

Mise en évidence de l'antibiorésistances des coliformes par différentes concentrations d'antibiotiques

Sophie Haenn¹, Heberte Accrombessi¹, Gwenaëlle Lavison¹ et Laurent Moulin^{1*}.

¹ CRECEP, 144 Avenue Paul Vaillant Couturier, 75014 Paris

* laurent.moulin@crecep.fr

La présence de médicaments dans l'environnement est citée comme étant une menace émergente dans le rapport l'Agence de l'Eau Seine Normandie de décembre 2004, intitulé « Menaces émergentes pour l'eau potable. Application au cas de l'agglomération parisienne ».

Les premiers travaux indiquent que les concentrations retrouvées dans le milieu sont de l'ordre du nanogramme par litre (Ollers *et al.* (2001), Miao *et al.* (2002), Castiglinoi *et al.* (2005), Lee *et al.* (2005), Santos *et al.* (2005), Paffoni C. *et al.* (2006), très loin des concentrations inhibitrices utilisées en traitement (de l'ordre de 25-100 µg/ml). Si on sait que des concentrations sub-inhibitrices ont parfois des effets sur le métabolisme des cellules (par exemple sur la formation de biofilm, voir Fonseca *et al.* (2004), thèse de L. Moulin (2003) ou sur l'apparition de résistances (Nagai *et al.* 2001), on peut légitimement s'interroger sur l'influence de ce type de concentrations dans l'environnement :

- i) Facilitent-elles l'apparition de résistance ?
- ii) Empêchent-elles la perte des gènes de résistance ?
- iii) Facilitent-elles l'échange de gènes de résistance entre bactéries ?

C'est pour répondre à ces questions et caractériser l'influence du milieu hydrique sur ces mécanismes génétiques que nous testerons en culture l'impact des concentrations d'antibiotiques identifiées.

Méthodologie proposée ?

Phase 1 – Mise au point de la méthodologie : la première phase de cette étude consistera à adapter et à compléter les protocoles analytiques de détermination de traces de substances médicamenteuses, qui sont en cours de développement depuis quelques mois au CRECEP. Actuellement, 16 antibiotiques appartenant à diverses familles dont les sulfamides, les macrolides, les bêtalactamines et les tétracyclines sont en cours d'études. Nous proposons d'étendre ou de modifier les antibiotiques sélectionnés pour l'étude afin de rendre compte au mieux de leur éventuelle présence dans les eaux hospitalières.

Phase 2 – Recherche d'antibiotiques dans les eaux résiduaires : une fois les protocoles analytiques validés, une étude des teneurs en antibiotiques permettra de quantifier les concentrations des rejets. Cette étude se déroulera principalement sur des rejets hospitaliers au niveau des émissaires de la SAP.

Phase 3 - Recherche en parallèle de bactéries antibiorésistantes dans les eaux résiduaires : de façon parallèle à la phase 2, nous identifierons les bactéries résistantes dans les mêmes échantillons en ne travaillant spécifiquement que sur les bactéries identifiées comme coliformes par la méthode normée. Pour identifier la résistance à quelques antibiotiques fréquents (Quinolones, tétracyclines et β-lactames) nous utiliserons une méthode par les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), permettant de connaître les niveaux de résistances des souches isolées.

Phase 4 – Caractérisation des souches : par séquençage d'une partie du gène codant pour l'ARN 16S, nous caractériserons pour certaines souches le genre bactérien. En utilisant la PCR nous caractériserons également leurs résistances d'un point de vue moléculaire. Cette caractérisation s'intéressera à l'origine de la résistance (mutation de la cible, gène ...) ainsi qu'à sa position (plasmide, transposons, chromosome...)

Phase 5 – Facteurs influant sur la sélection des gènes de résistance : Enfin, en utilisant les souches isolées, nous testerons l'influence du milieu et des concentrations d'antibiotiques déterminées sur la sélection des gènes de résistances. Trois grands mécanismes seront suivis :

- La perte de la résistance dans un milieu sans ATB ou dans un milieu contenant une concentration d'ATB sub-inhibitrice
- L'apparition de résistances après culture dans un milieu sans ATB ou dans un milieu contenant une concentration d'ATB sub-inhibitrice
- Le transfert de gènes de résistance entre souches différentes dans des milieu avec ou sans ATB.

Résultats

Les phases 1 et 2 sont actuellement en cours.

Les Phases 3 et 4 ont été initiées lors du 4e trimestre 2007, des prélèvements ont été effectués en Seine au niveau des ponts de Tolbiac et du Garigliano, ainsi qu'au niveau des prises d'eau des usines de Joinville et d'Ivry. Ces prélèvements s'échelonnent entre octobre et décembre.

Des prélèvements spécifiques ont également été réalisés au niveau d'un hôpital de l'AP-HP en novembre.

Au total 184 souches ont été analysées d'un point de vue de leur résistance aux 4 antibiotiques sélectionnés (ampiciline, tétracycline, triméthoprime et acide nalidixique). Des CMI encadrant les doses couramment utilisées dans le cadre de traitements prophylactiques nous ont permis de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices de toutes les souches identifiées (Figure 1 : principe de la CMI)

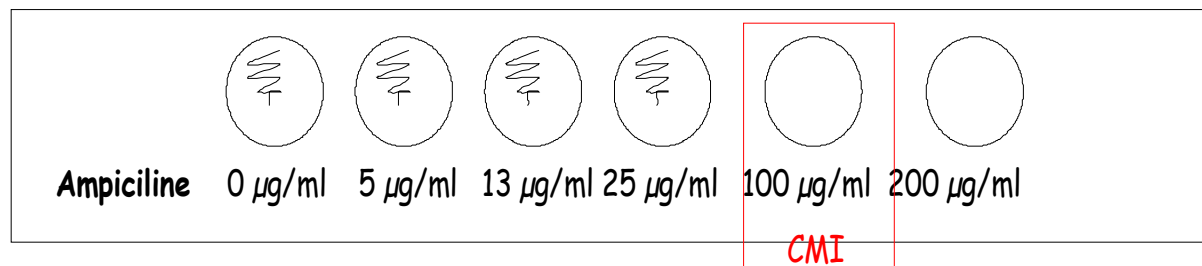


Figure 1 : Principe de la CMI. Des boîtes de milieu de culture contenant des concentrations croissantes d'antibiotiques sont utilisées pour faire croître la souche d'intérêt. La concentration la plus faible inhibant complètement la croissance de la souche est appelée Concentration Minimale Inhibitrice.

Pour chaque antibiotique, le comité Français d'antibiogramme a défini des niveaux de résistance qui définissent une souche comme sensible ou résistante. En utilisant ces niveaux, nous avons pour chaque milieu un profil des bactéries résistantes. Les résultats pour la Seine et pour les rejets hospitaliers sont présentés sur la figure 2.

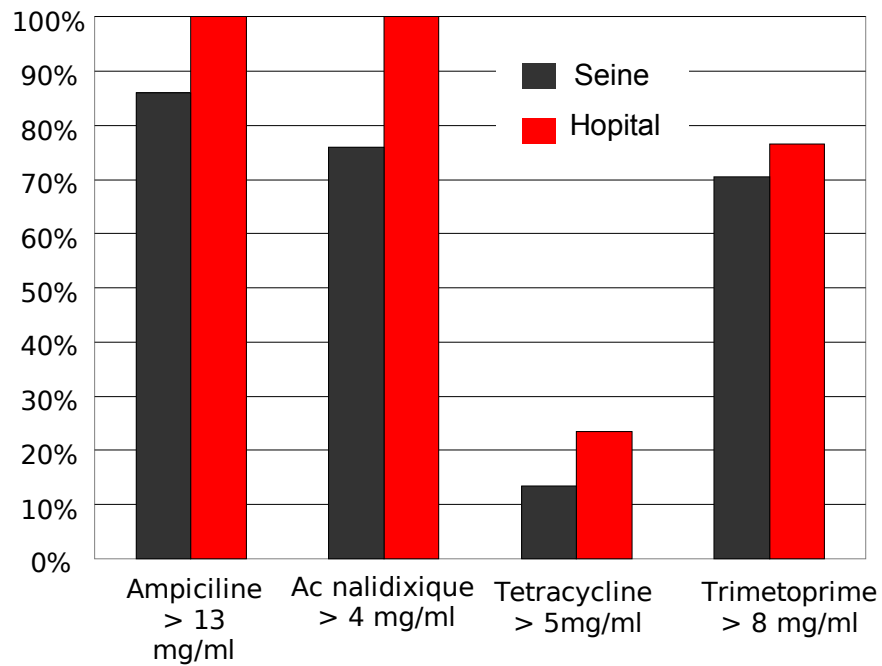


Figure 2 : Pourcentage de souches résistantes, aux niveaux définis pas le comité Français d'antibiogramme en Seine et en rejet hospitalier.

Néanmoins ces niveaux sont définis pour des souches hospitalières, et en utilisant la méthode des disques d'inhibition, c'est pourquoi nous nous sommes également placés d'un point de vue d'une dose maximale utilisable (4 fois la CMI classique de la littérature). Les résultats sont présentés figure 3.

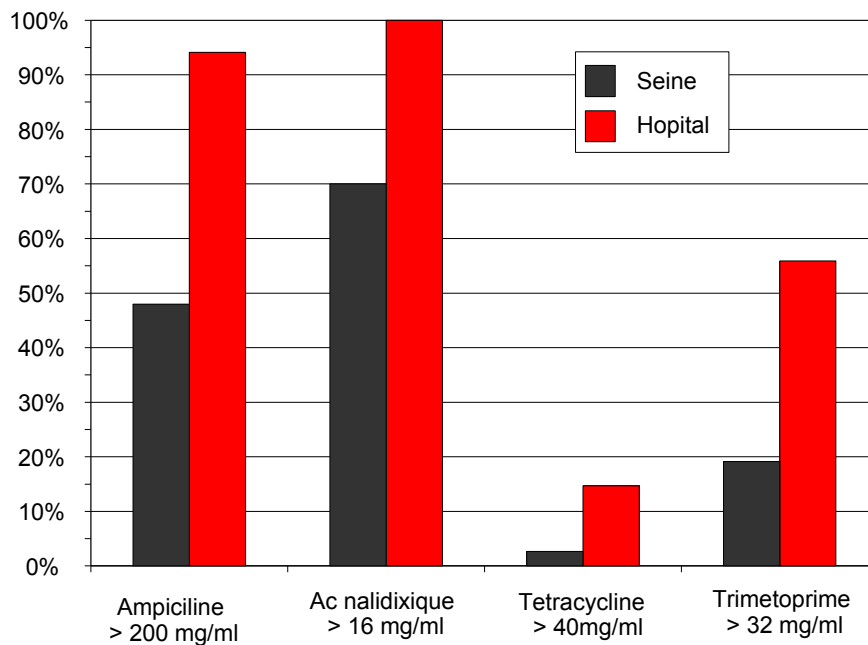


Figure 3 : Pourcentage de souche résistantes, aux niveau maximal de la CMI en Seine et en rejet hospitalier.

Il est intéressant de noter que la différence entre hôpital et Seine est beaucoup plus marquée à ces niveaux de concentrations élevées. Ceci indique que les souches isolées à partir des rejets hospitaliers sont non seulement plus souvent résistantes, mais également résistantes à des concentrations en antibiotiques plus importantes.

Conclusions

Certaines souches sont sélectionnées en vue d'une identification moléculaire de l'espèce et du genre. Les premiers résultats montrent que les genres *Aeromonas* et l'espèce *E. Coli* sont les plus fréquemment retrouvés.

En utilisant les souches ainsi sélectionnées, des expériences quant à l'influence des concentrations sub-inhibitrices sur les résistances sont maintenant en cours.

Références bibliographiques :

- Rapport de l'Agence de l'Eau Seine Normandie de décembre 2004, Menaces émergentes pour l'eau potable. Application au cas de l'agglomération parisienne.
- Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli D., Zuccatp E. (2005). *J. Chrom. A.* 1092 , 206-215.
- Lee Hing-Biu, Peart T.E., Svoboda. (2005). *J. Chrom. A.* 1094, 122-129.
- Miao Xiu-Shneg, Koenig B.G. Metcalfe C.D. (2002). *J. Chrom. A.* 952 , 139-147.
- Ollers S., Singer H.P., Fassler P., Muller S.R.. (2001). *J. Chrom. A.* 911 , 225-234.
- Paffoni C., Welté B., Gousailles M., Montiel M. (2006) *European Journal of Water Quality*, 37, 21-38.
- Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., Callejon M. (2005). *Analytica Chemica Acta.* 550, 116-122.
- A. P. Fonseca, C. Extremina, A. F. Fonseca and J. C. Sousa ; Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*, *J Med Microbiol* 53 (2004), 903-910;
- Nagai K, Davies T.A , Dewasse B.E., Jacobs M.R. and Appelbaum P.C. Single- and multi-step resistance selection study of gemifloxacin compared with trovafloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae* ; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48, 365-374
- World Health Organization. 2004 . Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Third global report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002. Document WHO/HTM/TB/2004.343. World Health Organization, Geneva, Switzerland.