY41  | cmlA_4     | Phenicol |
| AY536 | lnuB        | MLSB | AY555 | cat        | Phenicol |
| AY537 | lnuC        | MLSB | AY556 | cat(pC221) | Phenicol |
| AY538 | mefA        | MLSB | AY557 | catA2      | Phenicol |
| AY539 | mphA        | MLSB | AY558 | catA3      | Phenicol |
| AY540 | vat(B)      | MLSB | AY559 | catB2      | Phenicol |
| AY541 | vga(A)LC_1  | MLSB | AY560 | catB9      | Phenicol |
| AY543 | erm42       | MLSB | AY561 | catP       | Phenicol |
| AY544 | ermE        | MLSB | AY562 | catQ       | Phenicol |

|       |                |              |       |          |              |
|-------|----------------|--------------|-------|----------|--------------|
| AY563 | cmlV           | Phenicol     | AY255 | tetA/B_1 | Tetracycline |
| AY564 | fexA           | Phenicol     | AY258 | tetK     | Tetracycline |
| AY565 | oprA           | Phenicol     | AY259 | tetQ     | Tetracycline |
| AY566 | floR           | Phenicol     | AY260 | tetH     | Tetracycline |
| AY32  | floR_1         | Phenicol     | AY263 | tetW     | Tetracycline |
| AY33  | yidY/mdtL      | Phenicol     | AY264 | tetO_2   | Tetracycline |
| AY34  | mdtL           | Phenicol     | AY267 | tetX     | Tetracycline |
| AY95  | qnrA           | Quinolone    | AY268 | tetC_2   | Tetracycline |
| AY96  | qnrB           | Quinolone    | AY269 | tetS     | Tetracycline |
| AY455 | norA           | Quinolone    | AY273 | tetE     | Tetracycline |
| AY456 | qepA           | Quinolone    | AY274 | tetPB_1  | Tetracycline |
| AY457 | qnrB4          | Quinolone    | AY276 | tetT     | Tetracycline |
| AY458 | qnrB_2         | Quinolone    | AY325 | tetR_1   | Tetracycline |
| AY459 | qnrD           | Quinolone    | AY367 | tetL_2   | Tetracycline |
| AY460 | qnrS_1         | Quinolone    | AY568 | tet39    | Tetracycline |
| AY461 | qnrS2          | Quinolone    | AY570 | tet38    | Tetracycline |
| AY462 | qnrVC1_VC3_VC6 | Quinolone    | AY571 | tetD     | Tetracycline |
| AY463 | qnrVC_2        | Quinolone    | AY572 | tetG     | Tetracycline |
| AY242 | sul1_1         | Sulfonamide  | AY573 | tetJ     | Tetracycline |
| AY243 | sul2_1         | Sulfonamide  | AY574 | tetM     | Tetracycline |
| AY364 | sul1_3         | Sulfonamide  | AY575 | tetPA    | Tetracycline |
| AY241 | sul4           | Sulfonamide  | AY576 | tet44    | Tetracycline |
| AY245 | sul1_2         | Sulfonamide  | AY577 | tetR     | Tetracycline |
| AY247 | folA_1         | Sulfonamide  | AY579 | dfrA1    | Trimethoprim |
| AY361 | folP_2         | Sulfonamide  | AY284 | dfrA1_1  | Trimethoprim |
| AY365 | sul2_2         | Sulfonamide  | AY285 | dfrA12   | Trimethoprim |
| AY244 | sul3_1         | Sulfonamide  | AY578 | dfrA10   | Trimethoprim |
| AY473 | A. baumannii   | Taxanomic    | AY580 | dfrA15   | Trimethoprim |
| AY474 | Bacteroidetes  | Taxanomic    | AY581 | dfra17   | Trimethoprim |
| AY475 | Campylobacter  | Taxanomic    | AY582 | dfrA19   | Trimethoprim |
| AY476 | Enterococci    | Taxanomic    | AY583 | dfra21   | Trimethoprim |
| AY477 | Firmicutes     | Taxanomic    | AY584 | dfrA22   | Trimethoprim |
| AY478 | K. pneumoniae  | Taxanomic    | AY585 | dfrA25   | Trimethoprim |
| AY479 | P. aeruginosa  | Taxanomic    | AY586 | dfrA27   | Trimethoprim |
| AY480 | Staphylococci  | Taxanomic    | AY588 | dfrA7    | Trimethoprim |
| AY622 | Streptomyces_1 | Taxanomic    | AY589 | dfrA8    | Trimethoprim |
| AY623 | Streptomyces_2 | Taxanomic    | AY590 | dfrAB4   | Trimethoprim |
| AY567 | tetM_4         | Tetracycline | AY591 | dfrB     | Trimethoprim |
| AY256 | tetC_1         | Tetracycline | AY592 | dfrC     | Trimethoprim |
| AY265 | tetM_1         | Tetracycline | AY593 | dfrG     | Trimethoprim |
| AY266 | tetL_1         | Tetracycline | AY594 | dfrK     | Trimethoprim |
| AY281 | tetM_2         | Tetracycline | AY156 | vanC_2   | Vancomycin   |
| AY368 | tetM_3         | Tetracycline | AY159 | vanB_1   | Vancomycin   |
| AY249 | tet36_1        | Tetracycline | AY160 | vanTE    | Vancomycin   |
| AY250 | tet32          | Tetracycline | AY161 | vanD     | Vancomycin   |
| AY254 | tetA_2         | Tetracycline | AY162 | vanHD    | Vancomycin   |

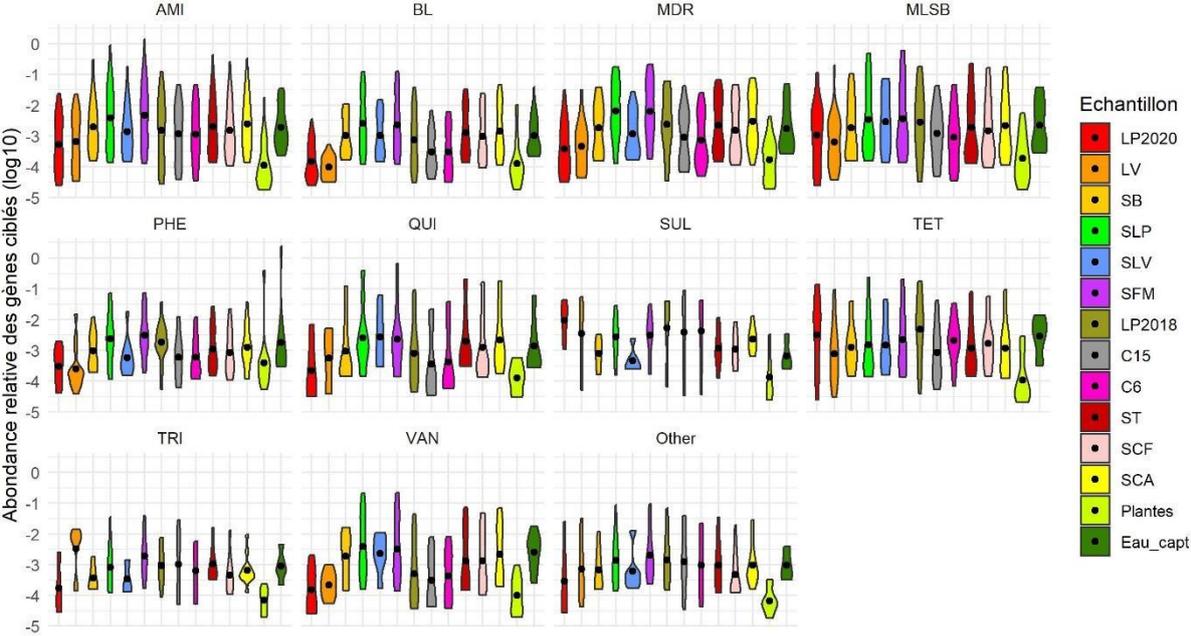
|       |         |            |
|-------|---------|------------|
| AY163 | vanHB   | Vancomycin |
| AY164 | vanRA_1 | Vancomycin |
| AY165 | vanSA   | Vancomycin |
| AY167 | vanWB   | Vancomycin |
| AY170 | vanXB   | Vancomycin |
| AY174 | vanRB   | Vancomycin |
| AY175 | vanRC   | Vancomycin |
| AY176 | vanRC4  | Vancomycin |
| AY177 | vanRD   | Vancomycin |
| AY181 | vanTG   | Vancomycin |
| AY182 | vanYB   | Vancomycin |
| AY183 | vanYD_1 | Vancomycin |
| AY380 | vanSC_2 | Vancomycin |
| AY381 | vanTC_2 | Vancomycin |
| AY595 | vanA    | Vancomycin |
| AY596 | vanC2   | Vancomycin |
| AY597 | vanG    | Vancomycin |
| AY598 | vanXA   | Vancomycin |
| AY599 | vanSB   | Vancomycin |

*Annexe 4 : Tableau des résidus d'antibiotiques analysés.*

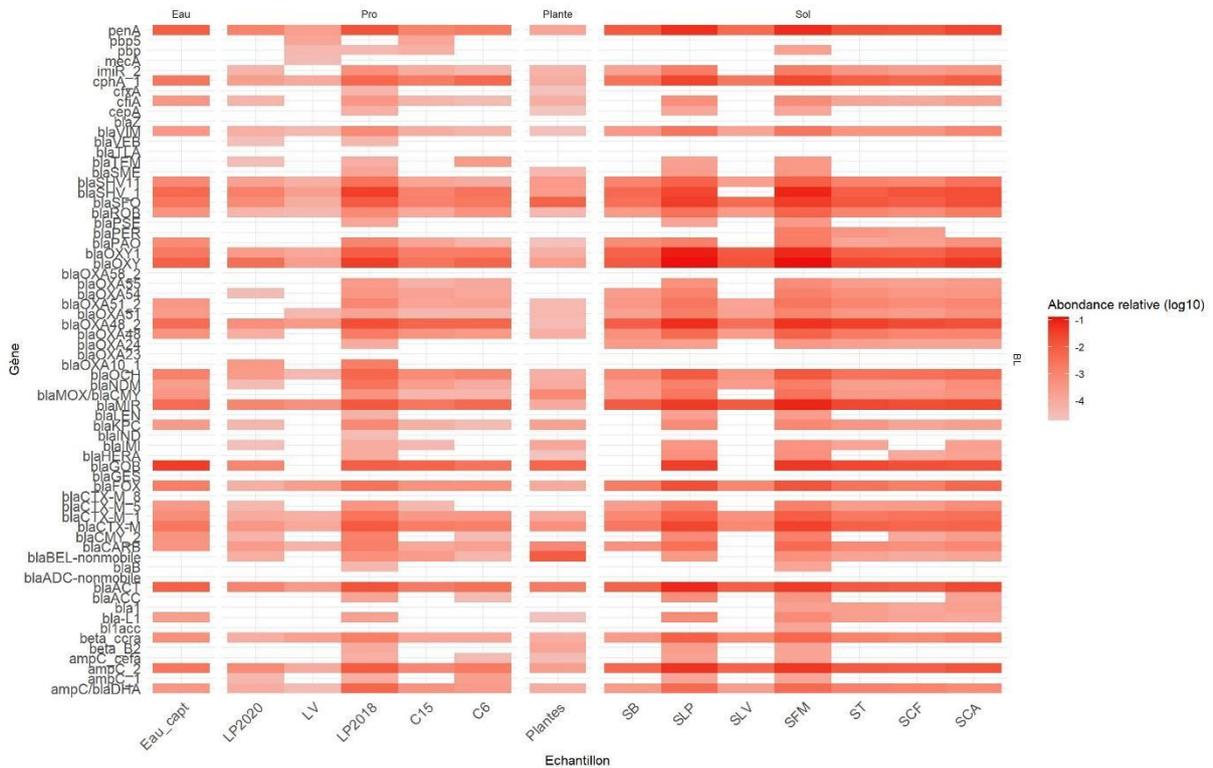
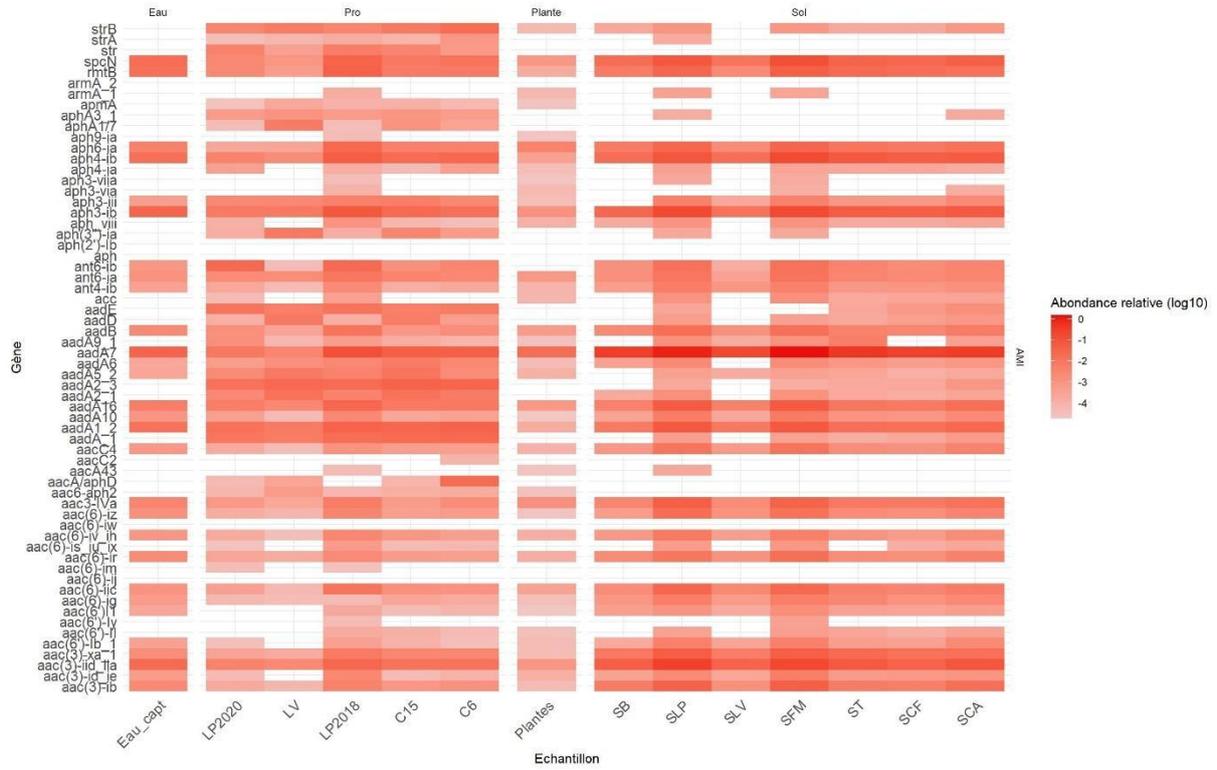
| Compound No: | Compounds               | Groups         |
|--------------|-------------------------|----------------|
| CD1          | Amoxicillin             | Penicillins    |
| CD2          | Ampicillin              | Penicillins    |
| CD3          | Cloxacillin             | Penicillins    |
| CD4          | Dicloxacillin           | Penicillins    |
| CD5          | Oxacillin               | Penicillins    |
| CD6          | Penicillin V            | Penicillins    |
| CD7          | Penicillin G            | Penicillins    |
| CD8          | Azithromycin            | Macrolides     |
| CD9          | Clarithromycin          | Macrolides     |
| CD10         | Erythromycin            | Macrolides     |
| CD11         | Tiamulin                | Macrolides     |
| CD12         | Tylosin                 | Macrolides     |
| CD13         | Cefaclor                | Cephalosporins |
| CD14         | Cefadroxil              | Cephalosporins |
| CD15         | Cefalexin               | Cephalosporins |
| CD16         | Cefazolin               | Cephalosporins |
| CD17         | Ciprofloxacin           | Quinolones     |
| CD18         | Danofloxacin            | Quinolones     |
| CD19         | Difloxacin              | Quinolones     |
| CD20         | Enrofloxacin            | Quinolones     |
| CD21         | Flumequine              | Quinolones     |
| CD22         | Marbofloxacin           | Quinolones     |
| CD23         | Norfloxacin             | Quinolones     |
| CD24         | Ofloxacin               | Quinolones     |
| CD25         | Oxolinic acid           | Quinolones     |
| CD26         | Sarafloxacin            | Quinolones     |
| CD27         | Chlortetracycline       | Tetracyclines  |
| CD28         | Doxycycline             | Tetracyclines  |
| CD29         | Oxytetracycline         | Tetracyclines  |
| CD30         | Tetracycline            | Tetracyclines  |
| CD31         | Sulfaclozine            | Sulfonamides   |
| CD32         | Sulfachloropyridazine   | Sulfonamides   |
| CD33         | Sulfadimidine           | Sulfonamides   |
| CD34         | Sulfadimethoxine        | Sulfonamides   |
| CD35         | Sulfadoxine             | Sulfonamides   |
| CD36         | Sulfadiazine            | Sulfonamides   |
| CD37         | Sulfaguanidine          | Sulfonamides   |
| CD38         | Sulfisoxazole           | Sulfonamides   |
| CD39         | Sulfamonomethoxine      | Sulfonamides   |
| CD40         | Sulfamethoxy pyridazine | Sulfonamides   |
| CD41         | Sulfamerazine           | Sulfonamides   |
| CD42         | Sulfamethizole          | Sulfonamides   |
| CD43         | Sulfamethoxazole        | Sulfonamides   |
| CD44         | Sulfamoxole             | Sulfonamides   |

|      |                  |                   |
|------|------------------|-------------------|
| CD45 | Sulfapyridine    | Sulfonamides      |
| CD46 | Sulfaquinoxaline | Sulfonamides      |
| CD47 | Sulfathiazole    | Sulfonamides      |
| CD48 | Chloramphenicol  | Amphenicols       |
| CD49 | Florfenicol      | Amphenicols       |
| CD50 | Thiamphenicol    | Amphenicols       |
| CD51 | Trimethoprim     | Other antibiotics |
| CD52 | Lincomycin       | Other antibiotics |

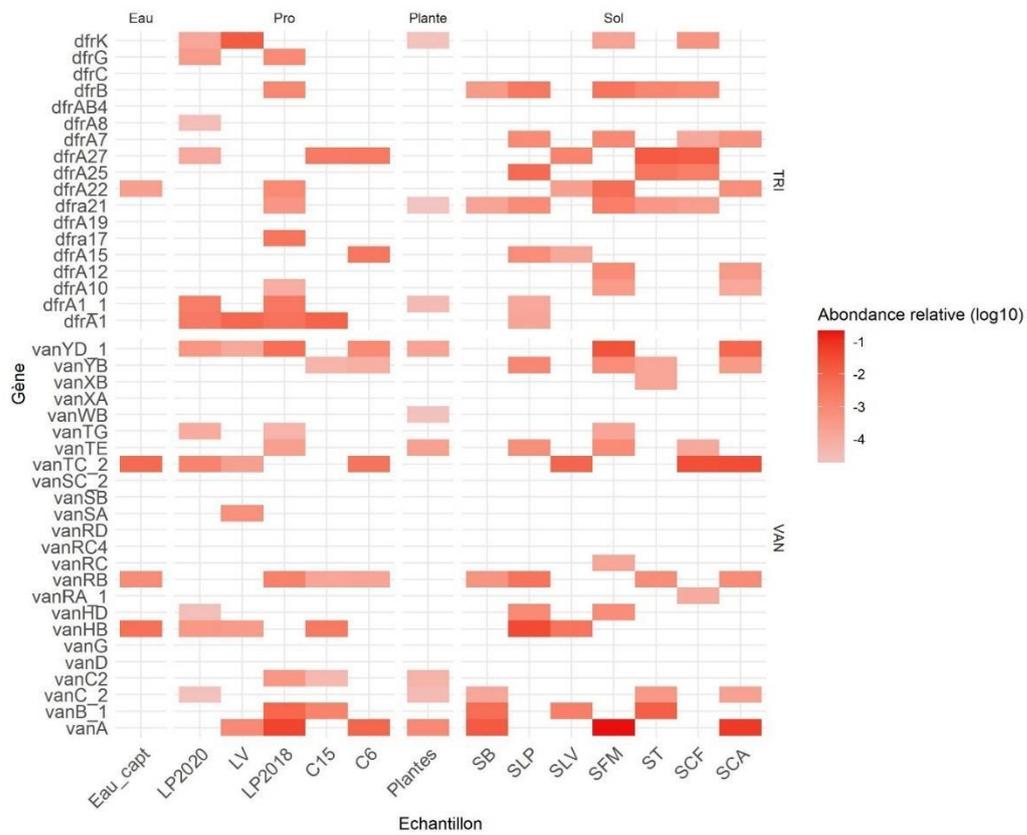
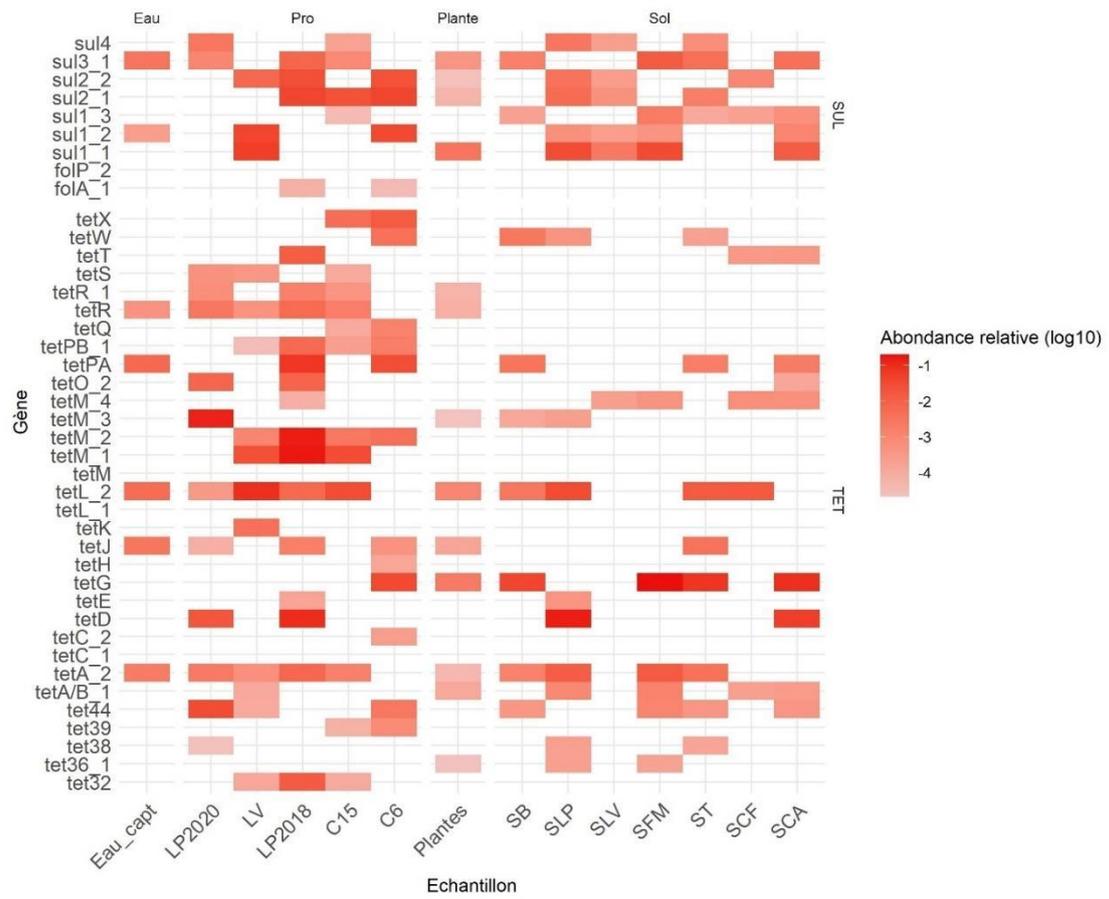
*Annexe 5 : Abondance relative des gènes ciblés (log10) par échantillon pour chaque famille d'antibiotiques. Le point noir indique la moyenne de l'abondance relative.*

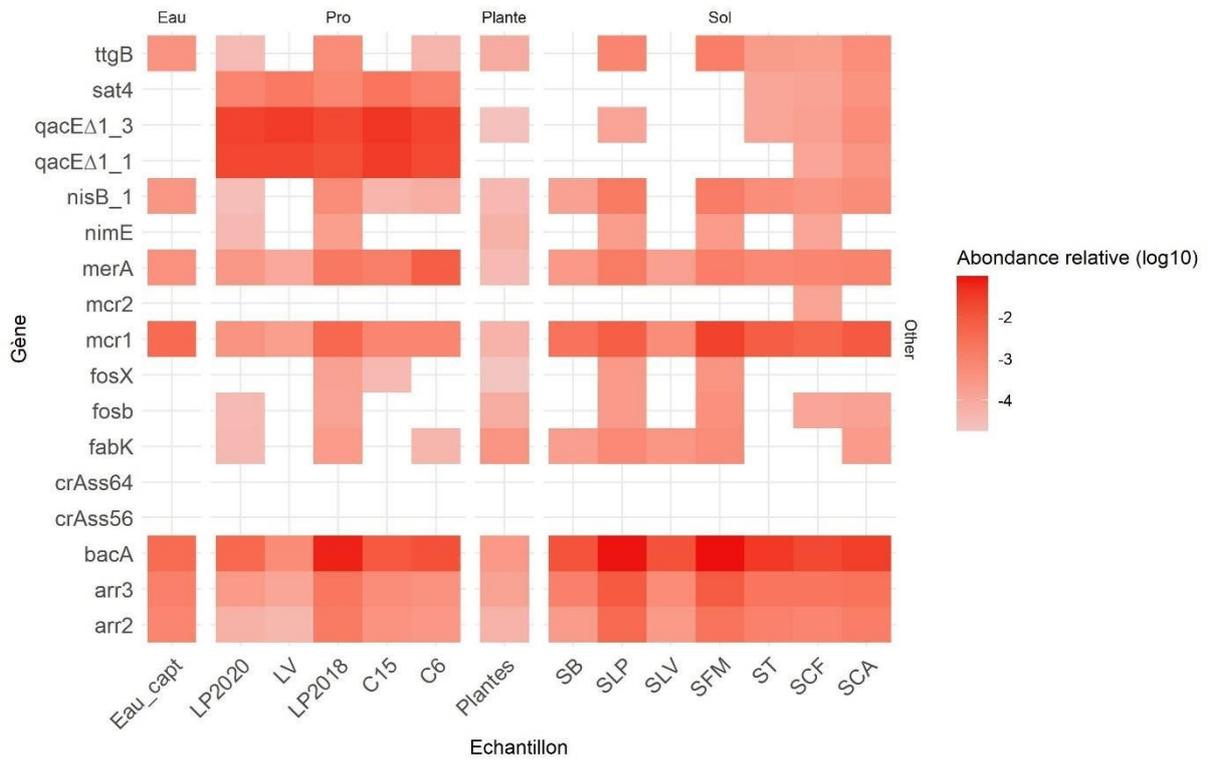


*Annexe 6 : Abondance relative des gènes ciblés (log10) pour chaque famille d'antibiotiques par matrice et par échantillon.*

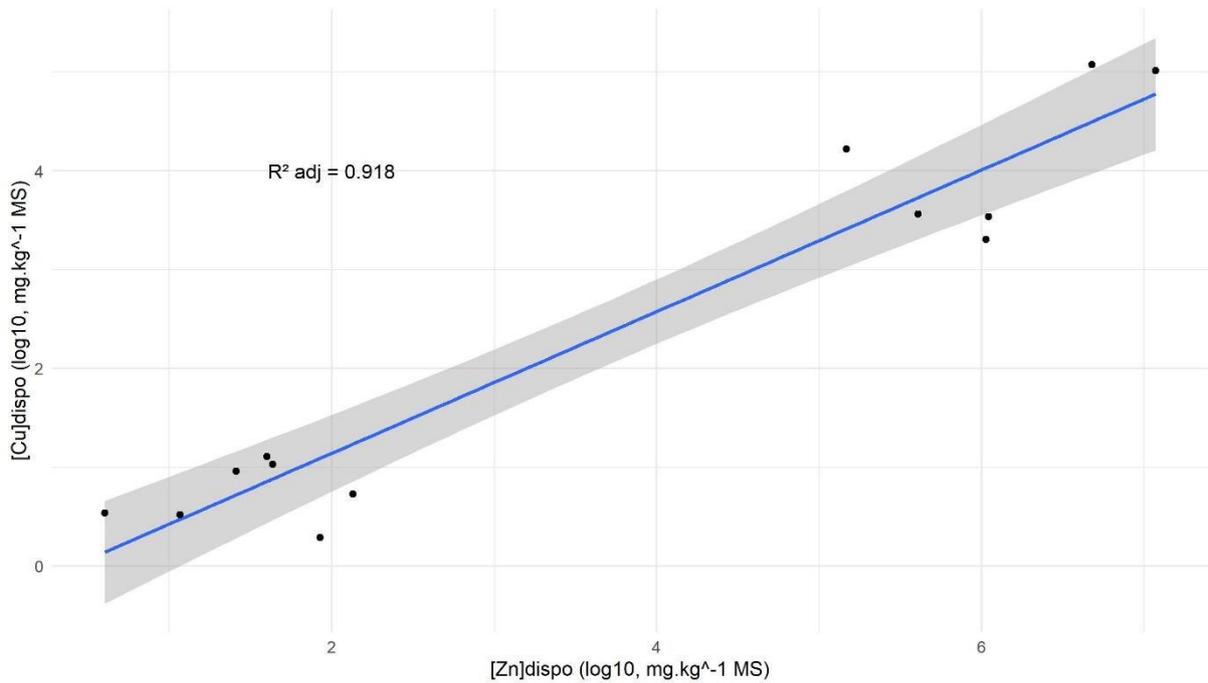




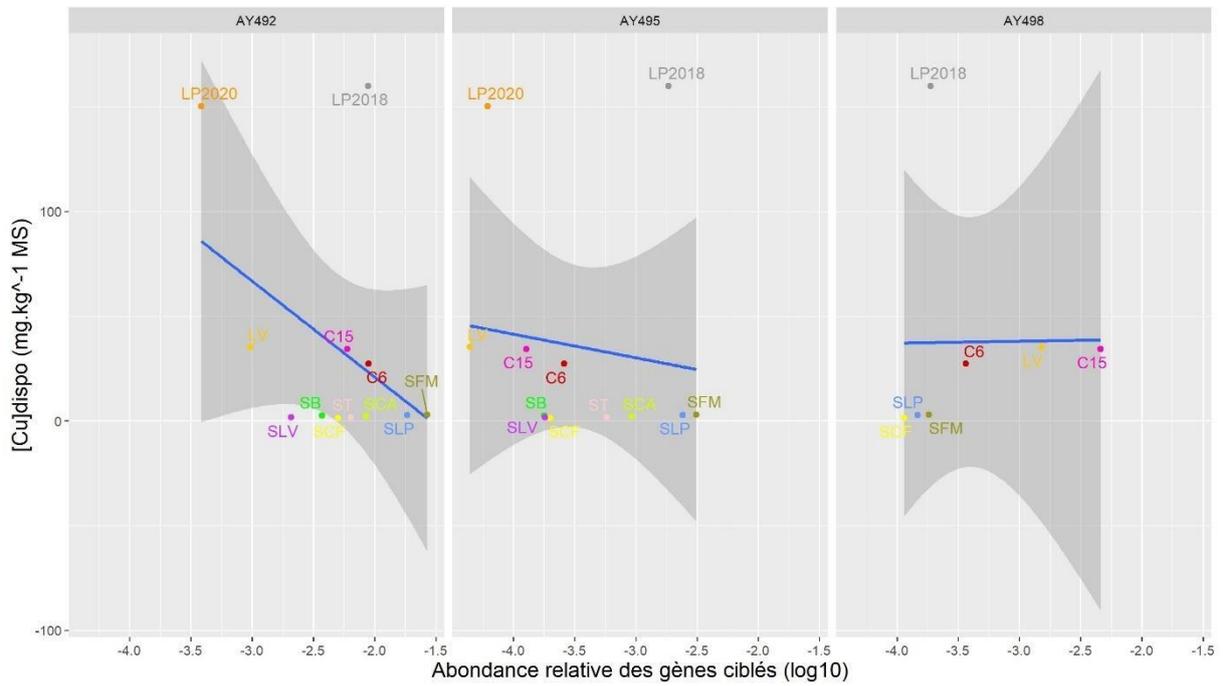




*Annexe 7 : Modèle linéaire entre les concentrations de cuivre et de zinc disponibles (log10, mg.kg<sup>-1</sup> MS).*



*Annexe 8 : Nuage de points entre la concentration en cuivre disponible ( $\text{mg.kg}^{-1}$  MS) et l'abondance relative des gènes ciblés : AY492, AY495 et AY498 ( $\log_{10}$ ).*



*Annexe 9 : Nuage de points entre la concentration en zinc disponible ( $\text{mg.kg}^{-1}$  MS) et l'abondance relative du gène AY493 ( $\log_{10}$ ).*

