

Occurrence et origines des bactéries fécales antibiorésistantes (*E. coli* et entérocoques) dans le bassin de la Seine

Julien Passerat¹ et Pierre Servais^{1*}

¹Écologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Campus Plaine,
CP 221, 1050 Bruxelles, Belgique
*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'ils causent ne peuvent pas être traitées par des antibiotiques. Ce travail s'est donc intéressé à la présence de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques dans les eaux du bassin de la Seine.

Pour cela, 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. L'hypothèse faite ici est que la présence de souches antibiorésistantes de ces organismes témoigne de la probabilité que des pathogènes antibiorésistants de même origine soient aussi présents. Par ailleurs, différents milieux aquatiques, dont l'origine de la contamination fécale est connue ou du moins fortement présumée, ont aussi été échantillonnés afin de déterminer la source principale des bactéries fécales antibiorésistantes trouvées dans les rivières : eaux usées domestiques (contamination fécale d'origine humaine), eaux usées hospitalières (origine humaine mais provenant d'une population massivement traitée aux antibiotiques), eaux de surfaces sous l'influence du lessivage de terres agricoles (contamination provenant d'animaux d'élevage) et enfin ruisseaux forestiers (contamination provenant d'animaux sauvages non traités aux antibiotiques).

2. Méthodes

2.1. Échantillonnage

L'analyse de l'antibiorésistance d'*E. coli* et des entérocoques intestinaux a été réalisée sur des échantillons d'eau prélevés entre 2005 et 2007, provenant à la fois de rivières et de milieux dont l'origine de la contamination fécale était connue ou du moins présumée. Des prélèvements répétés ont été effectués dans les grandes rivières du bassin de la Seine en amont de l'agglomération parisienne (la Seine à Choisy-le-Roi, la Marne à Neuilly-sur-Marne et l'Oise à Méry-sur-oise) ainsi que dans la Seine à Paris. Des rivières de dimension inférieure ont également été échantillonnées : l'Orge, l'Yvette (affluent de l'Orge), la Prédecelle (rivière du bassin de l'Orge), et uniquement pour *E. coli* dont l'étude a débuté avant celle des entérocoques intestinaux, l'Essonne, la Blaise (affluent de la Marne) et le Robec, qui est un affluent de l'estuaire de Seine fortement contaminé par des eaux usées domestiques (Garcia-Armisen *et al.*, 2005).

Par ailleurs, des eaux ont été prélevées en entrée et sortie de différentes stations d'épuration (STEPS), ainsi qu'en sortie de collecteurs réceptionnant des eaux usées de deux hôpitaux (contamination fécale principalement d'origine humaine). Des ruisseaux agricoles dont le bassin versant était dominé par des zones pâturées ont été échantillonnés en amont de tout rejet domestique de manière à ce que la contamination fécale soit due au ruissellement et au lessivage des sols agricoles (contamination fécale provenant principalement d'animaux d'élevage). Finalement des ruisseaux forestiers ont également été échantillonnés en amont de tout rejet domestique (contamination fécale provenant principalement d'animaux sauvages).

Les tableaux 1 et 2 indiquent pour *E. coli* et entérocoques intestinaux, respectivement, le nombre d'échantillons collectés par type de milieu, ainsi que le nombre de souches testées vis-à-vis des différents antibiotiques durant cette étude. Certains antibiotiques introduits en cours d'étude ont été testés sur un moins grand nombre de souches que les autres.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons collectés et de souches d'E. coli testées avec les différents antibiotiques (la correspondance entre le nom des antibiotiques et leur abréviation est donnée au tableau 3).

Milieu	AMX, AMC, CF, CTX, AN, GM, TE, NA, CIP, ENR, SXT		XNL		LVX		CAZ, NOR, OFX	
	Échantillons	Souches	Échantillons	Souches	Échantillons	Souches	Échantillons	Souches
Rivière	21	214	18	186	12	118	9	88
Hospitalier	18	235	17	216	13	139	13	139
Domestique	16	179	11	119	6	69	5	57
Agricole	14	159	12	139	9	107	5	70
Forestier	15	142	12	124	10	110	7	80
Total	84	929	70	784	50	543	39	434

Tableau 2 : Nombre d'échantillons collectés et de souches d'entérocoques intestinaux testées avec les différents antibiotiques (la liste des antibiotiques utilisés est donnée au tableau 4)

Milieu	Échantillons	Souches
Rivière	9	148
Hospitalier	6	122
Domestique	6	90
Agricole	8	131
Forestier	10	133
Total	39	624

2.2. Détermination de l'antibiorésistance

Les *E. coli* présents dans les échantillons ont été cultivés sur gélose sélective Chromocult Coliform ou Fluorocult, et les entérocoques intestinaux sur Chromocult Enterococci ou Rapid'Enterococcus. Pour chaque échantillon, une dizaine au moins des colonies typiques obtenues a été sélectionnée aléatoirement et isolée sur la gélose sélective appropriée jusqu'à obtention d'une souche pure.

Pour chaque souche ainsi isolée, un antibiogramme a été réalisé selon la méthode standard de diffusion en milieu gélosé, en suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2007). Pratiquement, chaque souche est cultivée en bouillon Mueller-Hinton (milieu nutritif riche non sélectif) à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une turbidité supérieure ou égale au standard McFarland 0,5. Si nécessaire, la turbidité est ramenée précisément à ce standard par ajout de solution saline stérile (NaCl 0,9 %) pour obtenir une densité d'environ 10^8 UFC/ml. Cette suspension est alors diluée au 1/100 en solution saline puis elle est utilisée pour ensemercer par écouvillonnage dans des boîtes de Petri contenant de la gélose Mueller-Hinton. Des disques de papier imprégnés d'une charge standard d'un antibiotique à tester sont appliqués sur la gélose (six disques par boîte de Petri de Ø 90 mm) au moyen d'un distributeur. Les antibiotiques diffusent hors du disque dans la gélose, créant un gradient de concentration décroissante. Après 18 à 24 h d'incubation à 36 °C, la zone entourant le disque où aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. Son diamètre est mesuré et comparé aux diamètres critiques établis par le CA-SFM pour le couple antibiotique-bactérie considéré. La souche est ainsi classée sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à l'antibiotique, les souches I étant ensuite incluses dans la catégorie R.

Les *E. coli* sont des bactéries à Gram négatif alors que les entérocoques intestinaux sont à Gram positif, ils ne sont pas sensibles au même spectre d'antibiotiques. La résistance des souches d'*E. coli* a ainsi été testée sur 16 antibiotiques, celle des souches d'entérocoques intestinaux l'a été sur 10, dont 3 sont communs avec *E. coli* (tétracycline, lévofloxacine, cotrimoxazole). Les tableaux 3 et 4 présentent la liste de ces antibiotiques pour *E. coli* et entérocoques intestinaux respectivement, leur classe et leur domaine d'utilisation, ainsi que la charge des disques utilisés.

2.3. Détermination de l'antibiorésistance par étalement sur gélose sélective additionnée d'amoxicilline

Parallèlement aux antibiogrammes standards et sur certains échantillons, la résistance d'*E. coli* à l'amoxicilline a été testée par une méthode alternative. Divers volumes de l'échantillon à analyser sont déposés sur gélose sélective Chromocult Coliform contenant 4 mg/ml d'amoxicilline ainsi que sur Chromocult Coliform non modifié. À la concentration de 4 mg/l, qui correspond à la concentration critique basse de l'amoxicilline selon le CA-SFM (CA-SFM, 2007), une souche d'*E. coli* dont la croissance est inhibée est classée sensible. Après 24 h d'incubation à 37 °C, les colonies typiques d'*E. coli* sont dénombrées sur les deux géloses, et le rapport entre le nombre obtenu sur Chromocult Coliform + amoxicilline et celui obtenu sur Chromocult Coliform détermine le taux de résistance d'*E. coli* à l'amoxicilline pour l'échantillon analysé.

Tableau 3 : Liste des antibiotiques testés sur *E. coli*, charge des disques, classification et domaine d'utilisation.

Antibiotique	Abré- viation	Charge du disque	Classe	Domaine d'utilisation
Amoxicilline	AMX	25 µg	β-lactames (famille des pénicillines)	Hospitalier, domestique et vétérinaire
Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	20/10 µg	β-lactames (famille des pénicillines et des clavames)	Hospitalier, domestique et vétérinaire
Céfalotine	CF	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 1 ^{ère} génération)	Hospitalier et vétérinaire
Céfotaxime	CTX	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 3 ^{ème} génération)	Hospitalier
Ceftazidime	CAZ	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 3 ^{ème} génération)	Hospitalier
Ceftiotur	XNL	30 µg	β-lactames (famille des céphalosporines 2 ^{ème} génération)	Vétérinaire
Amikacine	AN	30 µg	Aminosides	Hospitalier
Gentamicine	GM	15 µg (10 UI)	Aminosides	Surtout vétérinaire
Tétracycline	TE	30 UI	Tétracyclines	Hospitalier, domestique et vétérinaire
Acide nalidixique	NA	30 µg	Quinolones	Hospitalier et domestique
Ciprofloxacine	CIP	5 µg	Fluoroquinolones	Hospitalier et domestique
Enrofloxacin	ENR	5 µg	Fluoroquinolones	Vétérinaire
Lévofloxacine	LVX	5 µg	Fluoroquinolones	Hospitalier et domestique
Norfloxacine	NOR	5 µg	Fluoroquinolones	Hospitalier et domestique
Ofloxacine	OFX	5 µg	Fluoroquinolones	Hospitalier et domestique
Triméthoprim/sulfaméthoxazole (Cotrimoxazole)	SXT	1,25/23,75 µg	Sulfamides/diaminopyridine	Hospitalier, domestique et vétérinaire

Tableau 4 : Liste des antibiotiques testés sur entérocoques intestinaux, charge des disques, classification et domaine d'utilisation.

Antibiotique	Abré- viation	Charge du disque	Classe	Domaine d'utilisation
Ampicilline	AM	10 µg	β-lactames (famille des pénicillines)	Hospitalier, domestique et vétérinaire
Gentamicine	GEN	500 µg	Aminosides	Surtout vétérinaire
Tétracycline	TE	30 UI	Tétracyclines	Hospitalier, domestique et vétérinaire
Lévofloxacine	LVX	5 µg	Fluoroquinolones	Hospitalier et domestique
Triméthoprim/sulfaméthoxazole (Cotrimoxazole)	SXT	1,25/23,75 µg	Sulfamides/diaminopyridine	Hospitalier, domestique et vétérinaire
Chloramphénicol	C	30 µg	Phénicolés	Interdit en médecine vétérinaire
Érythromycine	E	15 UI	Macrolides	Hospitalier, domestique et vétérinaire
Linézolide	LZD	30 µg	Oxazolidinones	Hospitalier
Teicoplanine	TEC	30 µg	Glycopeptides	Hospitalier
Vancomycine	VA	30 µg	Glycopeptides	Hospitalier

3. Résultats

3.1. Comparaison entre l'antibiogramme standard et la méthode sur gélose sélective additionnée d'amoxicilline

Au cours de cette étude, nous avons testé une méthode simplifiée pour mesurer dans un échantillon d'eau le taux de résistance des *E. coli* à un antibiotique donné. Dans cette méthode, l'échantillon est étalé sur deux géloses sélectives Chromocult Coliform, spécifique d'*E. coli*, l'une d'elle contient en plus l'antibiotique à sa concentration critique basse (*cf.* Méthodes). La proportion d'*E. coli* ne poussant que sur la gélose non modifiée donne une estimation du taux de résistance dans l'échantillon. L'antibiotique testé, l'amoxicilline (AMX), a été sélectionné pour le taux élevé de résistance qu'il rencontre dans les divers milieux. Dix échantillons, provenant d'eau de rivières (3), de rejets hospitaliers (3), de rejets domestiques (2) et de ruisseaux agricoles (2), ont été analysés par cette méthode. Parallèlement, une dizaine de souches par échantillon a été isolée, et leur résistance à l'amoxicilline a été testée par la méthode de l'antibiogramme standard. La figure 1 présente les taux de résistance obtenus par chaque méthode pour les 10 échantillons.

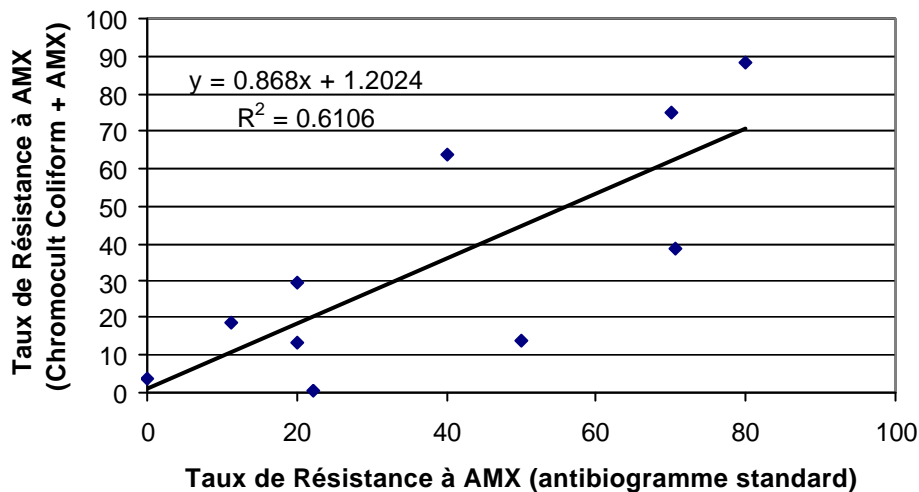


Figure 1 : Relation entre les taux de résistance à l'amoxicilline obtenus par la méthode de l'antibiogramme standard (environ 10 souches analysées par échantillon) et par la méthode d'étalement.

Une régression linéaire entre les deux mesures donne une pente proche de 1 (0,87) et un coefficient de détermination (R^2) de 0,61, ce qui montre une tendance à l'équivalence mais avec une grande variabilité autour de la valeur à estimer.

Il existe plusieurs explications aux différences de taux de résistance obtenus par les deux méthodes. Tout d'abord, dans la méthode d'étalement le calcul du taux de résistance repose sur le quotient de deux dénombrements. Chacun d'eux est affecté d'une erreur de l'ordre de 20 % autour de la valeur estimée. La méthode de l'antibiogramme standard, quant à elle, nécessite de travailler sur des souches préalablement isolées. La quantité de travail exigée limite le nombre de souches pouvant être analysées par échantillon. Ici, la dizaine de souches isolée par échantillon n'est que faiblement représentative de la population que l'on cherche à analyser. Chaque méthode peut donc conduire à une sur- ou sous-estimation, ce qui explique la dispersion des valeurs autour de la droite d'équivalence.

Puisque les deux méthodes sont entachées d'imprécision, la méthode alternative par étalement direct possède l'avantage de la rapidité lorsqu'il s'agit de tester la résistance à un antibiotique unique. Lorsqu'on veut multiplier le nombre d'antibiotiques à tester, il faut également multiplier le nombre de géloses additionnées d'antibiotique ainsi que le nombre d'étalement, ce qui devient vite fastidieux. La méthode de l'antibiogramme standard pour évaluer l'antibiorésistance à plusieurs antibiotiques reste

donc préférable à celle de l'étalement. C'est dès lors celle qui a été utilisée dans cette étude pour analyser l'antibiorésistance d'*E. coli* et des entérocoques intestinaux dans les eaux du bassin de la Seine.

3.2. Antibiorésistance d'*E. coli*

3.2.1 Antibiorésistance globale

Durant cette étude, un total de 929 souches d'*E. coli* ont été isolées à partir de 84 échantillons d'eau. La résistance de chacune d'elle a été testée vis-à-vis de 11 à 16 antibiotiques. La majorité de ces souches (60,9 %) était sensible à tous les antibiotiques ; 39,1 % étaient ainsi résistantes à au moins un antibiotique. La figure 2 présente le pourcentage de souches résistantes (taux de résistance) à chacun des antibiotiques testés, tous échantillons confondus.

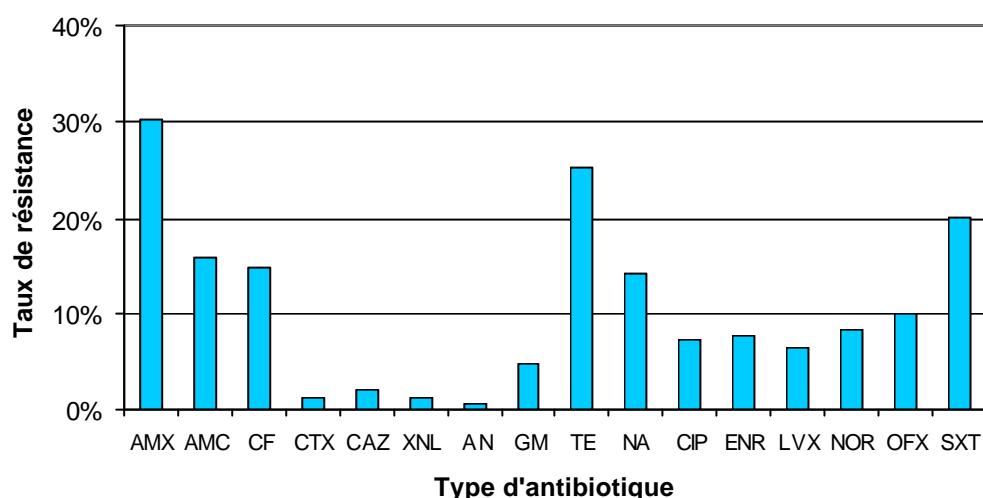


Figure 2 : Taux de résistance d'*E. coli* aux antibiotiques testés, tous échantillons confondus

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre.

L'amoxicilline (AMX) est l'antibiotique qui présente le plus haut taux de résistance : presque un tiers des souches étudiées y sont résistantes. Cet antibiotique est utilisé aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, et ce, sans limite d'usage (il appartient à la troisième famille d'antibiotiques la plus prescrite en pratique ambulatoire) ce qui peut expliquer la présence de nombreuses souches résistantes à son égard. Le taux de résistance à l'association amoxicilline/acide clavulanique (AMC) est plus bas que celui pour l'amoxicilline (15,9 %), ce qui est cohérent avec l'effet de l'acide clavulanique. C'est un inhibiteur de β -lactamases, il est utilisé en association avec les β -lactames telles l'amoxicilline pour contrer les résistances dus à la présence de β -lactamases. Notons également qu'à chaque fois que la souche est résistante à l'association amoxicilline/acide clavulanique, une résistance logique à l'amoxicilline est observée.

Les céphalosporines étudiées possèdent différents taux de résistance. La céfalotine (CF) présente le taux le plus élevé, à savoir 15,0 %. Des taux de résistance du même ordre de grandeur (22,7% et 22,5%) ont été rapportés, respectivement, dans une étude réalisée par Sayah *et al.* (2005) sur des souches issues de rejets fécaux d'animaux domestiques et sauvages, de STEP's municipales et d'eaux de surface et par Reinthaler *et al.* (2003) sur des souches issues de STEP's traitant à la fois des rejets domestiques et hospitaliers. Le ceftiotur (XNL), la céfotaxime (CTX) et la ceftazidime (CAZ) ont présenté des taux de résistance semblables et faibles lors de notre étude, de l'ordre de 2 %. Le taux élevé de résistance observé pour la céfalotine s'explique par le fait que cet antibiotique appartient aux céphalosporines de 1ère génération. Celles-ci sont moins résistantes aux β -lactamases que les

céphalosporines de 2^{ème} génération (dont fait partie le ceftiotur) et de 3^{ème} génération (dont font partie la céfotaxime et la ceftazidime).

Les taux de résistance obtenus pour les antibiotiques appartenant à la classe des aminosides, c'est-à-dire l'amikacine (AN) et la gentamicine (GM), sont relativement faibles (respectivement 0,6 % et 4,7 %). L'explication possible de ces faibles taux est leur faible consommation, étant donné l'existence de molécules moins toxiques et plus efficaces. La présence d'un taux de résistance plus élevé envers la gentamicine (aminoside naturel) est normal : l'amikacine est une molécule semi-synthétique spécialement conçue pour contrer le phénomène de résistance des bactéries vis-à-vis des aminosides naturels.

Une grande proportion des souches étudiées a montré une résistance à la tétracycline (TE) (25,3 %). Des taux semblables de résistance ont été rapportés dans différentes études citées ci-dessus : 27,3 % par Sayah *et al.* (2004) et 24 % par Reinthaler *et al.* (2003). Ces taux élevés résultent de l'emploi excessif de cet antibiotique tant en médecine humaine que vétérinaire depuis des dizaines d'années.

Si l'on regarde les quinolones dans leur ensemble, on constate que les souches résistent de manière décroissante à l'acide nalidixique (NA) (14,3 %), à l'ofloxacin (OFX) (9,9 %), à la norfloxacine (NOR) (8,3 %), à l'enrofloxacin (ENR) et la ciprofloxacine (CIP) (7,6% et 7,3 %, respectivement) et finalement à la lévofloxacin (LVX) (6,4 %). L'acide nalidixique appartient à la famille des quinolones tandis que les autres molécules appartiennent à la famille des fluoroquinolones, famille plus récente et ayant un spectre d'action plus large. Il est donc normal de constater un taux de résistance plus élevé à l'acide nalidixique que pour les autres molécules. La lévofloxacin présente le taux de résistance le plus faible. Son utilisation est plus récente que celle des autres molécules. Comme la consommation des fluoroquinolones a considérablement augmenté ces dernières années, une augmentation de leur taux de résistance est donc à attendre dans les années à venir.

Le cotrimoxazole (SXT) fait partie des antibiotiques testés présentant un taux de résistance relativement élevé (20,1 %). Il est généralement utilisé lors d'infections urinaires. Suite à la présence accrue de souches résistantes à cet antibiotique, il est progressivement remplacé par les fluoroquinolones (Karaca *et al.*, 2005).

3.2.2 Antibiorésistance selon le type de milieu

Après avoir considéré l'antibiorésistance des souches dans leur ensemble, les taux de résistance ont été analysés en groupant les souches par type de milieu. La figure 3 présente le pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches isolées des eaux de rivières d'une part, et des diverses sources de contamination fécale étudiées d'autre part.

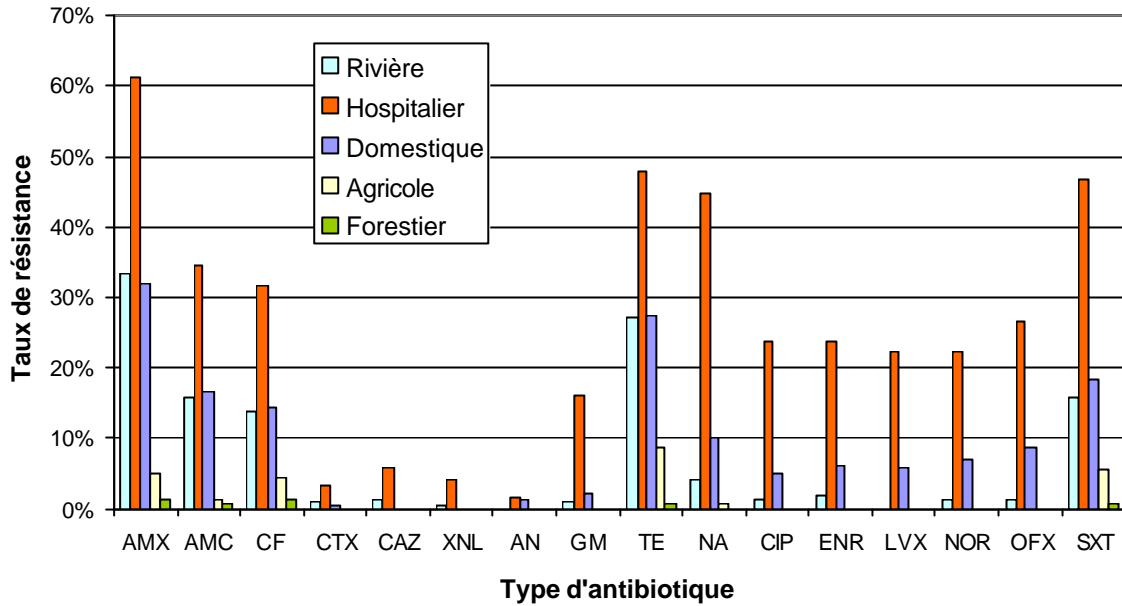


Figure 3 : Taux de résistance d'*E. coli* selon le type de milieu.

Les taux de résistance sont clairement différents d'un type de milieu échantillonné à un autre. Les différents types de milieu peuvent être classés sur base de leur taux de résistance décroissant : eau usée hospitalière, domestique, rivière, ruisseau en zone agricole et finalement ruisseau forestier. Ceci est en accord avec les résultats d'une étude réalisée par Parveen *et al.* (1997) qui mettait en évidence une plus grande proportion de souches résistantes à au moins un antibiotique au niveau des STEPs municipales qu'au niveau des eaux de surface. Nos résultats sont également en accord avec Reinthaler *et al.* (2003). Ceux-ci ont démontré que les STEPs traitant à la fois des rejets hospitaliers et domestiques semblaient contenir des souches d'*E. coli* ayant un taux de résistance plus élevé que les *E. coli* isolées de STEPs traitant uniquement des rejets domestiques. Les taux élevés de souches résistantes au niveau des rejets hospitaliers ne sont pas étonnants étant donnée l'intense utilisation des agents antimicrobiens au sein des hôpitaux.

Il est à noter que tous les antibiotiques testés rencontrent une résistance parmi les souches isolées des rejets hospitaliers et domestiques. À l'exception de la lévofloxacine et de l'amikacine, ce résultat se retrouve dans les échantillons de rivières. Ce n'est par contre pas le cas des ruisseaux agricoles (6 résistances décelées sur 16 antibiotiques testés) et forestiers (5 sur 16). Par ailleurs, les taux de résistance observés dans les rivières sont approximativement du même niveau que ceux des rejets domestiques, et nettement supérieurs à ceux des ruisseaux agricoles et forestiers. L'ensemble de ces observations tend à indiquer que les *E. coli* antibiorésistantes présentes dans les rivières proviennent majoritairement des rejets d'eaux usées domestiques et hospitalières.

Les antibiotiques pour lesquels une résistance est décelée en ruisseaux agricoles sont tous utilisés en médecine vétérinaire. Ce résultat est compatible avec l'origine présumée de la contamination fécale dans ces ruisseaux, à savoir les animaux d'élevage. Par ailleurs, les souches isolées des ruisseaux forestiers présentent des taux de résistances nuls ou proches de zéro, comme on peut l'attendre de bactéries fécales provenant d'animaux sauvages non traités aux antibiotiques. Néanmoins quelques résistances ont été observées (jusqu'à 1,4 % des souches pour l'amoxicilline et la céfalotine). Une première explication est que ces ruisseaux forestiers ne sont pas complètement à l'abri d'une contamination fécale d'une autre origine. Une autre possibilité est que ces taux non nuls révèlent l'existence d'un niveau basal de résistance parmi les populations d'*E. coli* non soumises à la pression de sélection des antibiotiques. Ces résistances pourraient par exemple résulter de mutations spontanées.

Si l'on s'intéresse aux milieux autres que les ruisseaux forestiers, on observe que les résistances à l'amoxicilline (AMX), l'amoxicilline/acide clavulanique (AMC), la céfalotine (CF), la tétracycline (TE), l'acide nalidixique (NA) et le cotrimoxazole (SXT) y sont systématiquement présentes. À l'exception de l'acide nalidixique, tous ces antibiotiques sont en effet utilisés tant en médecine humaine que vétérinaire. L'acide nalidixique a été retiré de la vente en médecine vétérinaire. Malgré cela, quelques souches résistantes ont été trouvées dans les ruisseaux à influence agricole, ce qui pourrait traduire la persistance des phénomènes d'antibiorésistance.

Des résistances à la céfotaxime (CTX) ont principalement été recensées à partir de souches issues de rejets hospitaliers (3,4 %), en accord avec son usage principal en milieu hospitalier. Bien que le ceftiotur (XNL) et l'enrofloxacin (ENR) soient strictement utilisés en médecine vétérinaire, des souches résistantes envers ces deux antibiotiques ont été retrouvées dans des échantillons de rejets hospitaliers, où une contamination fécale d'origine animale est peu probable. Les taux de résistance du ceftiotur sont du même ordre que les taux obtenus envers la céfotaxime. Les souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime) sont pour la plupart résistantes aux céphalosporines de 2^{ème} génération (ceftiotur). De même, les taux de résistance de l'enrofloxacin sont du même ordre que les taux de résistance vis-à-vis de la ciprofloxacine qui est également une fluoroquinolone. L'amikacine (AN) est un antibiotique à usage strictement hospitalier. Le taux de résistance des souches présentes au niveau de rejets hospitaliers est néanmoins très faible (1,7 %). Ceci ne contredit pas les résultats obtenus par Reinthaler *et al.* (2003), à savoir un taux de résistance nul envers cet antibiotique au niveau d'une STEP traitant à la fois des eaux usées hospitalières et domestiques. Des résistances envers la gentamicine (GM) ont principalement été retrouvées au niveau des rejets hospitaliers (16,2 %) ; ceci est vrai également pour la ciprofloxacine (CIP) (23,8 %).

3.2.3 Multirésistance

Notre travail a également permis d'étudier le phénomène de multirésistance. Une souche multirésistante est une souche qui présente une résistance à au moins deux antibiotiques. Sur les 929 souches d'*E. coli* étudiées au total, 39,1 % étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés et 32,5 % étaient multirésistantes. Ceci signifie que seules 6,6 % des souches étaient résistantes à un antibiotique unique. Il semble donc que, lorsqu'une bactérie est résistante à un antibiotique, elle soit la plupart du temps résistante à un autre antibiotique et donc multirésistante. Une étude, réalisée par Parveen *et al.* (1997) sur 765 souches issues d'eaux de surface, de STEPs municipales et d'échantillons fécaux d'origine humaine et animale, a mis en évidence un taux encore plus alarmant de souches résistantes à au moins un antibiotique, à savoir 82 %.

L'étude de la multirésistance a également été réalisée en fonction du milieu d'origine des souches. Les pourcentages suivants ont été calculés : pourcentage de souches résistantes à au moins un antibiotique, à au moins deux antibiotiques et à au moins cinq antibiotiques (Figure 4).

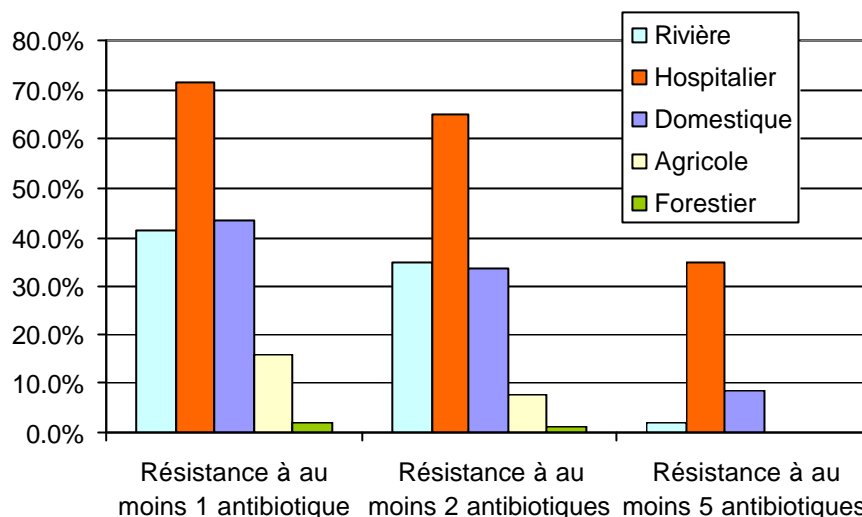


Figure 4 : Pourcentages des souches d'*E. coli* résistantes à au moins 1, 2 et 5 antibiotiques dans les différents milieux étudiés.

Le type de milieu présentant le plus de souches résistantes à au moins un antibiotique est, sans surprise, les eaux usées des rejets hospitaliers, suivies par les eaux usées domestiques et les rivières, ensuite par les ruisseaux en zones agricoles et finalement les ruisseaux forestiers.

Les pourcentages de souches résistantes à au moins deux et à au moins cinq antibiotiques sont également les plus élevés dans les rejets hospitaliers (65,1 % et 34,9 %). Les rivières et les eaux usées domestiques contiennent également un nombre important de souches résistantes à au moins deux antibiotiques (35,0 % et 33,5% respectivement) mais un nombre plus faible de souches résistantes à au moins cinq antibiotiques (1,9 % et 8,4 % respectivement). Chitnis *et al.* (2004) avaient également mis en évidence un taux plus important de souches multirésistantes au niveau des effluents hospitaliers qu'au niveau des eaux usées domestiques.

Les ruisseaux à influence agricole présentent également des bactéries résistantes à au moins deux antibiotiques mais à un taux plus faible (7,5 %) et aucune bactérie résistante à au moins cinq antibiotiques. Les souches issues de ruisseaux forestiers ne présentent que de très faibles taux de résistance à au moins un antibiotique et à au moins deux antibiotiques. Parmi les souches testées, aucune n'est résistante à au moins cinq antibiotiques.

3.3. Antibiorésistance des entérocoques intestinaux

3.3.1 Antibiorésistance globale

Au total, 624 souches d'entérocoques intestinaux, isolées de 39 échantillons d'eau, ont été testées vis-à-vis de 10 antibiotiques. Seul un petit tiers d'entre elles (30,8 %) s'est montré sensible à tous les antibiotiques. Un taux de sensibilité proche (21,9%) a été obtenu pour les entérocoques au niveau de STEPs municipales traitant également des rejets hospitaliers (da Costa *et al.*, 2006). La figure 5 présente le pourcentage de souches résistantes (taux de résistance) à chacun des antibiotiques testés, tous échantillons confondus.

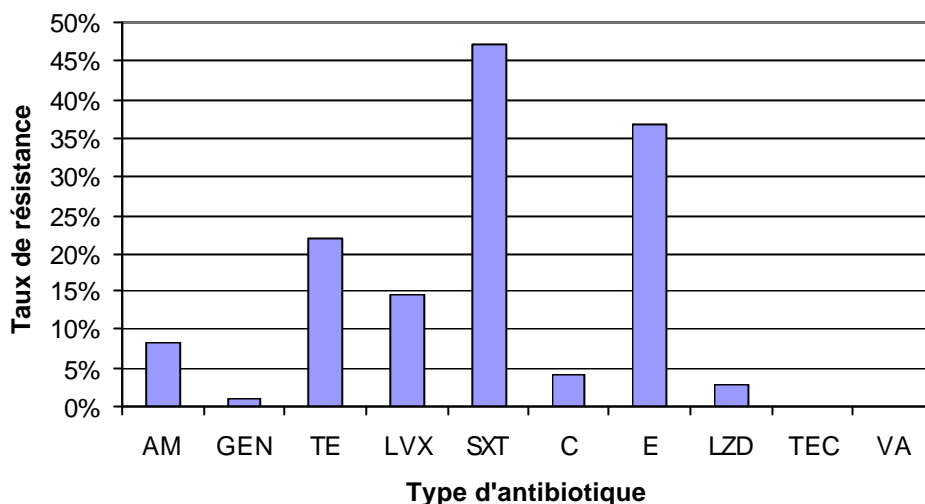


Figure 5 : Taux de résistance des entérocoques intestinaux aux antibiotiques testés, tous échantillons confondus

Le cotrimoxazole (SXT) est l'antibiotique qui présente le taux de résistance le plus élevé : 47,3 % des souches y sont résistantes. Selon la Banque de Données Automatisée sur les Médicaments (BIAM), les entérocoques sont généralement résistants à cet antibiotique. Différentes études ont rapporté des taux forts variables de résistance au cotrimoxazole : 12,8 % lors d'une étude réalisée sur des souches issues de biofilms (Schwartz *et al.*, 2003), 15,1 % parmi des souches issues d'infections humaines et animales (Busani *et al.*, 2004), 61,5 % parmi des souches issues d'infections humaines (Abbassi *et al.*, 2004) et 71 % parmi des souches issues de produits laitiers et d'infections humaines et animales (Lopes *et al.*, 2005).

Le taux de résistance obtenu pour l'érythromycine (E), appartenant à la classe des macrolides, est également élevé (36,7 %). L'augmentation de sa consommation en milieu hospitalier (BAPCOC, 2004) ainsi que la corrélation entre l'utilisation de la tylosine (un macrolide) comme promoteur de croissance dans le secteur de l'élevage et la sélection des souches d'entérocoques résistantes à cet antibiotique (van den Bogaard *et al.*, 2000) peuvent expliquer ce taux de résistance élevé. Depuis 1999, l'utilisation de la tylosine est néanmoins interdite en Europe. Poeta *et al.* (2006) ont mis en évidence un taux de résistance semblable au nôtre (31,5 %) sur des échantillons fécaux prélevés sur des humains en bonne santé. Une autre étude portant sur des souches issues d'infections humaines a rapporté un taux de résistance de 88 % envers l'érythromycine (Abbassi *et al.*, 2004).

La tétracycline (TE) présente le troisième taux de résistance le plus élevé (22,0 %). Des taux semblables ont été rapportés par Poeta *et al.* (2006) sur les mêmes échantillons cités dans le paragraphe précédent et par da Costa *et al.* (2006) sur des échantillons de STEPs municipales, à savoir 26 % et 34,6 % respectivement. D'autres études sur des souches isolées d'infections, réalisées par Abbassi *et al.* (2004) et Busani *et al.* (2004), ont mis en évidence des taux de résistance plus élevés, 79 % et 85 % respectivement. Ces taux ne sont pas étonnants vu l'emploi excessif de cet antibiotique depuis des dizaines d'années tant en médecine humaine que vétérinaire.

La lévofloxacine (LVX) présente un taux de résistance plus faible (14,6 %) mais néanmoins assez important pour un antibiotique récemment introduit sur le marché. La consommation des fluoroquinolones (dont fait partie la lévofloxacine) a considérablement augmenté ces dernières années (BAPCOC, 2004), pouvant provoquer l'émergence de résistance vis-à-vis de ces antibiotiques.

Une faible proportion des souches étudiées a montré une résistance à l'ampicilline (AM) (8,3 %). L'EARSS (2004) a rapporté un taux de résistance encore plus bas (2 %) envers les aminopénicillines (dont fait partie l'ampicilline) chez des souches d'*Enterococcus* spp. issues de cas cliniques divers. da Costa *et al.* (2006) ont également mis en évidence un faible taux (3,3 %) sur des

échantillons issus de STEPs municipales. Un taux nettement plus élevé (26 %) a été mesuré sur des échantillons divers prélevés sur des patients (Kaçmaz *et al.*, 2005).

L'utilisation du chloramphénicol (C) a été interdite en 1994 en médecine vétérinaire et son emploi en médecine humaine est restreint. Malgré cela, le taux de résistance obtenu dans cette étude est de 4,2 %. Des résultats relativement semblables ont été rapportés par da Costa *et al.* (2006), par Lopes *et al.* (2005) et par Poeta *et al.* (2006) dans les études déjà mentionnées précédemment (3,5 %, 11 % et 5 % respectivement).

Le linézolide (LZD) présente un taux de résistance très faible (2,9 %). Cet antibiotique n'est en effet utilisé qu'en milieu hospitalier et de manière restreinte.

Les souches d'entérocoques intestinaux étudiées présentent un très faible taux de résistance envers la gentamicine à concentration élevée (GEN). Seul 1,1 % des souches étudiées possède une enzyme inactivant l'antibiotique ou une mutation les rendant résistantes à cet antibiotique à haute concentration. L'explication possible de ce faible taux est la faible consommation de la gentamicine, due à l'existence d'autres molécules sur le marché moins toxiques et plus efficaces. Des études, réalisées par da Costa *et al.* (2006) et par Lopes *et al.* (2003) et déjà citées ci-dessus, ont rapporté des taux de résistance semblables, à savoir 2,4 % et 0 % respectivement. Vandamme *et al.* (1996) ont mis en évidence un taux légèrement plus élevé (8,7 %) de souches résistantes issues d'échantillons prélevés sur des infections humaines.

La totalité des souches s'est révélée sensible à la vancomycine (VA) et la teicoplanine (TEC). Des résultats semblables ont été rapportés dans le rapport annuel EARSS (2004), dans lequel il est mentionné que moins d'1 % des souches analysées sont résistantes à la vancomycine. D'autres études européennes ont mis en évidence des taux de résistance semblables à ces deux antibiotiques (Poeta *et al.*, 2006 ; Kaçmaz *et al.*, 2005 ; Abbassi *et al.*, 2004 et Vandamme *et al.*, 1996). Des taux de résistance beaucoup plus élevés ont été rapportés aux Etats-Unis (Vandamme *et al.*, 1996) suite à l'utilisation non restreinte de ces antibiotiques en milieu hospitalier. Il existerait également un lien entre l'utilisation de l'avoparcine (appartenant également à la classe des glycopeptides) comme promoteur de croissance dans les activités d'élevage et la sélection des souches résistantes aux glycopeptides. Suite à cela, l'utilisation de l'avoparcine en Europe a été interdite en 1997 et le taux de souches d'*Enterococcus* spp. résistantes aux glycopeptides a diminué (van den Bogaard *et al.*, 2000).

3.3.2 Antibiorésistance selon le type de milieu

Après avoir considéré l'antibiorésistance des souches d'entérocoques intestinaux dans leur ensemble, les taux de résistance ont été analysés en groupant les souches par type de milieu. La figure 6 présente le pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches isolées des eaux de rivières d'une part, et des diverses sources de contamination fécale étudiées d'autre part.

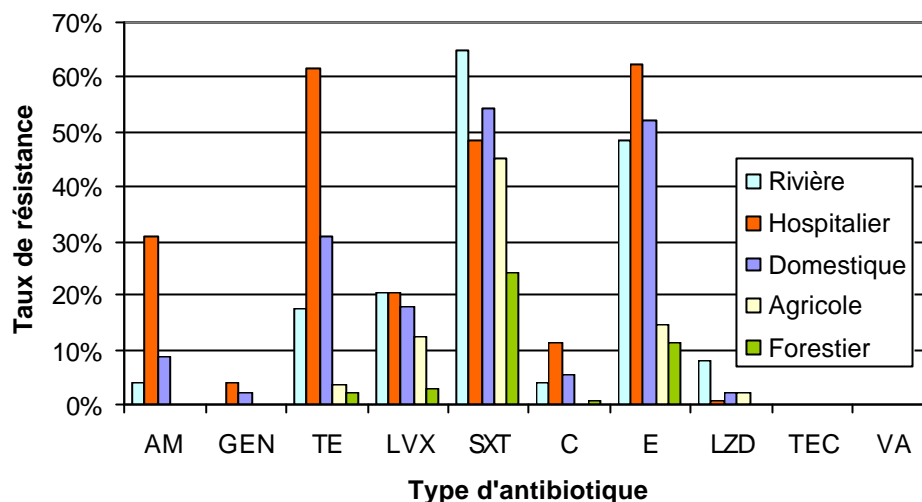


Figure 6 : Taux de résistance des entérocoques intestinaux selon le type de milieu.

Contrairement à *E. coli*, l'influence de l'origine fécale des souches sur le taux de résistance est différente selon les antibiotiques. Seules la tétracycline (TE) et l'ampicilline (AM) ont un profil de résistance semblable à celui observé pour *E. coli* : le taux de résistance des souches isolées de rejets hospitaliers est de deux à trois fois supérieur à celui des souches isolées de rejets domestiques, lui-même comparable ou légèrement supérieur au taux mesuré en rivière, les souches agricoles ou forestières présentant une résistance très faible à nulle. Cette tendance se retrouve avec l'érythromycine (E), le chloramphénicol (C) et la gentamicine à dosage élevé (GEN), mais le taux de résistance des souches hospitalières s'écarte moins de ceux des souches de rivières et de rejets domestiques. La lévofloxacine (LVX), le linézolide (LZD) et particulièrement le cotrimoxazole (SXT) présentent même des taux de résistance dans les rejets hospitaliers semblables à inférieurs à ceux obtenus en rivières et en rejets domestiques. Ce résultat ne s'explique pas dans les faits par une moindre utilisation de ces antibiotiques en milieu hospitalier. D'ailleurs les souches d'*E. coli* isolées des mêmes échantillons montrent des taux de résistance à la lévofloxacine et au cotrimoxazole maximaux dans les rejets hospitaliers. Par contre il est intéressant de noter que les taux de résistance à ces antibiotiques sont également élevés parmi les souches agricoles et forestières. Or la très faible antibiorésistance d'*E. coli* dans ces échantillons a confirmé l'origine essentiellement animale (voire même sauvage pour les échantillons forestiers) de la contamination fécale. Ces taux de résistances élevés pourraient donc révéler l'existence d'une résistance naturellement présente dans les populations d'entérocoques intestinaux, et qui serait pour une part indépendante d'une sélection par l'usage de ces antibiotiques.

3.3.3 Multirésistance

Sur un total de 624 souches d'entérocoques intestinaux analysées durant cette étude, 30,8 % étaient sensibles à tous les antibiotiques testés, 33,3 % étaient résistantes à un seul antibiotique, et 35,9 % étaient multirésistantes (résistantes à au moins deux antibiotiques). Des résultats semblables ont été rapportés par da Costa *et al.* (2006) dans une étude réalisée sur des souches issues de STEPs municipales. Le choix des antibiotiques à tester influence fortement ces résultats tout comme l'origine des souches et la proportion des différents types d'échantillons analysés. Par exemple, si le cotrimoxazole n'avait pas été testé lors de notre étude, 51,4 % des souches seraient sensibles à tous les antibiotiques testés, 26,8% seraient résistantes à un seul antibiotique et 21,8 % seraient multirésistantes.

L'étude de la multirésistance a également été réalisée en séparant les échantillons par type de milieu. Les pourcentages suivants ont été calculés : pourcentage de souches résistantes à au moins un antibiotique, à au moins deux antibiotiques et à au moins cinq antibiotiques (figure 7).

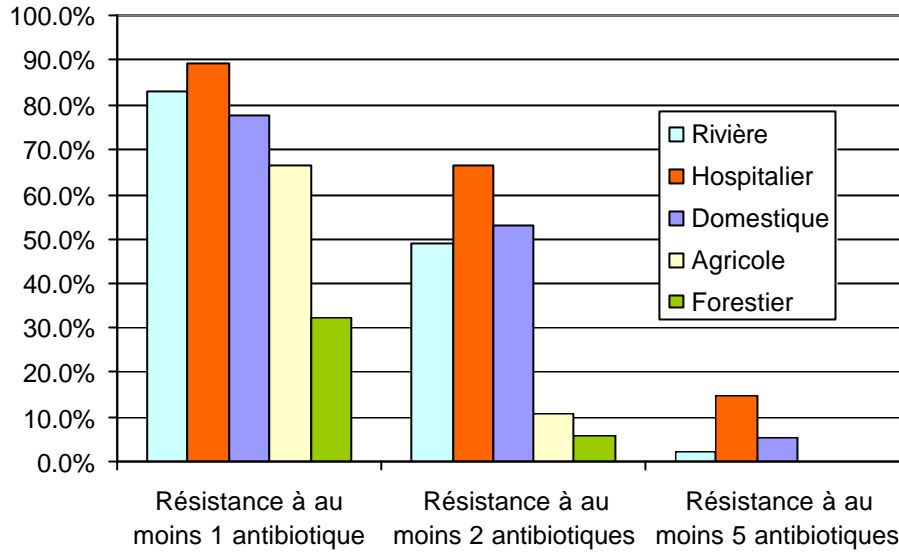


Figure 7 : Pourcentages des souches d'entérocoques intestinaux résistantes à au moins 1, 2 et 5 antibiotiques dans les différents milieux étudiés.

Cette analyse montre les mêmes tendances que pour *E. coli*, mais nettement moins accentuées. D'une part les pourcentages obtenus avec les souches hospitalières sont supérieurs aux rivières et rejets domestiques, mais pas d'un facteur 2 comme observé avec *E. coli*. D'autre part, le taux de résistance à un seul antibiotique (différence entre les taux de résistances à au moins 1 et à au moins 2 antibiotiques) est assez élevé pour les souches des ruisseaux agricoles et forestiers. Ce résultat est très intéressant car il montre que si la résistance à un antibiotique peut se rencontrer assez fréquemment dans le milieu naturel, la multirésistance, elle, se retrouve essentiellement dans les milieux fortement influencés par la consommation humaine d'antibiotiques. En particulier, les rivières présentent un profil d'antibiorésistance très similaire à celui des eaux usées domestiques et hospitalières. Ces rejets sont donc la source principale des bactéries antibiorésistantes que l'on retrouve dans les rivières du bassin de la Seine.

4. Conclusions

L'étude de la résistance de souches d'*Escherichia coli* et d'entérocoques intestinaux aux antibiotiques dans les rivières a confirmé le fait que l'utilisation d'antibiotiques tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire provoque l'émergence puis la dissémination de bactéries fécales antibiorésistantes. 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 les quatre types de milieux caractérisés par des origines différentes des bactéries fécales peuvent être classés par taux de résistance décroissant : eaux usées hospitalières, eaux usées domestiques, rejets agricoles et enfin ruisseaux forestiers. À ce sujet, les échantillons de rivière montrent en moyenne des niveaux similaires aux rejets domestiques, malgré des variations notables des taux de résistance d'un échantillon à l'autre. Les antibiotiques auxquelles les souches issues de ces milieux résistent sont aussi très variables selon les milieux. L'analyse des souches, tous échantillons confondus, a permis de faire le lien entre consommation d'antibiotiques et taux de résistances. Bon nombre de souches multirésistantes ont également été recensées dans les divers milieux étudiés.

Cette étude préliminaire a mis en évidence la présence dans les rivières du bassin de la Seine de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques ce qui peut poser un problème sanitaire sérieux quand

il s'agit de bactéries pathogènes. Il s'agit donc clairement d'une problématique émergente à prendre en compte à l'avenir dans les travaux du PIREN.

5. Références

- Abbassi, M.S., W. Achour et A. B. Hassen, 2004. Caractéristiques des souches d'entérocoques isolées chez des patients neutropéniques au centre national de greffe de moelle osseuse de Tunis. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 97(2):91-94.
- Banque de Données Automatisée sur les Médicaments (BIAM) : <http://www.biam2.org/accueil.html>
- Busani L., M. DelGrosso, C. Paladini C. Graziani, A. Pantosti, F. Biavasco and A. Caprioli, 2004. Antimicrobial susceptibility of vancomycinsusceptible and –resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *International Journal of Food Microbiology*. 97 : 17-22.
- Chitnis, V., S. Chitnis, K. Vaidya, S. Ravikant, S. Patil and D.S. Chitnis, 2004. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. *Water Research*. 38 : 441-447.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2007. 49 p.
- Commission Belge de Coordination de la Politique Antibiotique (BAPCOC). Antibiotic policy, use of antimicrobial agents and bacterial resistance in Belgium – situation before 2002. Rapport annuel 2004 . 131p.
- da Costa, P.M., P. Vaz-Pires and F. Bernardo, 2006. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*. 40:1735-1740.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Rapport annuel 2004. 136p.
- Garcia-Armisen, T., Touron, A., Petit, F. & Sevais, P. 2005. Sources of microbiological contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries*. 28: 627-633
- Kaçmaz, B. and A. Aksoy, 2005. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25:535-538.
- Karaca, Y., N. Coplu, A. Gozalan, O. Oncul, B.E. Citil and B. Esen, 2005. Cotimoxazole and quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections over the last 10 years. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 : 75-77.
- Lopes, M.F.S., T. Ribeiro, M. Abrantes, J.J.F. Marques, R. Tenreiro and M.T.B. Crespo, 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*. 103:191-198.
- Parveen, S., R.L. Murphree, L. Edminston, C.W. Kaspar, K.M. Portier and M.L. Tamplin, 1997. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (7) : 2607-2612.
- Poeta, P., D. Costa, J. Rodrigues and C. Torres, 2006. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 27:131-137.
- Reinthaler, F.F., J. Posch, G. Feierl, G. Wüst, D. Haas, G. Ruckebauer, F. Mascher and E. Marth, 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*. 37 : 1685-1690.

- Sayah, R.S., J.B. Kaneene, Y. Johnson and R. Miller, 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (3) : 1394-1404.
- Schwartz, T., W. Kohnen, B. Jansen and U. Obst, 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. 43:325-335.
- Vandamme, P., E. Vercauteren, C. Lammens, N. Pensart, M. Ieven, B. Pot, R. Leclercq and H. Goosens, 1996. Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(10):2572-2576.
- van den Bogaard, A.E. and E.E. Stobberingh, 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14:327-335.