

# Evaluation de la résistance aux antibiotiques des bactéries *E. coli* dans les eaux du bassin de la Seine.

Pierre Servais, Stéphanie Duchateau et Sophie Reis

*Ecologie des Systèmes Aquatiques,*  
*Université Libre de Bruxelles,*  
*Campus Plaine, CP 221,*  
*1050 Bruxelles, Belgique*  
*e-mail : pservais@ulb.ac.be*

1. Introduction .....	1
2. Méthodes .....	2
2.1. Echantillonnage .....	2
2.2. Détermination de l'antibiorésistance des <i>E. coli</i> .....	2
3. Résultats .....	4
4. Conclusions .....	8
5. Références .....	8

## 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 utilisé comme compléments alimentaires dans l'élevage. On rencontre couramment des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les milieux où les antibiotiques sont utilisés mais également dans divers environnements comme le milieu aquatique. La présence de bactéries pathogènes antibiorésistantes entraîne un risque sanitaire accru si les infections qu'ils causent ne sont pas guérissables grâce à un traitement aux antibiotiques. Ce travail s'est donc intéressé à la présence de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques dans les eaux du bassin de la Seine.

L'étude de ce phénomène a été réalisée en analysant la résistance aux antibiotiques de souches d'*Escherichia coli* isolées à partir d'échantillons d'eaux de rivière. En effet, cette espèce, appartenant au groupe des coliformes fécaux, est utilisée couramment comme indicateur de contamination fécale. On fait l'hypothèse que la présence de souches d'*E. coli* résistantes en milieu aquatique témoigne de la probabilité de présence de pathogènes d'origine fécale antibiorésistants. Différents milieux aquatiques, dont l'origine de la contamination fécale était connue ou du moins fortement présumée, ont également été échantillonnés afin de déterminer la source principale des bactéries fécales antibiorésistantes

trouvées dans les rivières: eaux usées domestiques (*E. coli* d'origine humaine), eaux usées hospitalières (*E. coli* d'origine humaine, population massivement traitée aux antibiotiques), eaux de surface soumises au lessivage de terres agricoles (*E. coli* provenant d'animaux d'élevage) et enfin ruisseaux forestiers (*E. coli* provenant d'animaux sauvages non traités aux antibiotiques).

## **2. Méthodes**

### **2.1. Echantillonnage**

L'analyse de la résistance aux antibiotiques des *E. coli* a été réalisée à la fois sur des échantillons d'eau de rivières et sur des échantillons d'eau dont l'origine de la contamination fécale était connue ou du moins présumée. Des échantillons ont été prélevés dans les grandes rivières du bassin de la Seine en amont de l'agglomération parisienne : la Seine (Choisy-le-Roi), la Marne (Neuilly-sur-Marne) et l'Oise (Méry-sur-oise) et dans la Seine à Paris. Un échantillon de la Blaise (affluent de la Marne) et plusieurs échantillon de l'Essonne ont également été analysés ainsi qu'un échantillon prélevé dans le Robec, 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 à l'entrée et à la sortie de différentes 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).

### **2.2. Détermination de l'antibiorésistance des *E. coli***

La méthode utilisée dans ce travail pour déterminer la résistance aux antibiotiques est la méthode de diffusion de disques (méthode standardisée et préconisée par le Comité Français de l'Antibiogramme). Pratiquement, elle consiste à isoler tout d'abord des souches d'*Escherichia coli* à partir des boîtes de cultures initiales. Pour chaque échantillon, dix souches pures environ sont utilisées pour l'étude de l'antibiorésistance. Celles-ci sont isolées à partir des milieux de culture Chromocult Coliform Agar ou Fluorocult. Chaque souche isolée est placée dans un tube stérile contenant 20 ml de milieu liquide Trypticase Soy Broth (TSB). Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une solution de turbidité égale ou supérieure à 0,5 unités McFarland, équivalant environ à 10<sup>8</sup> UFC/ml. A partir de la culture pure, on dilue la solution au 1/100 dans du Ringer stérile afin d'obtenir une densité de 10<sup>6</sup> UFC/ml et on ensemence les boîtes avec l'agar de Mueller-Hinton (gélose riche composée d'infusion de viande de bœuf, de peptone et d'amidon). Après séchage des boîtes, les disques de papier contenant des doses connues des antibiotiques à tester sont appliqués sur la gélose (six disques par boîte de Pétri) au moyen d'un distributeur. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition (zone où une croissance bactérienne n'est pas visible) est réalisée pour chaque antibiotique après 18 à 24 h d'incubation à 37 °C. A partir de ce diamètre, il est possible de déterminer la sensibilité de la souche vis-à-vis de l'antibiotique ; plus la souche est résistante, plus la zone d'inhibition est faible.

Le Tableau 1 reprend la liste des antibiotiques testés dans cette étude. Notons que tous les antibiotiques n'ont pas été testés sur tous les échantillons analysés. Les antibiotiques tels que la ceftazidime, la norfloxacin et l'ofloxacin ont été testés sur un moins grand nombre d'échantillons que les autres.

<b>Antibiotique</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Domaine d'utilisation</b>	<b>Classe</b>
Amoxicilline	AMX	Hospitalier, domestique et vétérinaire	$\beta$ -lactame (famille des pénicillines)
Amoxicilline/ acide clavulanique	AMC	Hospitalier, domestique et vétérinaire	$\beta$ -lactame (famille des pénicillines et des clavames)
Céfaloine	CF	Hospitalier et vétérinaire	$\beta$ -lactame (famille des céphalosporines 1 <sup>ère</sup> génération)
Céfotaxime	CTX	Hospitalier	$\beta$ -lactame (famille des céphalosporines 3 <sup>ème</sup> génération)
Ceftazidime	CAZ	Hospitalier	$\beta$ -lactame (famille des céphalosporines 3 <sup>ème</sup> génération)
Ceftiotur	XNL	Vétérinaire	$\beta$ -lactame (famille des céphalosporines 2 <sup>ème</sup> génération)
Amikacine	AN	Hospitalier	Aminoside
Gentamicine	GM	Surtout vétérinaire	Aminoside
Tétracycline	TE	Hospitalier, domestique et vétérinaire	Tétracycline
Acide nalidixique	NA	Hospitalier et domestique	Quinolone
Ciprofloxacine	CIP	Hospitalier et domestique	Fluoroquinolone
Enrofloxacin	ENR	Vétérinaire	Fluoroquinolone
Lévofloxacine	LVX	Hospitalier et domestique	Fluoroquinolone
Norfloxacine	NOR	Hospitalier et domestique	Fluoroquinolone
Ofloxacine	OFX	Hospitalier et domestique	Fluoroquinolone
Cotrimoxazole	SXT	Hospitalier, domestique et vétérinaire	Sulfamide et diaminopyridine

Tableau 1. Récapitulatif des antibiotiques testés, leur utilisation et leur classe.

### 3. Résultats

Au total sur l'ensemble des échantillons analysés, 662 souches de *E. coli* ont été isolées et la résistance de chaque souche aux antibiotiques a été testée. Une petite majorité (55,3%) était sensible à tous les antibiotiques ; nous avons donc trouvé 44,7 % de souches d'*E. coli* qui étaient résistantes à au moins un antibiotique. Le Figure 1 reprend, tous échantillons confondus, le pourcentage de résistance à chacun des antibiotiques testés.

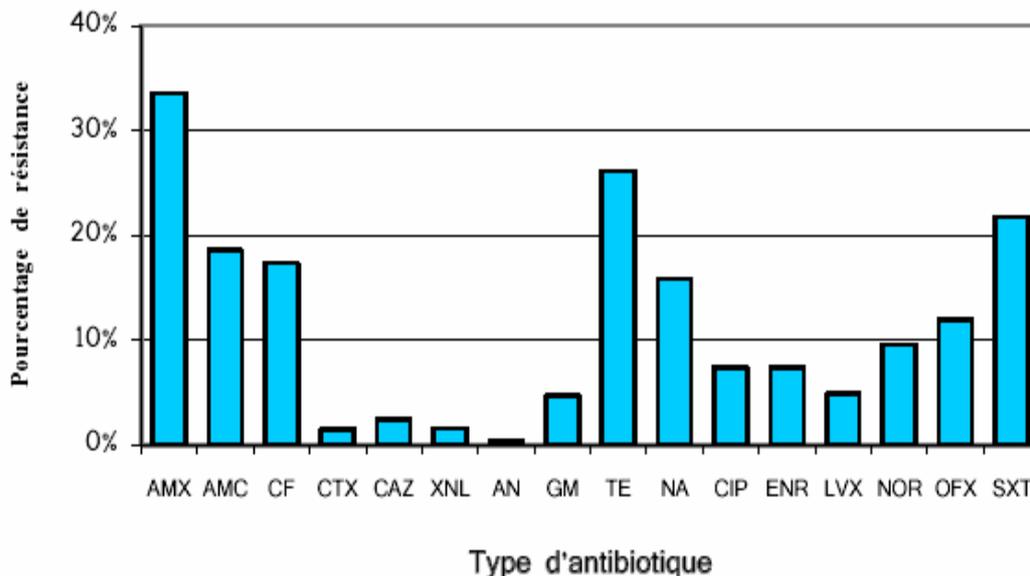


Figure 1. Pourcentage des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques

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 : plus d'un tiers des souches étudiées sont résistantes à cet antibiotique. 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 explique 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 (18,6%). Ce résultat n'a rien d'étonnant vu l'activité de l'acide clavulanique: inhibiteur de  $\beta$ -lactamase. L'association amoxicilline/acide clavulanique a donc une activité accrue envers un grand nombre de souches productrices de  $\beta$ -lactamase, résistantes aux  $\beta$ -lactames. 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 17,4%. 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.* (2004) sur des souches issues de rejets fécaux d'animaux domestiques et sauvages, de STEPs municipales et d'eaux de surface et par Reinthaler *et al.* (2003) sur des souches issues de STEPs 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 n'est pas étonnant. En effet, cet antibiotique appartient aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération. Celles-ci sont moins résistantes aux  $\beta$ -lactamases que les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération (dont fait partie le ceftiotur) et de 3<sup>ème</sup> 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 0,5% 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 naturelles.

Une grande proportion des souches étudiées a montré une résistance à la tétracycline (TE) (26,1%). 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 ne sont pas étonnants suite à 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) (15,9%), à l'ofloxacin (OFX) (12%), à la norfloxacine (NOR) (9,6%), à la ciprofloxacine (CIP) et l'enrofloxacin (ENR) (7,4%) et finalement à la lévofloxacine (LVX) (4,9%). 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 lévofloxacine présente le taux de résistance le plus faible étant donné son utilisation récente par rapport aux autres molécules. Comme la consommation des fluoroquinolones a considérablement augmenté ces dernières années, une augmentation de leur taux de résistance est donc attendue d'ici quelques années.

Le cotrimoxazole (SXT) fait partie des antibiotiques testés présentant un taux de résistance relativement élevé (21,7%). 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).

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 2 présente le pourcentage de résistance aux antibiotiques pour les souches isolées des eaux de rivières et des diverses sources de contamination fécale étudiées. La norfloxacine, l'ofloxacin et la ceftazidime n'ont pas été testées sur les souches d'*E. coli* provenant de ruisseaux en zones rurales et en zones forestières. Ces antibiotiques n'ont dès lors pas été pris en compte dans cette analyse.

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.

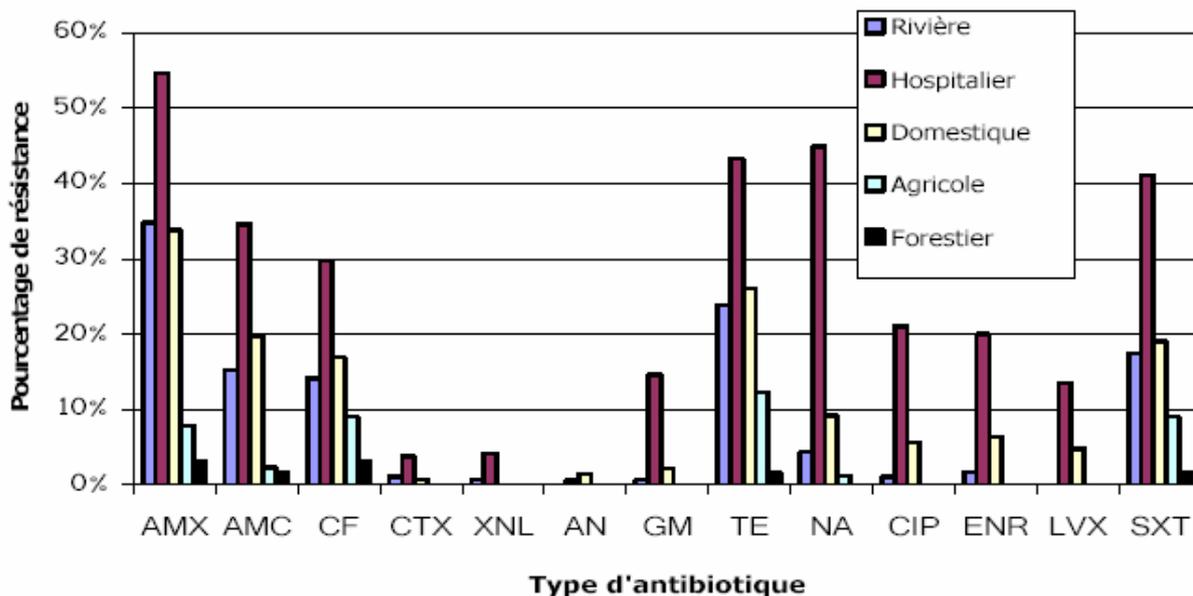


Figure 2. Pourcentage des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques par type de milieu

Les rivières présentent des souches d'*E. coli* résistantes à l'ensemble des antibiotiques testés, à l'exception de la lévofloxacine. En visualisant les profils de résistance présents au niveau des différents types de milieu, les eaux usées hospitalières et domestiques seraient principalement à l'origine de la présence de souches d'*E. coli* antibiorésistantes dans les rivières. En effet, les souches issues des ruisseaux agricoles ne présentent de la résistance qu'envers quelques antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire et ce, à de faibles taux. Les ruisseaux agricoles ne peuvent donc pas être la source principale des bactéries antibiorésistantes présentes dans les rivières.

De très faibles taux de résistance ont été observés dans les échantillons issus des ruisseaux forestiers. Cette présence de bactéries antibiorésistantes est très étonnante puisque leur contamination fécale ne provient que des animaux sauvages présents en forêt. Différentes explications à la présence de bactéries antibiorésistantes dans ces échantillons sont possibles. D'une part, les bactéries peuvent devenir résistantes suite à une mutation spontanée, cette acquisition de résistance ne requérant donc pas la présence de l'antibiotique dans le milieu. D'autre part, les ruisseaux forestiers, et donc nos échantillons, ne sont pas à l'écart d'une contamination fécale d'une autre origine que celle des animaux sauvages.

En faisant abstraction des résistances présentes dans les ruisseaux forestiers, les résistances envers l'amoxicilline (AMX), l'amoxicilline/acide clavulanique (AMC), la céfalotine (CF), la tétracycline (TE), l'acide nalidixique (NA) et le cotrimoxazole (SXT) sont présentes dans tous les types de milieu. A l'exception de l'acide nalidixique, tous les antibiotiques mentionnés ci-dessus sont en effet utilisés tant en médecine humaine que vétérinaire. L'acide nalidixique a été retiré de la vente en médecine vétérinaire. Malgré cela, il est encore possible de rencontrer des souches résistantes à ce dernier dans les ruisseaux à influence agricole étant donné la persistance de ces phénomènes d'antibiorésistance.

Des résistances à la céfotaxime (CTX) ont principalement été recensées à partir de souches issues de rejets hospitaliers (3,8%). Ceci n'est pas étonnant compte tenu de son usage principal en milieu hospitalier. Bien que le ceftiofur (XNL) et l'enrofloxacin (ENR) soient strictement utilisés en médecine vétérinaire, des souches résistantes envers ces deux antibiotiques ont été retrouvées dans des échantillons exempts de toute contamination animale, à savoir en rejets hospitaliers. Les taux de résistance du ceftiofur sont du même ordre que les taux obtenus envers la céfotaxime. Les souches

résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céfotaxime) sont pour la plupart résistantes aux céphalosporines de 2<sup>ème</sup> 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 (0,5%). 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 (14,6%) ; ceci est vrai également pour la ciprofloxacine (CIP) (21,1%).

Notre a également permis d'étudier le phénomène de multirésistance. Pour rappel, une souche est considérée comme multirésistante lorsqu'elle présente une résistance à au moins deux antibiotiques. Sur l'ensemble des souches d'*E. coli* étudiées, c'est-à-dire 662 souches, 44,7 % étaient résistantes à au moins un des antibiotiques testés lors de notre étude. Le taux de résistance à au moins deux antibiotiques était de 36,9% ce qui, par conséquent, signifie que seules 7,8% des souches étaient résistantes à uniquement un antibiotique. Il semble donc que, lorsqu'une bactérie est résistante à un antibiotique, elle est 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 inquiétant de souches résistantes à au moins un antibiotique, à savoir 82%.

L'étude de la multirésistance a également été réalisée en séparant les échantillons par type de milieu. Les pourcentages suivant ont été calculés: pourcentage de souches résistantes à au moins un antibiotique, à au moins deux antibiotiques et à au moins cinq antibiotiques (Figure 3).

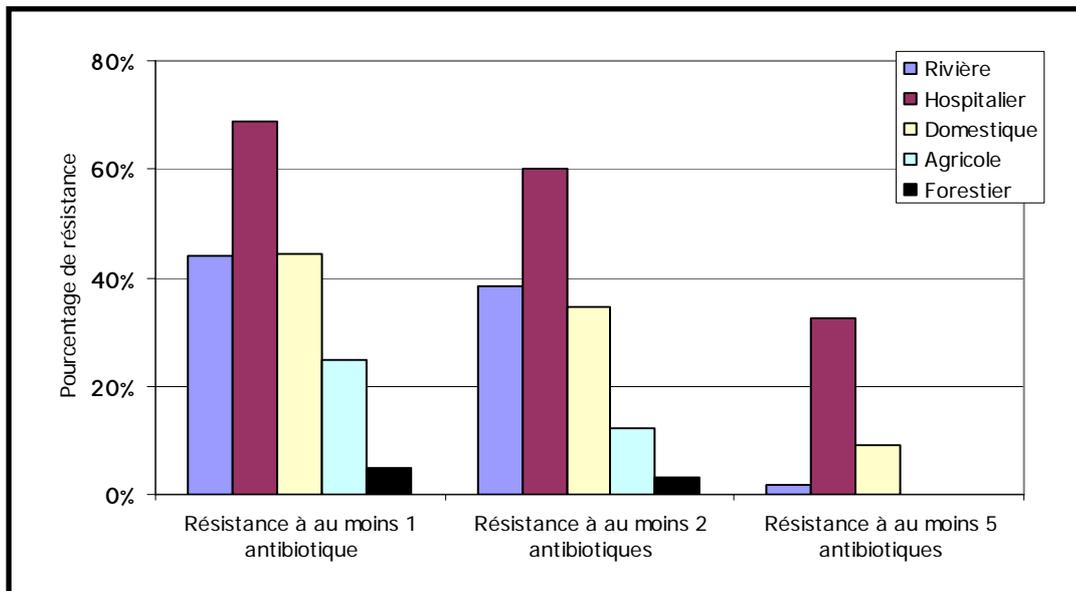


Figure 3. Pourcentages de souches *E. coli* résistantes à au moins 1, 2 et 5 antibiotiques dans les différents milieux étudiés.

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 rurales 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 (60% et 32,4%). Les rivières et les eaux usées domestiques contiennent également un nombre important de souches résistantes à au moins deux

antibiotiques (38,6% et 34,5% respectivement) mais un nombre plus faible de souches résistantes à au moins cinq antibiotiques (1,6% et 9,1% 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 minimum deux antibiotiques mais à un taux plus faible (12,4%) 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.

## 4. Conclusions

L'étude de la résistance de souches d'*Escherichia coli* 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. L'existence de souches antibiorésistantes d'*E. coli* dans les rivières indique que d'autres bactéries d'origine fécale antibiorésistantes potentiellement 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. A ce sujet, les échantillons de rivière se rapprochent plutôt des échantillons de type « domestique » malgré de grandes variations de pourcentage de souches résistantes entre les échantillons. 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 dans l'avenir dans les travaux du PIREN

## 5. Références

- 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.
- Garcia-Armisen, T., Touron, A., Petit, F. & Sevais, P. 2005. Sources of microbiological contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries*. 28: 627-633
- Karaca, Y., N. Coplu, A. Gozalan, O. Oncul, B.E. Cital 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.
- 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.

Reinthalder, 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.