

**Antibiorésistance des coliformes par l'étude de concentration minimale inhibitrice (CMI) :
Application à la Seine et aux rejets hospitaliers.**

Sophie Haenn, Heberte Accrombessi et Laurent Moulin^{^*} .

CRECEP, 144 Avenue Paul Vaillant Couturier, 75014 Paris/

*[*laurent.moulin@crecep.fr](mailto:laurent.moulin@crecep.fr)*

I- Contexte et projets en cours

Depuis plusieurs années, l'utilisation intensive des antibiotiques en médecine humaine ou animale et comme agent prophylactique dans les élevages animaux est à l'origine de l'augmentation de l'antibiorésistance bactérienne. L'émergence de bactéries présentant des résistances, parfois multiples, aux antibiotiques est une préoccupation majeure de santé publique.

Si de nombreuses études ont montré l'importance des réservoirs humains et animaux dans la sélection de ces bactéries, peu de travaux ont été initiés sur le devenir des bactéries antibiorésistantes, et des gènes correspondants, dans les environnements aquatiques et telluriques.

Le thème antibiotique a été initié en 2007 et poursuivi en 2008. Dans ce programme, nous proposons de :

- Déterminer la résistance des coliformes isolés selon la méthode normative à des antibiotiques appartenant à 4 classes d'antibiotiques différentes
- Identifier des bactéries résistantes aux antibiotiques les plus présents.
- Caractériser moléculaire la résistance à certains antibiotique (Quinolones, Tétracyclines, bêta-lactames)
- Effet des concentrations observées sur la diffusion de la résistance.

II- Résultats

Afin de compléter les études de 2007/08, des prélèvements supplémentaires en Seine ainsi qu'au niveau d'effluents d'un hôpital de l'AH-HP ont été réalisés. Seules les bactéries identifiées comme coliformes selon la méthode normée (NF EN ISO 9308-1) ont été étudiées.

2.1. Etudes de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Au total 135 souches ont été analysées d'un point de vue de leur résistance aux 4 antibiotiques sélectionnés lors des précédentes études :

- ampicilline (bêta-lactames),
- triméthoprim (pyrimidine),
- tétracycline (cycline),
- acide nalidixique (Fluoroquinolones).

Des CMI ont été réalisées sur la totalité des souches. Les 319 souches isolées à partir des deux campagnes ont été utilisées pour l'obtention des figures 1 à 4.

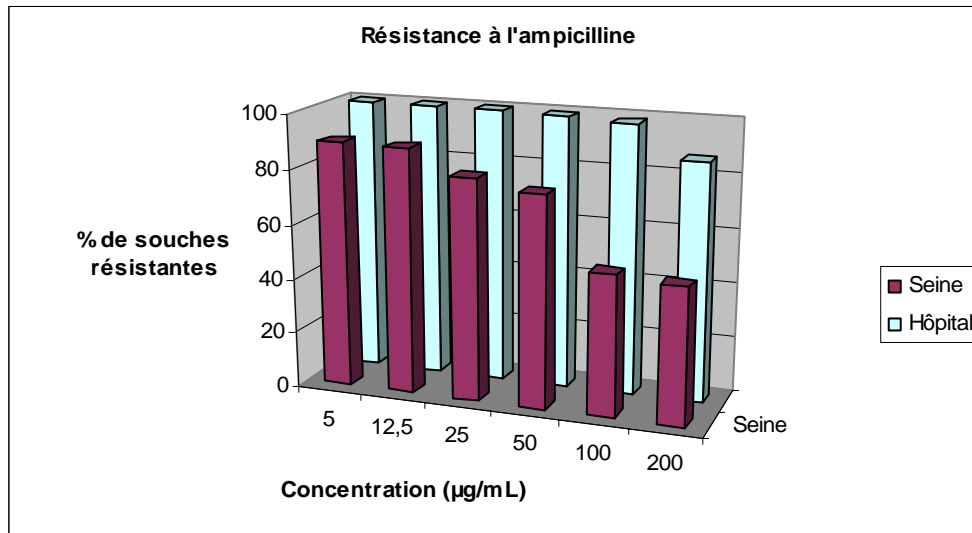


Figure 1 : Comparaison des pourcentages de coliformes résistants à l'ampicilline en Seine et en effluents d'hôpitaux.

Dans le cas de l'ampicilline, de l'acide nalidixique et de la tétracycline, on peut observer une différence importante tant au niveau du pourcentage de résistance qu'au niveau de résistance. Les coliformes issus des effluents d'hôpitaux sont plus souvent résistants, mais également résistants à des concentrations plus importantes d'antibiotiques (Figures 1, 2 et 3). Par exemple, seuls 40% des coliformes isolés en Seine sont résistants, contre plus de 80% pour ceux isolés à partir d'effluents d'hôpitaux.

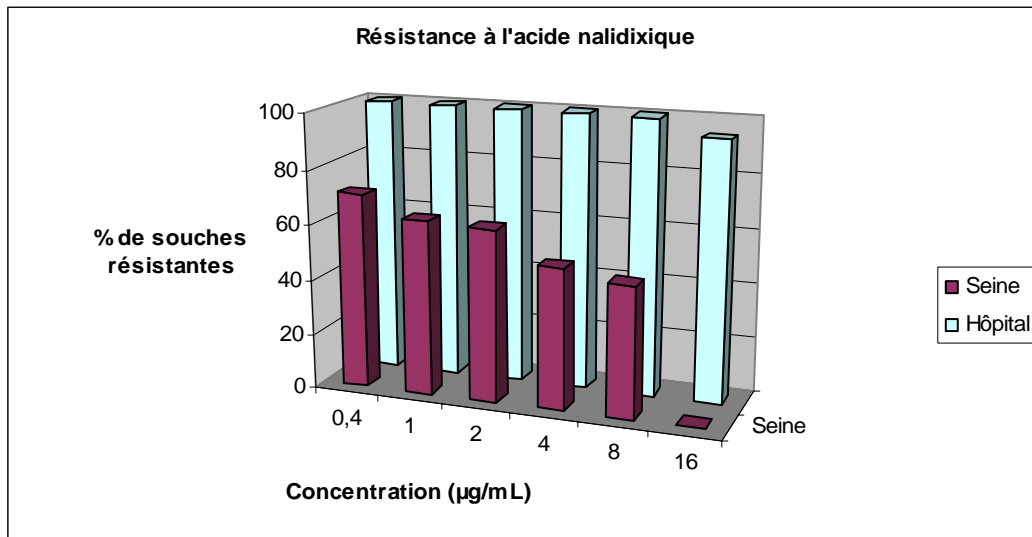


Figure 2 : Comparaison des pourcentages de coliformes résistants à l'acide nalidixique en Seine et en effluents d'hôpitaux.

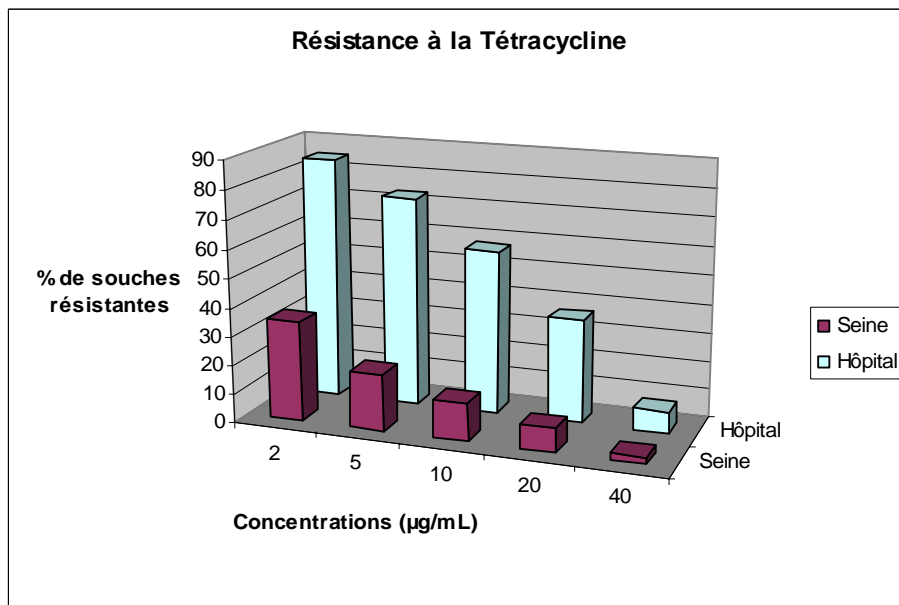


Figure 3 : Comparaison des pourcentages de coliformes résistants à la tétracycline en Seine et en effluents d'hôpitaux.

En ce qui concerne la résistance au triméthoprime, la différence de résistance entre les deux provenances des coliformes est beaucoup moins importante. Les deux profils sont très proches.

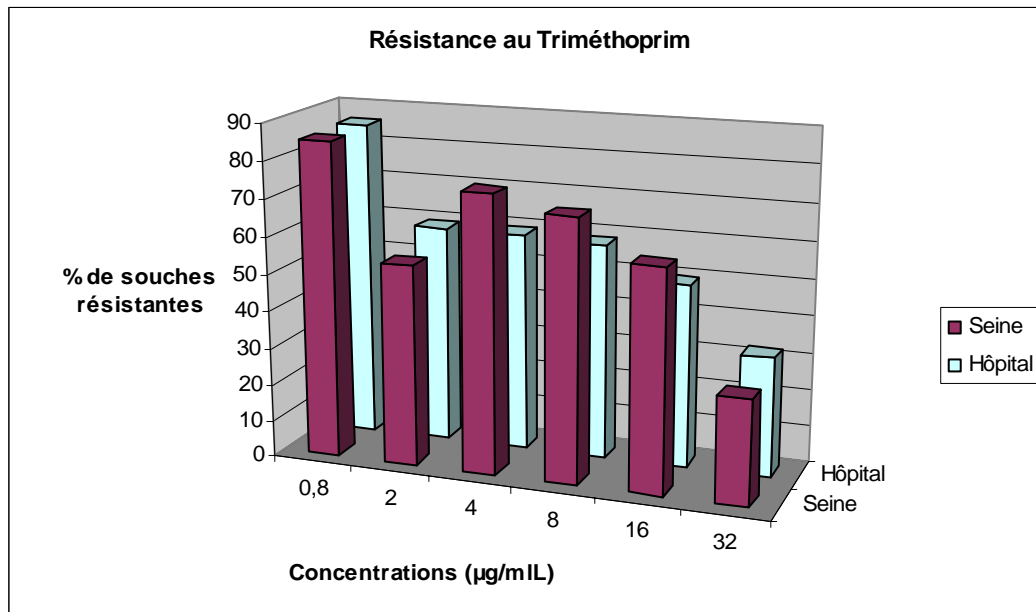


Figure 4 : Comparaison des pourcentages de coliformes résistants au triméthoprim en Seine et en effluents d'hôpitaux.

2.2 Identification des coliformes

Afin d'observer si la composition de la communauté bactérienne pourrait expliquer la différence de résistance, nous avons séquencé aléatoirement certaines souches. Lors de la campagne 2008, 42 souches (et 38 souches en 2007) ont été identifiées par séquençage d'une partie de l'ADN codant pour la sous-unité 16S du ribosome.

Le séquençage se fait en deux étapes :

- amplification d'un fragment d'environ 500pb du gène codant pour l'ARN 16S grâce au kit MicroSeq® 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems).
- marquage du fragment amplifié par le kit MicroSeq® 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing kit puis migration dans le séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems).

Les séquences ainsi obtenues sont traitées par le logiciel MicroSeq® ID Analysis Software. Lorsque le pourcentage d'homologie avec les séquences validées de la base est compris entre 98,5% et 100%, le résultat de l'identification est donné en Genre et Espèce (*Aeromonas media* par exemple). Lorsque le pourcentage d'homologie est compris entre 92% et 98,5%, l'identification n'est donnée qu'au genre (*Aeromonas* par exemple).

Sur cette population choisie au hasard, les souches sélectionnées en Seine appartiennent essentiellement aux genres *Escherichia* (30%), *Aeromonas* (30%), *Citrobacter* (18%) et *Enterobacter* (12%). Plus rarement, des souches de *Shigella* ont été identifiées. La diversité des bactéries identifiées dans cette campagne est moins importante que celle observée au cours de la précédente campagne.

De même, les bactéries isolées à partir de rejets hospitaliers appartiennent pour 75% au genre *Enterobacter*. La diversité phylogénétique observée y est également moins importante. On trouve également des souches des genres *Escherichia*, *Citrobacter* et *Aeromonas*.

Il est donc important de noter que les coliformes identifiés dans les rejets hospitaliers sont plus certainement d'origine humaine que les coliformes identifiés en Seine.

Dans les cas des coliformes identifiés en Seine, nous avons étudiés les résistances par genre bactérien sur l'ensemble des deux campagnes. On peut observer que dans le cas des quatre antibiotiques étudiés, c'est le genre *Enterobacter* qui présente le plus de résistance (Figure 5 à 8)

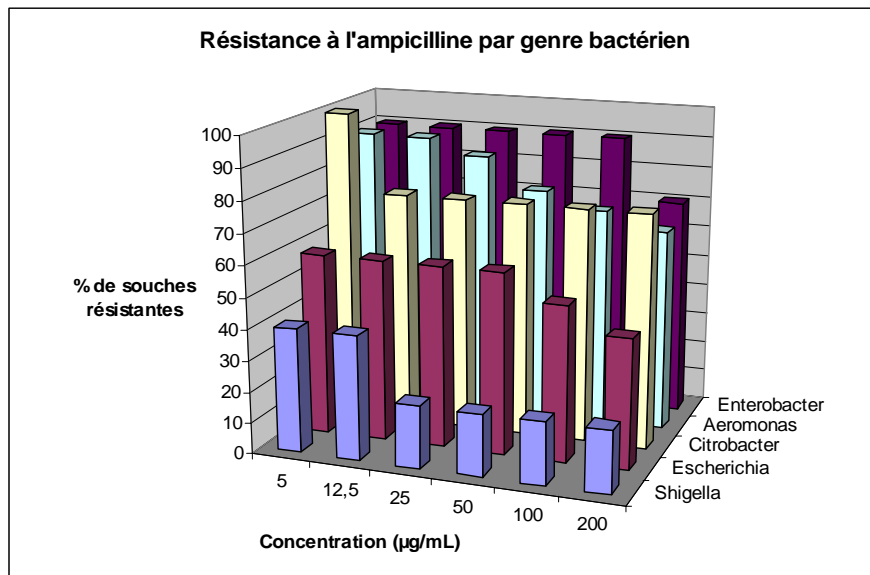


Figure 5 : Comparaison des pourcentages de résistance à l'ampicilline par genre bactérien en Seine.

Les clones de *Shigella* isolés dans la Seine présentent une faible résistance à l'ampicilline (Figure 5).

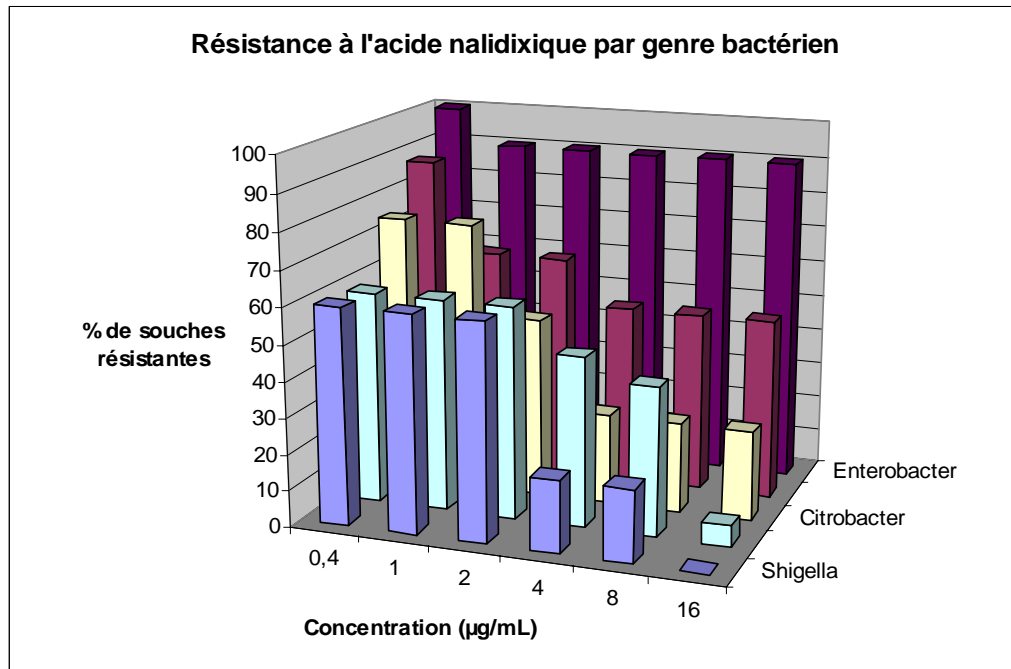


Figure 6 : Comparaison des pourcentages de résistance à l'acide nalidixique par genre bactérien en Seine.

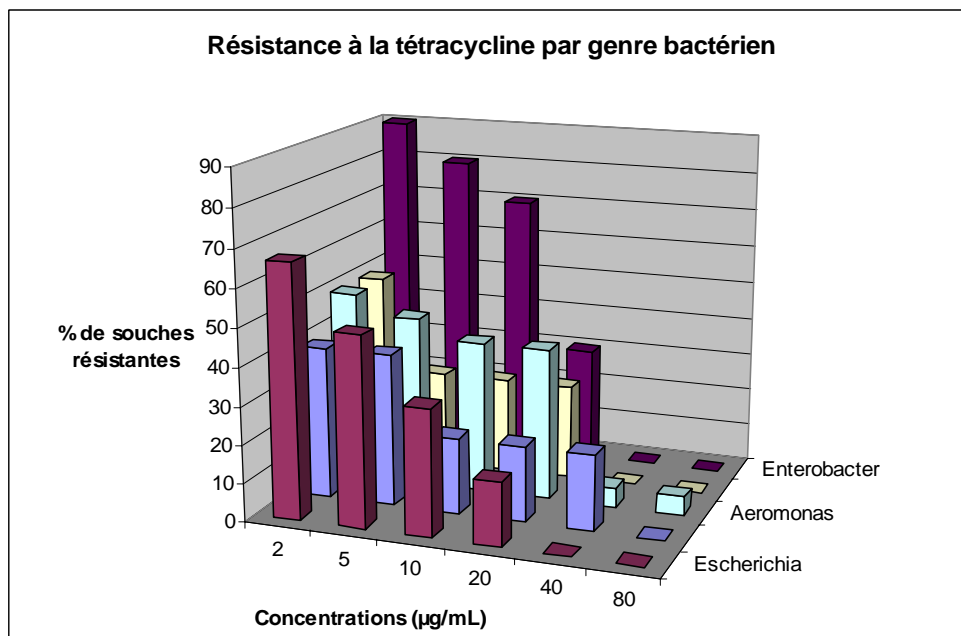


Figure 7 : Comparaison des pourcentages de résistance à la tétracycline par genre bactérien en Seine.

La résistance à la tétracycline à des concentrations supérieures à 20µg/mL est peu répandue. On trouve uniquement des clones d'*Aeromonas* résistants à des concentrations supérieures à 40µg/mL (Figure 7).

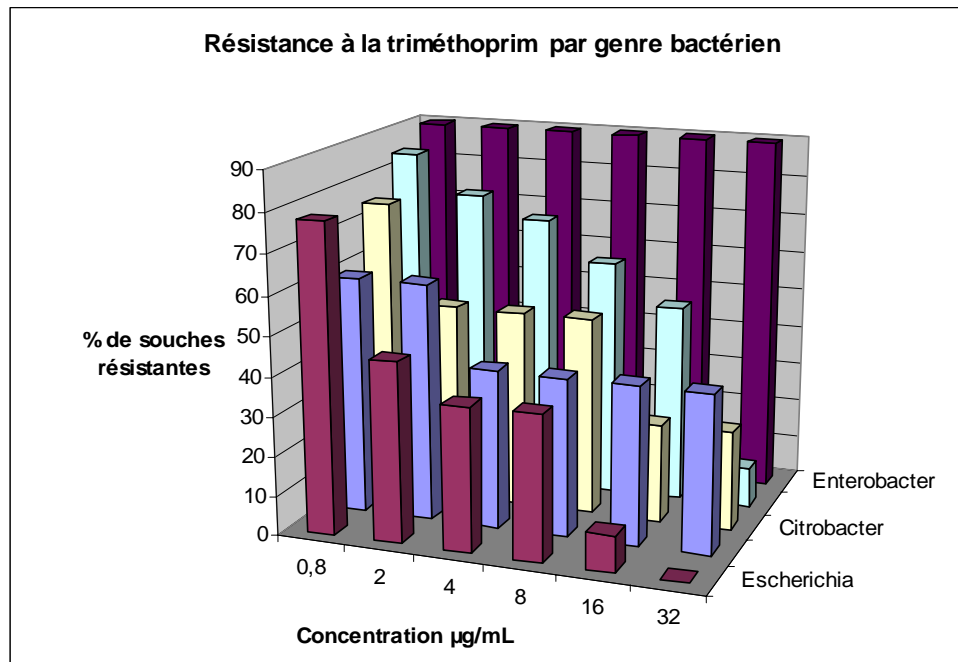


Figure 8 : Comparaison pourcentages de résistance à la triméthoprim par genre bactérien en Seine.

2.3. Expériences de co-culture et de transfert de résistance.

Le but de cette expérience est de vérifier si la capacité de résistance à l'ampicilline, qui est portée par un élément génétique mobile, ici un plasmide en cours d'identification, est transférable d'une souche à une autre.

Nous avons décidé de mettre au point un système modèle de transfert de gène de résistance afin de pouvoir observer l'effet des concentrations sub-inhibitrices sur ces transferts.

En effet, on peut imaginer que dans l'environnement, les échanges génétiques permanent entre les souches conduisent à la dissémination de gènes de résistance. Nous voulions observer l'effet des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sur la sélection des bactéries lors des transferts de gènes.

Pour cela le protocole génétique suivant a été mis au point.

Deux souches isolées à partir des prélèvements ont été choisies :

- une souche identifiée comme *Aeromonas media*. Cette souche a une CMI en ampicilline supérieure à 200µg/mL. Elle a un phénotype β-galactosidase positive (sur un milieu de culture contenant de l'IPTG et du X-Gal, les colonies apparaissent bleues)
- une souche identifiée comme *Escherichia coli*. Cette souche a une CMI en ampicilline supérieure à 200µg/mL. Elle a un phénotype β-galactosidase positive.

Nous disposons également d'une souche de laboratoire d'*Escherichia coli* MG1656, ayant un phénotype β-galactosidase négative et étant ampicilline sensible.

Des mélanges ont été réalisés entre :

- la souche *A. media* environnementale (bleue/Amp^R) et la souche MG1656 (blanche/Amp^S)
- la souche *E. Coli* environnementale (bleue/Amp^R) et la souche MG1656 (blanche/Amp^S).

Des croissances en co-culture ont été réalisées en milieu riche et en eau de Seine stérilisée. A l'issue de 24h de croissance, des étalements ont été réalisés sur milieux sélectifs. La présence de souches β-gal négatives et Amp^R, signifierait le transfert du plasmide portant la résistance à l'ampicilline entre les deux souches.

Cependant, deux problèmes se sont posés :

- dans l'eau de Seine stérilisée la souche *E. coli* isolée de la Seine, a une vitesse de croissance beaucoup plus rapide que la souche de laboratoire MG1656. Au bout de 24h, elle est très largement majoritaire.
- le phénotype des souches de type *Aeromonas* n'est pas facilement identifiable, la variation des phénotypes rend l'analyse difficile.

Le système modèle de transfert génétique devrait être prochainement fonctionnel afin de vérifier *in vitro* l'influence des concentrations d'antibiotiques.

III- Conclusions

Concernant l'étude environnementale, la poursuite de notre échantillonnage en 2008 nous a permis de préciser les premières conclusions de 2007 : **Les coliformes isolés à partir des rejets hospitaliers sont à la fois plus fréquemment résistants mais aussi résistants à des concentrations d'antibiotiques beaucoup plus élevées.** La confirmation de ce résultat démontre que le mécanisme de résistance mis en jeu lors d'une d'antibiothérapie permet la sélection de souche beaucoup plus résistantes que celles identifiées dans l'environnement.

Cette différence entre coliformes isolés à partir de rejets hospitaliers et d'eau de surface entraîne plusieurs hypothèses :

- soit les souches hautement résistantes (SHR) se retrouvent diluées dans l'environnement et ne sont déjà plus mises en évidence lors des prélèvements dans les rejets de stations (donnée non communiquées) et donc dans les eaux de surfaces.

- soit ces souches SHR ne perdurent pas dans l'environnement, du fait de la faible pression de sélection entraînant alors une diminution du niveau de résistance.

Néanmoins la présence de souches résistantes est importante dans l'environnement (plus de 60% des souches sont résistantes aux concentrations usuelles d'ampicilline utilisées en antibiothérapies par exemple) et la multirésistance répandue (plus de XX% des souches). Ces résultats semblent conformes à ceux produits par Julien Passerat et ses collaborateurs dans leurs travaux du PIREN.

L'identification fine des souches, s'il peut expliquer en partie le phénomène (les souches d'origine fécale sont plus résistantes que les souches d'origine environnementale) ne peut à elle seule en être la cause. La résistance des souches de l'environnement doit être expliquée (transfert de gène ? pression de sélection des concentrations faibles d'antibiotique ?)

Quoi qu'il en soit, nos résultats indiquent que la pression de sélection est moins importante dans l'environnement que là où a lieu le traitement (niveau de résistance à l'hôpital comparé au niveau de résistance en Seine). Il conviendrait donc de mieux comprendre l'acquisition et le transfert des gènes de résistance dans le milieu hydrique.