

# Antibiorésistance des flores bactériennes autochtone et fécale dans les rivières du bassin de la Seine

Julien Passerat<sup>1</sup>, Adriana Anzil<sup>1</sup>, Pierre Servais<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles

\* personne à contacter : pservais@ulb.ac.be

## 1. Introduction

La présence de microorganismes pathogènes d'origine fécale dans les eaux de surface pose d'importants problèmes sanitaires quand ces eaux sont utilisées pour la production d'eau potable, pour l'activité nautique ou l'irrigation. Les maladies infectieuses causées par ces bactéries sont traitées depuis de nombreuses années grâce à l'emploi d'antibiotiques. Cependant, l'usage croissant et massif d'antibiotiques a induit une certaine résistance des bactéries envers ces substances. En effet, les antibiotiques sont utilisés en médecine humaine mais également intensivement en médecine vétérinaire et ont aussi été utilisés comme compléments alimentaires dans l'élevage. On rencontre couramment des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les milieux où ceux-ci sont utilisés mais également dans divers environnements naturels comme le milieu aquatique. La présence de bactéries pathogènes antibiorésistantes entraîne un risque sanitaire accru si les infections qu'elles causent ne peuvent pas être traitées par des antibiotiques. Ce travail sur l'antibiorésistance, s'est donc, dans un premier temps, intéressé à la présence de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques dans les eaux du bassin de la Seine.

Au cours de travaux menés dans le cadre du PIREN-Seine de 2005 à 2007, des souches d'*Escherichia coli* et d'entérocoques intestinaux ont été isolées d'échantillons de rivières du bassin, et leur résistance à divers antibiotiques a été testée. L'utilisation de ces deux groupes de bactéries comme indicateurs de contamination fécale est en effet recommandée dans diverses directives européennes de qualité des eaux. Ces mesures ont montré une présence significative de bactéries fécales antibiorésistantes (Passerat et Servais, 2008). Ainsi, 42 % des 214 isolats de *E. coli* provenant des échantillons d'eau de rivière étaient résistants à au moins un antibiotique sur les 16 testés. Pour les isolats d'entérocoques, 83 % des 146 isolats provenant des échantillons d'eau de rivières étaient résistants à au moins un antibiotique sur les 10 testés. La présence dans les rivières de souches antibiorésistantes de ces deux indicateurs fécaux montre que d'autres bactéries d'origine fécale antibiorésistantes, possiblement pathogènes, y sont potentiellement présentes. Un risque sanitaire est donc présent étant donné que les possibilités de traitement des infections causées par ces microorganismes s'en trouvent amoindries.

L'étude de l'antibiorésistance a montré que quatre sources de bactéries fécales caractérisées par des origines différentes des bactéries pouvaient être classées par taux de résistance décroissants : eaux usées hospitalières (bactéries fécales provenant de patients hospitalisés), eaux usées domestiques (bactéries fécales d'origine principalement humaine), rejets agricoles (bactéries fécales provenant des animaux d'élevage) et enfin ruisseaux forestiers (bactéries fécales provenant des animaux sauvages). L'analyse de ces résultats a indiqué que la source principale de bactéries entériques antibiorésistantes trouvées dans les rivières était les eaux usées domestiques.

La mise en évidence d'une population de bactéries entériques antibiorésistantes dans l'environnement aquatique pose la question de la possibilité de dissémination de l'antibiorésistance vers les bactéries autochtones du milieu naturel. On peut en effet imaginer sans peine le schéma suivant : des bactéries entériques se retrouvent en présence de quantités non négligeables d'un antibiotique dans le tube digestif d'un patient ou d'un animal traité aux antibiotiques, certaines d'entre elles acquièrent une antibiorésistance et sont excrétées, elles rejoignent ensuite le milieu aquatique

naturel via les eaux usées et s'y retrouvent en présence des bactéries autochtones auxquelles elles sont susceptibles de transférer leur antibiorésistance par échange de matériel génétique. Dans un tel schéma, le milieu aquatique représenterait alors une source de dissémination de l'antibiorésistance. Des expériences ont été conduites en 2008 pour investiguer la vraisemblance d'un tel schéma. A cet effet, sur certains échantillons issus de rivières différemment contaminées du bassin, nous avons comparé le niveau d'antibiorésistance d'un type de bactéries entériques (*E. coli*) et de la flore autochtone cultivable. Par ailleurs, une expérience de laboratoire a été conduite pour mettre en évidence l'échange d'antibiorésistance entre une bactérie *E. coli* multirésistante et des bactéries autochtones.

## 2. Méthodes

### 2.1. Échantillonnage

L'analyse parallèle de l'antibiorésistance de *E. coli* et de la flore autochtone a été réalisée sur des échantillons d'eau prélevés à deux périodes de l'année 2008 (juin et septembre) dans le sous-bassin de l'Orge (un prélèvement en amont du bassin dans la Renarde à Villeconin et un prélèvement en aval dans l'Orge à Viry-Châtillon) et dans la Seine (Villeneuve-Saint-Georges, Seine 1 ; Epinay-sur-Seine, Seine 2 ; Triel-sur-Seine, Seine 3).

### 2.2. Détermination de l'antibiorésistance sur milieux gélosés additionnés d'antibiotiques

Sur ces échantillons de rivières, la résistance à trois antibiotiques (amoxicilline, tétracycline et acide nalidixique) des *E. coli* et des bactéries autochtones cultivables a été testée en parallèle par la méthode de mise en culture sur milieux gélosés additionnés ou non d'un antibiotique. Les *E. coli* ont été cultivés sur une gélose sélective Chromocult Coliform pendant 24 h à 36 °C. Les bactéries autochtones ont été cultivées sur une gélose R<sub>2</sub>A pendant 7 jours à 20 °C. Les géloses additionnées d'un des trois antibiotiques contenaient respectivement 4 mg/L d'amoxicilline, 4 mg/L de tétracycline ou 8 mg/L d'acide nalidixique. Ces concentrations sont les concentrations critiques basses des trois antibiotiques selon le CA-SFM (CA-SFM, 2008). Une souche dont la croissance est inhibée à la concentration critique basse d'un antibiotique est considérée comme sensible à cet antibiotique. Le rapport entre le nombre de colonies obtenues sur la gélose additionnée de l'antibiotique et le nombre de colonies obtenues sur la gélose sans antibiotique donne le taux de résistance de *E. coli* ou des bactéries autochtones cultivables à l'antibiotique.

### 2.3. Echange d'antibiorésistance entre *E. coli* et bactéries autochtones

L'aptitude de *E. coli* à transférer ses gènes de résistance à la flore bactérienne aquatique a été étudiée en microcosme. La souche *E. coli* JP-EC-0248, isolée au cours des travaux sur l'antibiorésistance effectués en 2007, a été retenue pour sa résistance à l'amoxicilline, l'acide nalidixique et la tétracycline. Il s'agit d'une souche isolée dans une eau usée hospitalière. Cette souche a été cultivée dans du bouillon Luria Bertani une nuit à 36 °C sous agitation (220 rpm) et en conditions d'oxygène non limitantes. La culture a été lavée trois fois puis resuspendue dans du Ringer pour obtenir l'inoculum de *E. coli*. La concentration de cet inoculum a été estimée à  $1,0 \times 10^{13}$  bactéries/L par comptage direct au microscope à épifluorescence après marquage au DAPI.

Par ailleurs, la population de bactéries autochtones a été obtenue en incubant 3 litres d'eau minérale d'Evian enrichie en extrait de levure ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) pendant 3 jours à 20 °C. À l'issue de cette incubation, la concentration de la population bactérienne totale (bactéries cultivables et non cultivables) a été estimée à  $6,3 \times 10^9$  bactéries/L, également par comptage direct en microscopie. Les 3 litres d'eau minérale contenant la flore autochtone ont été répartis dans trois microcosmes de 1 L. Le premier microcosme a étéensemencé avec l'inoculum de *E. coli* de sorte que la population de *E. coli* représente 1 % de la population totale. Le deuxième microcosme a étéensemencé de sorte que la population de *E. coli* représente 10 % de la population totale. Le troisième microcosme n'a subi aucun

ajout de *E. coli* et a été utilisé comme témoin. Les microcosmes ont été incubés 4 jours à 20 °C à l'obscurité et sous agitation magnétique.

Durant cette incubation, les concentrations de bactéries autochtones résistantes à l'amoxicilline, à l'acide nalidixique ou à la tétracycline ont été suivies. Pour cela, la méthode de mise en culture sur milieu R<sub>2</sub>A additionné d'un antibiotique a été utilisée telle que décrite ci-dessus. De plus, le milieu R<sub>2</sub>A a été additionné de 4-méthyl-umbelliféryl β-D-glucuronide (MU-Glu, 55 mg L<sup>-1</sup>) ; cette modification permet de distinguer sur la même gélose les colonies de bactéries autochtones des colonies de *E. coli*. Le MU-Glu est un substrat fluorogénique de la β-D-glucuronidase, une enzyme fortement spécifique de *E. coli*. Ont été dénombrées comme *E. coli* les colonies présentant un aspect typique de *E. coli* ainsi qu'une fluorescence bleue aux UV (caractéristique du méthyl-umbelliférone, produit de l'hydrolyse du MU-Glu par la β-D-glucuronidase). A titre de contrôle, une dizaine de colonies présomptives de *E. coli* ainsi qu'une dizaine de colonies présomptives de bactéries autochtones ont, par la suite, été isolées sur gélose sélective Chromocult Coliform. Seules les colonies présomptives de *E. coli* ont pu y être cultivées, démontrant ainsi la capacité de notre approche à distinguer correctement les *E. coli* des bactéries autochtones. La concentration en bactéries autochtones cultivables résistantes à un antibiotique donné a ainsi été estimée par le nombre de colonies autres que *E. coli* dénombrées sur la gélose R<sub>2</sub>A-MU-Glu additionnée de l'antibiotique considéré. Cette concentration a été mesurée immédiatement après l'ensemencement des microcosmes par *E. coli* (T0), puis quotidiennement.

### 3. Résultats

#### 3.1. Antibiorésistance comparée des flores fécale et autochtone

La résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline et à l'acide nalidixique a été mesurée en parallèle pour *E. coli* et les bactéries autochtones en 5 stations du bassin de la Seine, à deux reprises (juin et septembre 2008). Les concentrations en *E. coli* montrent que ces 5 stations présentent des niveaux de contamination fécale contrastés (Figure 1). L'écart entre les concentrations minimale et maximale mesurées s'étend sur 3 ordres de grandeur. La Renarde, en zone rurale en amont du bassin de l'Orge, est la moins contaminée. En aval du bassin, l'Orge peu avant sa confluence avec la Seine présente une concentration en *E. coli* supérieure d'un ordre de grandeur. Les trois stations dans la Seine montrent une importante augmentation de la contamination fécale entre Villeneuve-Saint-Georges (Seine 1) et Epinay-sur-Seine (Seine 2), puis une légère diminution à Triel-sur-Seine (Seine 3). Quatre des cinq stations présentent des concentrations en *E. coli* très semblables en juin et en septembre, indiquant que les situations de contamination fécale étaient comparables d'une campagne à l'autre. La station de Epinay-sur-Seine fait exception, la concentration mesurée en juin dépassant de 1,5 ordres de grandeur celle mesurée en septembre.

Les concentrations en bactéries autochtones cultivables ne sont pas corrélées à celles en *E. coli* (Figure 1). Les concentrations mesurées dans la Renarde et l'Orge sont relativement semblables et stables d'une campagne à l'autre. Les concentrations trouvées dans la Seine sont en général plus faibles et varient d'un ordre de grandeur entre les stations, avec une tendance à l'augmentation vers l'aval. Si les concentrations de juin et septembre sont semblables à Triel-sur-Seine, elles diffèrent d'un ordre de grandeur à Villeneuve-Saint-Georges et Epinay-sur-Seine. Enfin les bactéries autochtones cultivables sont de 200 à 100 000 fois plus nombreuses que *E. coli* cultivables.

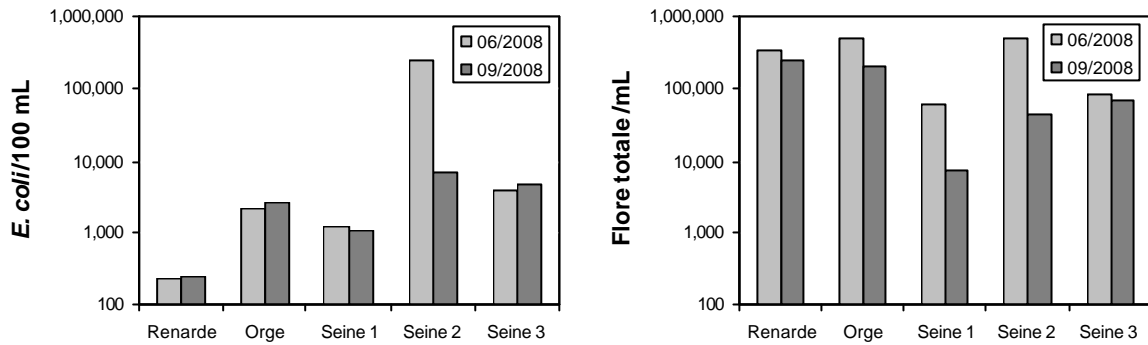


Figure 1 : Concentration en *E. coli* et en flore totale dans les échantillons analysés pour étudier l'antibiorésistance de ces deux populations. Les concentrations sont exprimées par mL pour la flore totale et par 100 mL pour *E. coli*.

En ce qui concerne la résistance de *E. coli* aux trois antibiotiques, on trouve avec la méthode de gélose additionnée d'antibiotique que *E. coli* présente les taux de résistance les plus élevés vis-à-vis de l'amoxicilline et les plus faibles vis-à-vis de l'acide nalidixique (Figure 2). Les taux moyens de résistance aux trois antibiotiques sont assez semblables aux taux moyens de résistance mesurés précédemment avec la méthode standard de diffusion en gélose sur des échantillons de rivière du bassin (Passerat et Servais, 2008). Les taux de résistances obtenus en juin et en septembre sont très similaires, comme noté ci-dessus à propos de la concentration de *E. coli*. De plus, le profil de variation des taux d'une station à l'autre est le même pour les trois antibiotiques. Il révèle que la station présentant les plus faibles taux de résistance est celle sur la Renarde, peu contaminée et en zone rurale. Ce résultat est cohérent avec l'observation antérieure que les *E. coli* trouvés dans les petits cours d'eau de zones agricoles sont très faiblement antibiorésistants (Passerat et Servais, 2008). Les taux de résistance tendent ensuite à augmenter avec le niveau de contamination fécale de la rivière. D'ailleurs, si l'on ne tient pas compte de la station de Epinay-sur-Seine, on trouve pour l'amoxicilline et l'acide nalidixique une corrélation entre le taux de résistance et la concentration en *E. coli*.

Concernant l'antibiorésistance des bactéries autochtones, les gammes de taux de résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline et à l'acide nalidixique sont du même ordre de grandeur que celles de *E. coli* (Figure 2). Sur les deux campagnes, le taux de résistance moyen à l'acide nalidixique est le plus élevé, suivi de celui à l'amoxicilline puis à la tétracycline. De plus, la résistance des bactéries autochtones n'est pas corrélée à celle de *E. coli*. En fait, alors qu'une tendance nette pouvait être établie pour *E. coli* du fait de la ressemblance des campagnes de juin et septembre et du fait du même profil de variation entre stations obtenu avec les trois antibiotiques, aucune tendance ne se dégage pour les bactéries autochtones. Les taux mesurés en juin sont très différents de ceux obtenus en septembre, et le profil de variation entre les stations obtenu pour un antibiotique ne s'observe pas avec les deux autres. Pour la résistance à un antibiotique donné, l'amplitude des écarts, tant entre les deux campagnes qu'entre les stations d'un même cours d'eau comme la Seine, peut être grande. Ainsi à Epinay-sur-Seine, 32 % des bactéries autochtones étaient résistantes à la tétracycline en juin, alors que moins de 0,1 % le sont en septembre. Les taux de résistances à l'acide nalidixique sont nettement plus élevés en septembre qu'en juin, et se rapprochent des 50 % à Trieu-sur-Seine.

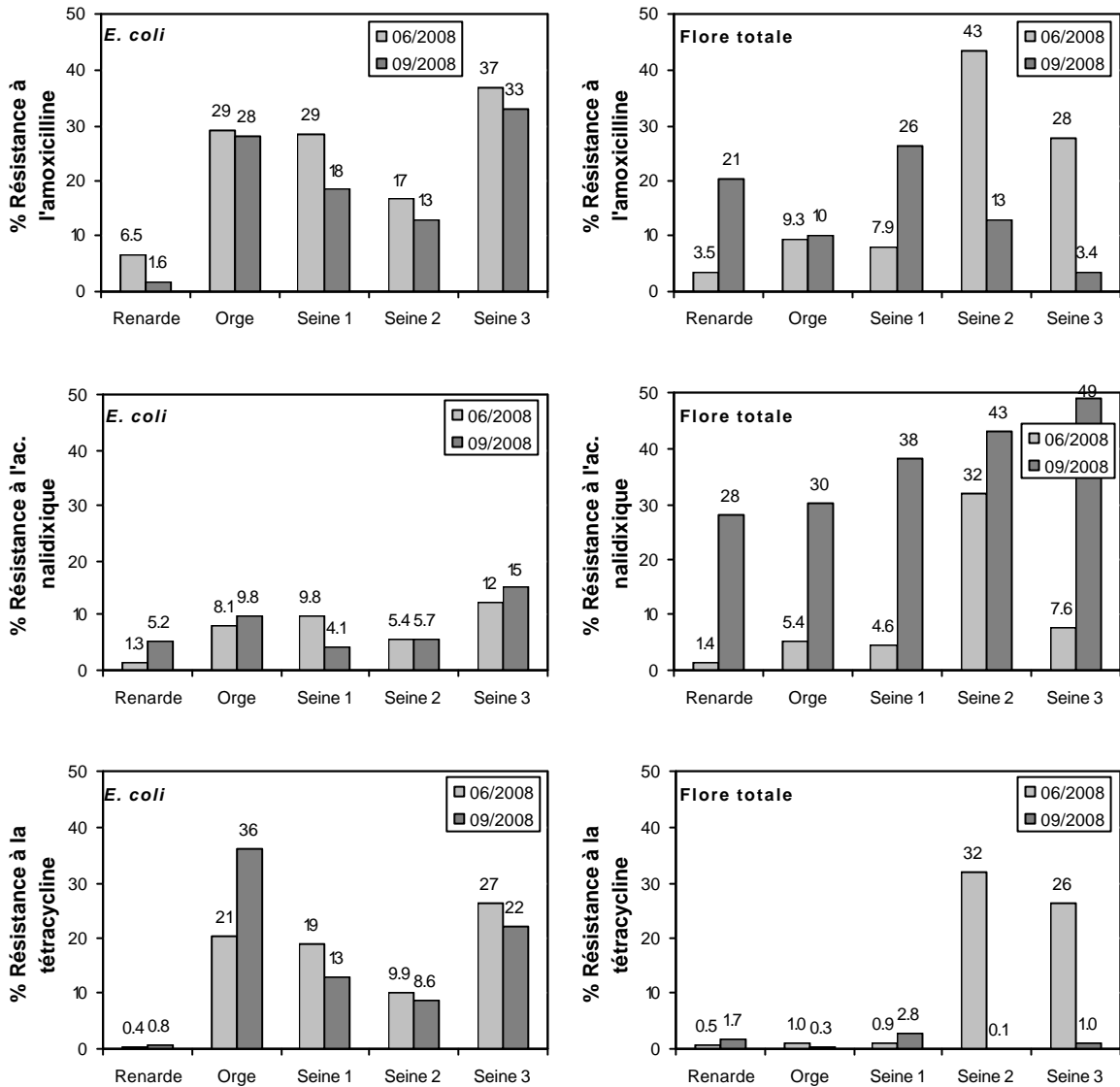


Figure 2 : Pourcentages de résistances des *E. coli* (à gauche) et de la flore totale (à droite) à l'amoxicilline, l'acide nalidixique et la tétracycline, respectivement.

### 3.2. Echange d'antibiorésistance entre *E. coli* et bactéries autochtones

Le tableau 1 donne la composition de la population de bactéries autochtones présente initialement dans les microcosmes. Les bactéries cultivables représentent en moyenne 13 % de la population totale. Parmi ces bactéries cultivables, 0,09 % sont résistantes à la tétracycline, 24 % à l'amoxicilline et 52 % à l'acide nalidixique. Les taux de résistances observés dans cette communauté microbienne aquatique n'ayant a priori jamais été en contact avec des bactéries fécales (bactéries autochtones d'une source d'eau minérale pour consommation humaine) sont donc très semblables à ceux qui peuvent être observés dans une rivière recevant des eaux usées (par exemple la Seine à Triel-sur-Seine en septembre 2008 : < 0,1 %, 13 % et 43 % pour les résistances à la tétracycline, l'amoxicilline et l'acide nalidixique respectivement).

Dans les deux microcosmes contenant des *E. coli*, le ratio initial de *E. coli* cultivables par bactérie autochtone cultivable était de 4 % et 40 % respectivement. Pour rappel, ce ratio mesuré en rivières variait entre 10 ppm et 0,5 %.

Tableau 1 : Abondance initiale moyenne des bactéries autochtones dans les microcosmes et pourcentages de résistance aux 3 antibiotiques.

Concentration des bactéries autochtones			% bactéries cultivables résistantes		
Population totale (L <sup>-1</sup> )	Population cultivable (UFC <sup>†</sup> L <sup>-1</sup> )	% Cultivables	Amoxicilline	Acide nalidixique	Tétracycline
6,3 x 10 <sup>9</sup>	8,3 x 10 <sup>8</sup>	13 %	24 %	52 %	0,09 %

<sup>†</sup> UFC : Unité Formant Colonie

La figure 3 montre l'évolution au cours du temps des concentrations de bactéries autochtones cultivables antibiorésistantes pour les trois antibiotiques testés. Deux types de résultats pourraient être interprétés en faveur d'un transfert de gènes de résistance de *E. coli* vers les bactéries autochtones. Le premier correspond au cas où à l'intérieur d'un même microcosme contenant des *E. coli*, la concentration des bactéries autochtones antibiorésistantes augmente avec le temps. Or ce cas ne s'est jamais présenté dans nos expériences. La concentration au jour 0, c'est-à-dire immédiatement après l'ajout de *E. coli* dans les microcosmes, et donc avant tout transfert possible de gènes, est systématiquement supérieure à celle observée les jours suivants. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la source de carbone, constituée par l'apport d'extrait de levure, est progressivement consommée et que son épuisement entraîne la perte de cultivabilité d'une partie de la population autochtone. Dans ces conditions, seul un transfert de gènes qui s'effectuerait à un taux supérieur au taux de perte de cultivabilité pourrait conduire au premier type de résultat évoqué.

Le second type de résultat possible peut quant à lui s'observer malgré cette diminution globale du nombre de bactéries cultivables. Il s'agit du cas où la concentration des bactéries autochtones antibiorésistantes dans les microcosmes contenant des *E. coli* est supérieure à celle mesurée dans le microcosme témoin sans *E. coli*, lorsque la comparaison est faite au même jour d'incubation. La figure 2 montre que ce cas se présente au jour 2 pour l'amoxicilline, aux jours 1, 2, et 3 pour l'acide nalidixique. Cependant, ce résultat s'observe également au jour 0 pour l'amoxicilline, alors qu'aucun transfert possible de gènes ne permet de le justifier. Par ailleurs, le résultat inverse (une concentration dans les microcosmes avec *E. coli* inférieure à celle du microcosme témoin) s'observe aux jours 1, 3 et 4 pour l'amoxicilline, aux jours 0, 3 et 4 pour l'acide nalidixique. Puisque à nouveau aucun effet lié à la présence de *E. coli* ne permet de justifier ces résultats, les différences observées par rapport au témoin sont interprétables comme des variations aléatoires liées à la précision de la mesure. D'après ces résultats, le coefficient de variation de la mesure varie alors entre 9 % et 44 %. Ceci montre que les résultats qui vont dans le sens d'un transfert de gène ne sont en fait pas significativement différents du témoin.

Les résultats de résistance permettent de tirer les mêmes conclusions pour les trois antibiotiques (Figure 3). Les résultats de résistance à la tétracycline mettent également en évidence la limite de sensibilité de la méthode utilisée. Dans celle-ci, le ratio de *E. coli* introduits par bactérie autochtone cultivable résistante à l'antibiotique testé est déterminant. Il doit être idéalement inférieur ou égal à 1:1. Lorsqu'on approche de 10:1, la précision (faible nombre de colonies de bactéries autochtones dénombrables du fait de la présence majoritaire de *E. coli*) et la fiabilité (risque de compétition entre *E. coli* et les bactéries autochtones pour l'accès aux nutriments lors de la culture, en défaveur des dernières du fait du taux de croissance élevé de *E. coli*) diminuent. Du fait du très faible taux de résistance à la tétracycline parmi la population autochtone initiale, l'ajout de *E. coli* dans les microcosmes a conduit à des ratios de 35:1 et de 430:1 dans les microcosmes contenant respectivement 4 % et 40 % de *E. coli*. Dans ce dernier, aucune colonie de bactéries autochtones n'a pu être dénombrée.

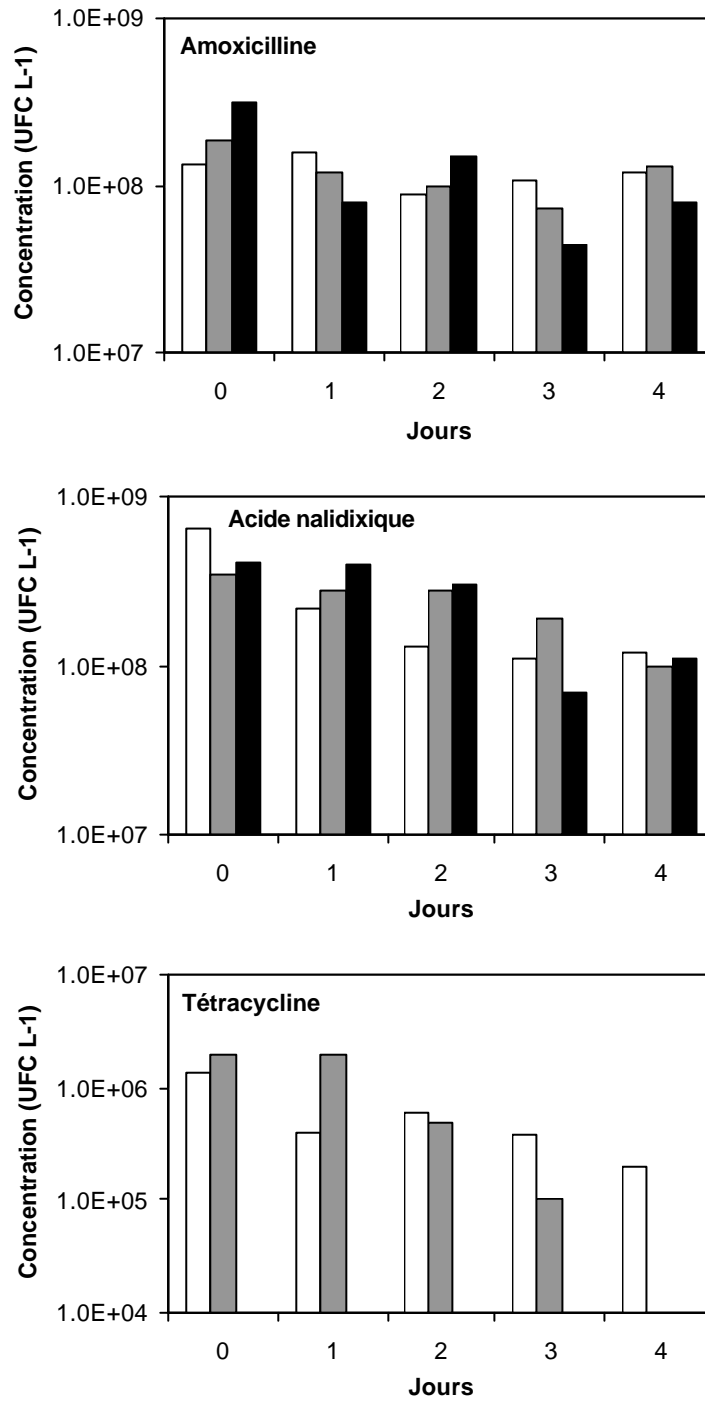


Figure 3 : Fluctuations au cours de l'expérience en microcosmes (blanc : flore autochtone seule ; gris : flore autochtone + 4 % de *E. coli* ; noir : flore autochtone + 40 % de *E. coli*) des abondances en bactéries autochtones cultivables résistantes à l'amoxicilline, la tétracycline et l'acide nalidixique, respectivement.

## 4. Discussion

Les mesures effectuées sur des échantillons de la Seine et du bassin de l'Orge ont mis en évidence des niveaux de contamination fécale et des taux d'antibiorésistance de *E. coli* à la fois contrastés entre les stations et stables entre les deux campagnes. Pour les trois antibiotiques testés, les fluctuations du niveau de résistance de *E. coli* entre les stations ont présenté des tendances similaires. Ceci a permis de comparer l'antibiorésistance des bactéries autochtones en présence de niveaux de contamination en bactéries fécales antibiorésistantes variés et reproductibles dans le temps. Aucune relation n'a pu être établie entre l'antibiorésistance des bactéries autochtones et celle de *E. coli*. D'une part, les trois antibiotiques ont donné des réponses très différentes, montrant que contrairement à *E. coli* les résistances de la flore autochtone à l'amoxicilline, la tétracycline et l'acide nalidixique sont clairement indépendantes entre elles. D'autre part, les variations observées en une même station entre les deux campagnes dépassent celles observées entre les stations pour une même campagne. Ceci suggérerait que l'antibiorésistance de la flore autochtone est au moins autant sensible aux variations temporelles qu'aux conditions locales. Par ailleurs, le nombre de bactéries autochtones excède en moyenne de près de quatre ordres de grandeur celui des *E. coli*, alors que les taux de résistance entre les deux flores sont du même ordre de grandeur. Donc, l'ensemble de nos résultats suggère que l'antibiorésistance, du moins aux trois antibiotiques testés, est largement répandue dans la flore autochtone, et qu'elle est indépendante du niveau d'antibiorésistance de la flore fécale avec laquelle elle cohabite. Ces résultats tendraient à suggérer que les niveaux de résistance mesurés sur la flore autochtone ne résultent pas majoritairement d'un transfert d'antibiorésistance de la flore fécale à la flore autochtone. Ce résultat devra être confirmé sur un nombre d'échantillons plus élevé et sur la résistance à d'autres antibiotiques.

Par ailleurs, l'expérience en microcosme n'a pas permis de mettre en évidence d'éventuels transferts de gènes d'antibiorésistance de *E. coli* vers les bactéries autochtones. Elle a, par contre, confirmé que les résistances à l'amoxicilline et à l'acide nalidixique peuvent être très répandues dans la flore aquatique, et ceci en absence de toute contamination fécale. Ce résultat montre que les résistances observées sont très probablement présentes naturellement chez certaines bactéries aquatiques. En fait, d'autres études ont également rapporté des taux de résistance élevés parmi les communautés bactériennes autochtones du milieu aquatique, et ceci même en absence de contamination fécale (Jones et al., 1986 ; Magee et Quinn, 1991, Boon et Cattanaach, 1999). Il a en particulier été montré que certaines espèces de *Pseudomonas*, bactéries couramment rencontrées dans les milieux aquatiques, peuvent résister naturellement à un grand nombre d'antibiotiques (Jones et al., 1986).

L'expérience de transfert de gène a également mis en évidence les difficultés méthodologiques inhérentes à la mise en évidence d'un tel phénomène. La précision faible de la mesure en culture du nombre de bactéries autochtones résistantes impose que le taux de transfert soit suffisant pour qu'une augmentation puisse être reliée à la présence de *E. coli* antibiorésistants. Plus le taux de résistance naturelle à l'antibiotique testé est élevé dans la population autochtone, et plus le taux de transfert doit être élevé pour être détectable. Dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la durée d'incubation ne permet pas d'augmenter significativement la sensibilité du test, car en microcosme fermé l'appauvrissement en nutriments conduit à une perte progressive de la cultivabilité de *E. coli* et de la flore autochtone, et potentiellement à une diminution de ce taux de transfert. L'augmentation du ratio de *E. coli* introduits n'est pas non plus un moyen d'augmenter la sensibilité, car on a vu qu'au delà d'un ratio de 1:1, c'est lui qui devient limitant et fixe le seuil de sensibilité. Une solution possible pour s'affranchir du caractère limitant de ce ratio serait de dénombrer les bactéries autochtones résistantes sur une gélose sur laquelle ne pousse pas *E. coli*. La seule solution pratique envisagée est d'ajouter au milieu gélosé de culture un antibiotique auquel *E. coli* est sensible. Par exemple, en utilisant une souche de *E. coli* sensible à l'acide nalidixique, on peut étudier sans limitation le transfert de la résistance à la tétracycline en dénombrant les bactéries autochtones résistantes à la tétracycline sur un milieu contenant de l'acide nalidixique. Cela revient à étudier ce phénomène sur une sous-population des bactéries autochtones cultivables, celles qui résistent déjà à l'acide nalidixique. Compte



tenu du fort taux de résistance naturelle à l'acide nalidixique (près de 50 %), cela ne constituerait pas une restriction trop importante de la population étudiée.

L'existence de résistances naturelles aux antibiotiques chez les bactéries aquatiques soulève le problème suivant. Lors d'études qui essaient de corréliser l'évolution du taux de résistance chez la flore autochtone avec la présence de bactéries fécales antibiorésistantes pour mettre en évidence d'éventuels transferts, il y a un risque que les évolutions observées ne soient en fait pas liées à un transfert mais à la dynamique propre des communautés bactériennes. Si une espèce naturellement résistante devient dominante dans l'écosystème (ou dans le microcosme), le taux de résistance global de la communauté en sera augmenté d'autant.

Par ailleurs, vu le niveau élevé de résistance observé chez les bactéries autochtones dans certains échantillons, on peut s'attendre à ce que les transferts de résistance entre bactéries autochtones dominent les transferts des bactéries fécales vers les bactéries autochtones si les gènes de résistance naturellement présents chez ces dernières sont transférables.

L'occurrence et l'origine de la résistance des bactéries de la flore autochtone nécessitent à ce stade des investigations complémentaires.

## 5. Références

Boon, P.I., & M. Cattanach. 1999. Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. *Letters in Applied Microbiology* 28:164-168.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2008. 49 p.

Jones, J.G., S. Gardener, B.M. Simon & R.W. Pickup. 1986. Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the English Lake District. *Journal of Applied Bacteriology* 60:443-453

Magee, A.M., & J.P. Quinn. 1991. Antibiotic resistance in the bacteria of a remote upland river catchment. *Letters in Applied Microbiology* 13:145-149.

Passerat, J & Servais, P. 2008. Occurrence et origines des bactéries fécales antibiorésistantes (*E. coli* et entérocoques) dans le bassin de la Seine. Rapport PIREN-Seine 2007. Février 2008.