Zeitschrift: Archives des sciences [2004-ff.]

Herausgeber: Société de Physique et d'histoire Naturelle de Genève

Band: 61 (2008)

Heft: 2

Artikel: Rôle des résidus d'antibiotiques dans l'environnement hydrique : sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes de genres Aeromonas, Acinetobacter et Legionella

Autor: Corvaglia, Anna Rita / Demarta, Antonella / Gaia, Valeria

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-738308

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Rôle des résidus d'antibiotiques dans l'environnement hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes

des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*

Anna Rita CORVAGLIA[1], **Antonella DEMARTA**[2], **Valeria GAIA**[2], **Raffaele PEDUZZI**[2]

Ms. reçu le 14 mars 2008, accepté le 12 mai 2008

Abstract

Role of residual antibiotics in aquatic environment on the selection and diffusion of bacterial resistances of *Aeromonas, Acinetobacter* and *Legionella*. - *Antibiotic resistant bacteria and antibiotics are discharged in various amounts in the environment as a result of the increasing and often indiscriminate use of antibiotics in medical, veterinary and agricultural practices. Surface waters are the main receptacle for these pollutants and are the major source of water, directly or indirectly used for human and animal consumption.*

The aim of this study, carried out within the National Research Program 49 «Antibiotic Resistance», was to evaluate the role of residual antibiotic compounds in water on emergence and persistence of resistant bacteria. Research was focused on three bacterial genera, Aeromonas, Acinetobacter, *and* Legionella, *largely diffused in the aquatic environment and showing pathogenic properties towards human beings and animals, and three antibiotic families (beta-lactams, quinolones / fluoroquinolones and macrolides) mainly used in human medicine. Phenotypic resistance analysis in various aquatic environments has highlighted the presence of resistant stains in the most contaminated waters.* Aeromonas *resistant to the fourth generation cephalosporins could be isolated from hospital waste waters and from waste water treatment plants, while clinical strains proved to be more susceptible. On the contrary, environmental* Acinetobacter *were more susceptible than those of clinical origin. For* Legionella *strains, MIC values were different according to the genetic type (Sequence-based Type) and not according to the origin. A significant correlation between concentrations of antibiotic compounds measured and resistant* Aeromonas *and* Acinetobacter *strains was highlighted in hospital waste waters.*

Finally, the diffusion of class 1 integrons, genetic and mobile element, in Aeromonas *strains isolated from various aquatic environments were evaluated and correlated with their origin.*

Keywords: *Antibiotic compounds, aquatic environments, resistant bacteria, integrons,* Aeromonas, Acinetobacter, Legionella.

Résumé

Les résidus d'antibiotiques et les bactéries résistantes sont déversés en quantités variées dans l'environnement, ceci en conséquence d'une utilisation massive et souvent indiscriminée de ces substances dans les domaines médicaux, vétérinaires et en agrochimie. Les eaux de surface sont le réceptacle majeur de ces polluants et représentent également les sources d'eau directement ou indirectement utilisées pour la consommation humaine et animale.

[1] *Centre Médical Universitaire, Département de Microbiologie et Médecine Moléculaire, Université de Genève, 1 Rue Michel-Servet, 1211 Genève 4, Suisse.* E-mail: anna.corvaglia@unige.ch

[2] *Institut Cantonal de Microbiologie, Via Mirasole 22A, 6500 Bellinzone, Suisse.* E-mail: antonella.demarta@ti.ch; valeria.gaia@ti.ch; raffaele.peduzzi@ti.ch

L'objectif de ce travail, effectué dans le cadre du Programme National de Recherche 49 «Antibiotic Resistance», a été d'évaluer, à l'aide d'outils empruntés à la bactériologie classique et à la microbiologie moléculaire, le rôle des résidus d'antibiotiques présents dans l'environnement hydrique dans l'émergence et / ou la persistance de bactéries résistantes.
La recherche a été concentrée sur trois genres bactériens pathogènes pour l'homme et l'animal, à savoir les Aeromonas, *les* Acinetobacter *et les* Legionella *et trois familles d'antibiotiques, les bêta-lactames, les quinolones / fluoroquinolones et les macrolides, abondamment utilisées en médecine humaine.*
L'analyse phénotypique de la résistance dans les divers milieux hydriques a mis en évidence la présence de souches résistantes dans les eaux les plus contaminées. Des Aeromonas *résistants aux quatre générations de céphalosporines ont pu être isolés des eaux usées des hôpitaux et des stations d'épuration, tandis que les souches d'origine clinique se sont avérées beaucoup plus sensibles. Au contraire, les* Acinetobacter *de l'environnement hydrique sont apparus moins résistants que ceux d'origine humaine. Pour les* Legionella, *les valeurs des CMI différaient en fonction du type génétique de la souche (Sequence-based Type) et non de leur origine. Une corrélation statistique significative entre concentrations de ciprofloxacine et souches résistantes isolées a pu être mise en évidence dans les eaux usées des hôpitaux.*
*Enfin, l'étude de la diffusion des intégrons de classe 1, éléments génétiques mobiles, chez les souches d'*Aeromonas *provenant des divers environnements hydriques étudiés, a été effectuée et mise en relation avec leur lieux d'isolement.*
Mots clés: *Résidus d'antibiotiques, environnements aquatiques, bactéries résistantes, intégrons,* Aeromonas, Acinetobacter, Legionella.

Introduction

La première constatation de l'effet inhibiteur de la moisissure *Penicillium notatum* sur des cultures de *Staphylococcus aureus* par Fleming en 1928 (publication en 1929), puis l'avènement de la forme stable de la pénicilline en 1940 par E.B. Chain et H.W. Florey, ont ouvert la voie à la découverte de nombreux antibiotiques.

Des perspectives de traitements, jusqu'alors insoupçonnées, ont ainsi rapidement émergé et des maladies mortelles comme la tuberculose, la diphtérie, la pneumonie ou encore la syphilis ont pu être soignées. Dès lors et jusqu'à nos jours, les progrès de la médecine et de la pharmacologie n'ont cessé de donner lieu à la mise sur le marché d'une variété de substances antimicrobiennes destinées à traiter les infections.

Malheureusement, l'usage trop souvent inadapté et inconsidéré de ces médicaments dans des domaines aussi variés que la médecine humaine, vétérinaire et l'agrochimique (Göbel et al. 2005; Stamm 2005), couplé à la capacité d'adaptation des bactéries et aux possibilités de transferts génétiques ont compromis l'espoir apporté par ces nouvelles substances et fait progressivement place à une constatation préoccupante: l'emploi inconsidéré des antibiotiques contribue au phénomène de l'émergence et de la dissémination de germes résistants, ainsi qu'à des échecs de l'antibiothérapie. En Suisse par exemple, la consommation humaine globale d'antibiotiques peut atteindre des valeurs proches des 40 tonnes par année (Trust Office of Swiss Importers of Antibiotics, (TSA) Bern, Switzerland 1998). Plus étonnant encore et nonobstant la loi entrée en vigueur depuis 1999 interdisant l'emploi d'antibiotiques comme stimulateurs de croissance, le premier recensement systématique des ventes d'antibiotiques à usages vétérinaires fait acte de 49 tonnes d'antibiotiques vendus pour la seule année 2004 (Swissmedic 2004). Ce chiffre tend même à augmenter puisque ce recensement révèle une hausse de la vente globale d'antibiotiques à usage vétérinaire s'établissant à 72 tonnes pour la seule année 2007 (Swissmedic 2007).

L'utilisation commune et à grande échelle des antibiotiques dans les domaines médicaux, vétérinaires et en agrochimie, soulève pour le monde scientifique un nombre important de questions sur le devenir et l'effet de ces substances dans l'environnement, notamment dans l'environnement aquatique. En effet, les antibiotiques et les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent atteindre l'environnement par le biais des égouts, des stations d'épuration et par l'épandage du lisier sur les champs (Ternes 1998). Via ces principales voies d'entrée, ces substances et ces micro-organismes peuvent, finalement, atteindre les eaux souterraines et les eaux de surface, deux sources hydriques fondamentales pouvant être, soit directement, soit indirectement, utilisées pour l'approvisionnement en eau et pour la consommation humaine et animale.

L'objectif poursuivi par ce travail de recherche, financé par le Fond National de Recherche Scientifique Suisse dans le cadre du projet sur la résistance aux antibiotiques (PNR 49) et effectué à l'Institut Cantonal de Microbiologie (ICM, Bellinzona), a été d'évaluer, à l'aide d'outils empruntés à la bactériologie classique et à la microbiologie moléculaire, si la présence, l'émergence et la persistance de bactéries résistantes dans l'environnement hydrique sont dues aux faibles concentrations d'antibiotiques contaminant l'eau, à une autre pression de sélection

non due aux antibiotiques ou à la stabilité des gènes de résistances et aux éléments de transferts génétiques. De part leur large distribution dans l'environnement aquatique, ainsi qu'à cause de leurs propriétés pathogènes pour l'homme et l'animal, les bactéries appartenant aux genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella* ont été choisies pour l'évaluation de la résistance dans les divers milieux hydriques contenant des concentrations différentes d'antibiotiques. Les antibiotiques déterminés dans l'environnement, ainsi qu'utilisés en laboratoire, appartiennent aux familles des bêta-lactames, des quinolones et fluoroquinolones et des macrolides, à savoir trois familles largement utilisées en médecine humaine. Le rôle joué par l'eau, comme niche écologique, où la pression de sélection exercée par les résidus d'antibiotiques peut agir sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes a été évalué et les risques liés à la santé humaine étudiés.

Matériels et méthodes

Lieux d'échantillonnage et isolement des souches bactériennes

Deux régions, ayant des consommations différentes d'antibiotiques (Filippini et al. 2006) ont été choisies pour effectuer les prélèvements, à savoir la ville de Zürich et le canton du Tessin. Les lieux d'échantillonnage ont été choisis de manière à retracer le circuit hydrique des résidus d'antibiotiques et des bactéries véhiculées par l'eau. Ainsi, les lieux d'échantillonnage choisis pour l'isolement des souches bactériennes comprenaient les eaux usées d'hôpitaux, les eaux souillées et assainies affluant et effluant de stations d'épuration, ainsi que les boues activées (phase biologique d'épuration) et des eaux de surface tels que fleuves, rivières et lacs.

Pour la recherche et l'isolement des *Aeromonas*, les échantillons d'eau ont été filtrés sur des membranes de 0.45 µm de porosité et ces dernières déposées sur le milieu selectif m-Aeromonas. Les colonies typiques apparaissent après 18-24 h. d'incubation à 30°C.

Les *Acinetobacter* ont été isolés à partir du milieu Herellea Agar (Jawad et al. 1994), soit par ensemencement direct de l'échantillon, soit après filtration sur membrane. Les colonies présentant l'aspect typique après 18-24 h. d'incubation à 30°C ont été confirmées par la galerie biochimique API 20NE ou par hybridation *in situ* avec une sonde spécifique au genre.
Pour la recherche et l'isolement de *Legionella* les échantillons ont été soit directement ensemencés sur le milieu sélectif GVPC, soit ensemencés après traitements thermique ou acide. La confirmation des colonies après 3-4 jours d'incubation à 37°C a été effectuée par le kit *Legionella* Latex Test.

Détermination des profils phénotypiques de résistance

Les antibiotiques utilisés englobent la pénicilline, l'ampicilline, l'imipenem, la céfazoline, la céfuroxime, la ceftriaxone, la céfépime, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine, la norfloxacine et enfin l'érythromycine et la clarithromycine. Les antibiogrammes ont été effectués selon les normes édictées par la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).
Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été obtenues par E-Tests.

Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* (HIS) a été utilisée, d'une part pour identifier les colonies suspectes d'*Acinetobacter*, et d'autre part pour dénombrer les *Aeromonas*, les *Acinetobacter* et les *Legionella* présents dans les différents milieux hydriques échantillonnés. Après filtration et fixation des échantillons, des sondes oligonucléotidiques spécifiques pour les trois genres bactériens considérés et marquées avec un fluorochrome (Cy3) ont été utilisées pour une réaction d'hybridation qui s'est effectuée sur lame. De part la complémentarité entre la sonde et le 16s ARNr cible, seules les bactéries réagissant avec la sonde peuvent être mises en évidence par microscopie à fluorescence.

Détection des intégrons de classe 1

L'ADN total des souches bactériennes a été obtenu en lysant les bactéries à 100°C pendant 10 min.
Le lysat a ensuite été utilisé dans une réaction PCR où l'amplification a été obtenue avec des amorces spécifiques (3'CS et 5'CS) flanquants les cassettes géniques insérées dans les intégrons de classe 1 (Recchia et Hall, 1997).

Résultats et discussion

La détermination du profil de résistance aux divers antibiotiques a été effectuée sur un total de 1324 souches, se subdivisant en 807 *Aeromonas*, 466 *Acinetobacter* et 51 *Legionella*, la grande majorité isolées des différents milieux aquatiques et certaines de provenance clinique.

Profil phénotypique de résistance dans les divers environnements hydriques: l'exemple des *Aeromonas*

L'analyse phénotypique de la résistance des *Aeromonas* (Fig. 1) a montré, et ceci pour l'ensemble des antibiotiques considérés, un pourcentage important de souches résistantes ou présentant un profil intermédiaire de résistance dans les eaux usées des hôpitaux analysés, ainsi que dans les boues activées des stations d'épuration, soit les milieux hydriques échantillonnés les plus riches en matières or-

ganiques, en micro-organismes et en résidus d'antibiotiques. Par contre, les souches d'*Aeromonas* d'origine clinique (isolées de patients) sont plus sensibles aux antibiotiques testés que les souches d'origine environnementale.

Il a été constaté que les boues activées de la station d'épuration récoltant entre autre les eaux souillées d'hôpitaux et de villes (STEP 1, Fig. 1), comportaient, en général, un taux plus élevé de souches phénotypiquement plus résistantes en comparaison aux échantillons prélevés de la station d'épuration récoltant les eaux à assainir d'une région montagneuse du nord du Tessin, dépourvue d'hôpitaux (STEP 2, Fig. 1). De la même manière, les eaux de surface analysées et récoltées peu après le déversement des eaux assainies sortant des stations d'épuration s'avèrent contenir une fréquence plus élevée de souches moins sensibles. Il apparaît ainsi, d'une part que les eaux usées des hôpitaux contribuent à la dissémination de souches phénotypiquement plus résistantes vers les stations d'épuration et d'autre part que les stations d'épuration jouent un rôle d'intermédiaire dans l'enrichissement en souches moins sensibles vers les eaux de surface. Dans les eaux de surface, le pourcentage de souches résistantes diminue, ceci probablement à cause de l'effet de dilution et de la diminution de la pression de sélection exer-

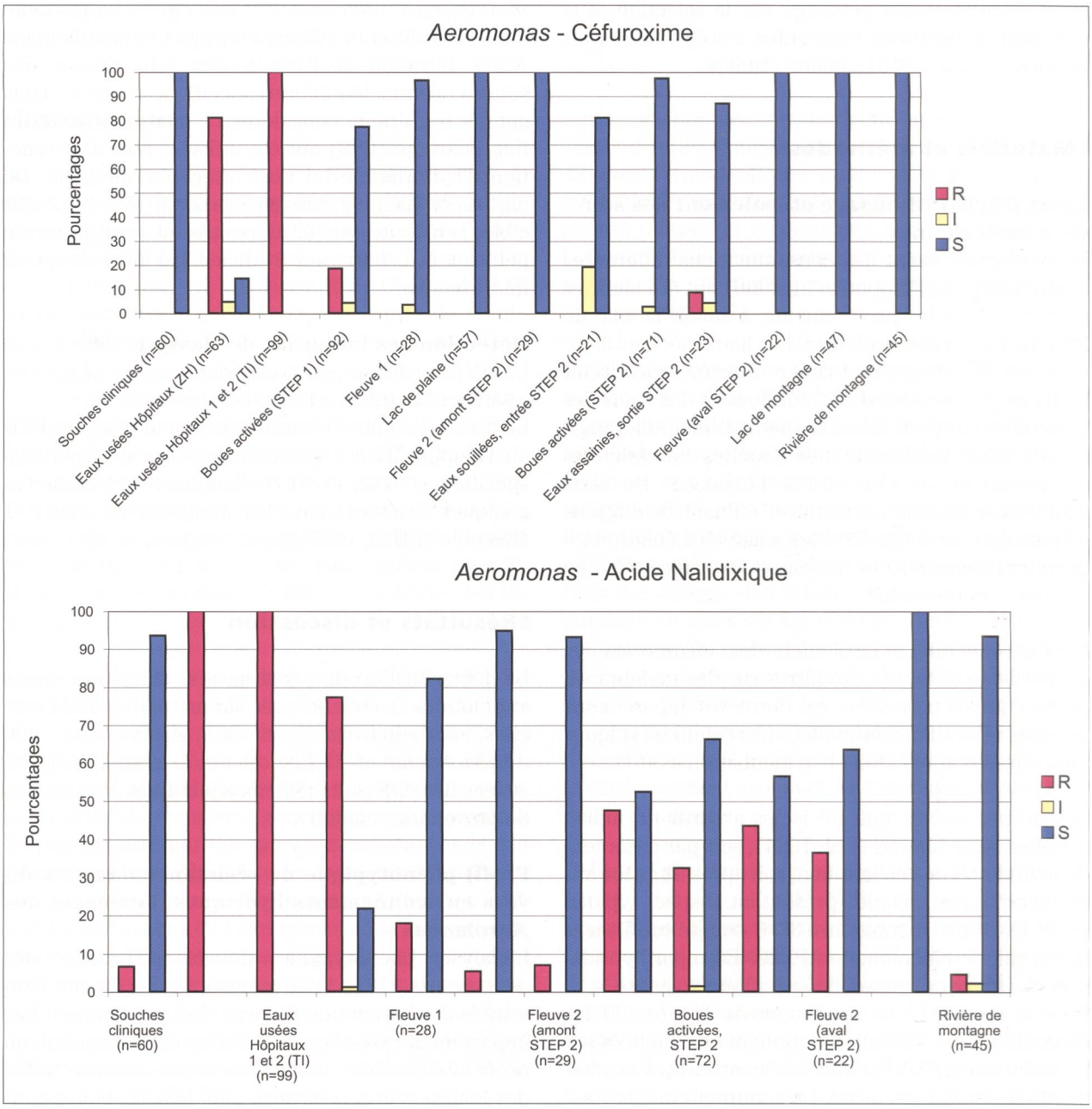

*Fig. 1. Pourcentages d'*Aeromonas *environnementaux et cliniques résistants (R), intermédiaires (I) et sensibles (S) à la céfuroxime et à l'acide nalidixique.*

cée par les résidus antimicrobiens. Ainsi, pour les *Aeromonas*, le pourcentage de souches résistantes apparaît être corrélé à la qualité de l'eau (Fig. 1)

Un cas particulier et non sans signification microbiologique a également pu être constaté dans les eaux usées d'un hôpital où, dans le but de réduire la charge bactérienne totale contaminante, les eaux usées sont traitées au chlore avant leur déversement dans les égouts. Après le traitement au chlore, le pourcentage de souches résistantes à la ceftriaxone et à la céfépime, soit des céphalosporines des 3e et 4e générations, augmente (Fig. 3). Ainsi, bien que dans un premier temps ce traitement soit effectivement utile pour la diminution du nombre d'*Aeromonas* présents, résultats mis en évidence par les dénombrements des bactéries par la technique «Fluorescence *in situ* hybridization» (Fig. 2), il résulterait, cependant, en une augmentation subséquente de bactéries plus résistantes (Fig. 3). Il serait ici intéressant de voir si les stratégies mises en œuvre par les bactéries pour résister au chlore, pourraient également servir à mieux résister aux antibiotiques.

Des travaux précédents menés par Murray et al. (1984), analysant l'effet de la chloration sur les populations bactériennes présentes dans les eaux souillées d'une station d'épuration, démontrent, qu'après ce traitement, une augmentation significative du pourcentage de bactéries fermentant le lactose, résistantes à certains bêta-lactames, (ampicilline et céfalotine) apparaît. Le stress engendré par la chloration d'une part, sélectionnerait, au détriment des autres, les populations bactériennes résistantes ou induirait la résistance à divers antibiotiques et d'autre part, favoriserait l'échange de plasmides de résistance ou d'éléments génétiques mobiles.

Profil phénotypique de résistance dans les divers environnements hydriques: l'exemple des *Acinetobacter*

En comparaison aux souches d'*Aeromonas* isolées des mêmes milieux hydriques, les souches d'*Acinetobacter* d'origine environnementale s'avèrent posséder des taux de résistance moins élevés et ceci pour l'ensemble des 12 antibiotiques considérés. En revanche, le pourcentage d'*Acinetobacter* présentant des résistances isolé de matériel clinique est majeur à celui des souches d'origine environnementale.

Comme pour les *Aeromonas*, le rôle d'intermédiaire qu'assument les eaux usées des hôpitaux et des stations d'épuration dans l'apport de souches moins sensibles dans les eaux de surface semble également valable pour les bactéries du genre *Acinetobacter*.

Il a été possible, en outre, de détecter dans l'eau potable (eau de robinet), une souche d'*Acinetobacter* présentant un profil intermédiaire de résistance à la céfépime, soit une céphalosporine de la 4e génération, employée généralement avec succès lors d'infection bactérienne mettant en cause des germes de ce genre bactérien.

Les graphiques ci-dessous illustrent les résultats obtenus et présentent les profils phénotypiques de résistance à la ceftriaxone et à la céfépime des souches d'*Acinetobacter* cliniques et provenant des divers lieux hydriques d'échantillonnage (Fig. 4).

Nombre de cellules d'*Aeromonas* dans les eaux usées d'hôpitaux (cellules/ml)		
	avant traitement au chlore	après traitement au chlore
Sonde AER 66	1.3×10^4	6.07×10^3

Fig. 2. Dénombrement par la sonde oligonucléotodique spécifique au genre Aeromonas *(Aer 66) de la population d'*Aeromonas *dans les eaux usées*

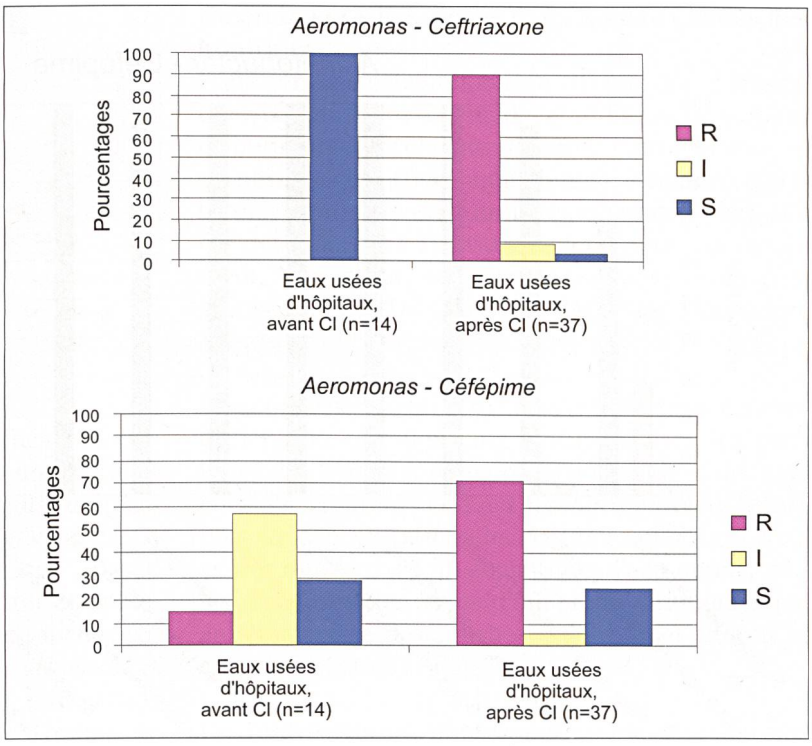

Fig. 3. Effet du traitement au chlore sur la résistance phénotypique aux céphalosporines des Aeromonas *(R: souches résistantes; I: souches intermédiaire; S: souches sensibles).*

Legionella pneumophila serogroupe 1: caractérisation phénotypique de la résistance à l'Erythromycine

Les bactéries du genre *Legionella* possèdent une résistance constitutive aux antibiotiques de la famille des bêta-lactames. Chez ce genre bactérien, la première β-lactamase exerçant principalement une activité de céphalosporinase a été décrite pour la première fois en 1979 (Feu et Neu 1979). Cette enzyme peut-être retrouvée aussi bien chez les espèces *pneumophila* que chez d'autres espèces (*L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*) (Marre et al.

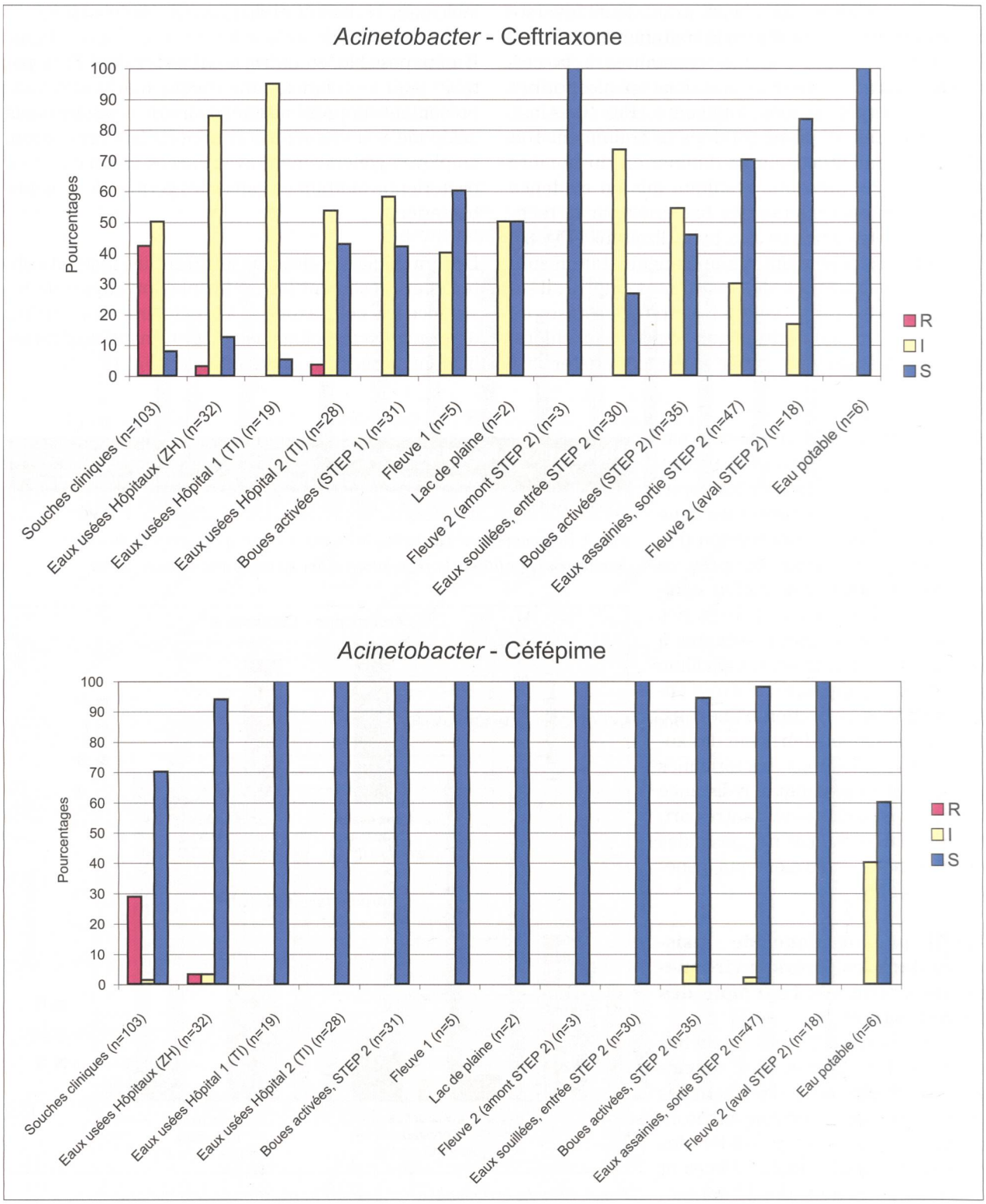

*Fig. 4. Pourcentage d'*Acinetobacter *environnementaux et cliniques résistants (R), intermédiaires (I) et sensibles (S) à la ceftriaxone et à la céfépime.*

1982). Le gène codant pour la résistance aux bêta-lactames a récemment été cloné (Boschi et al. 2000). La β-lactamase de l'espèce *L. gormanii* appartient au groupe des metallo-β-lactamases non inhibées par l'acide clavulanique (β-lactamase du groupe 3 ou β-lactamase de la classe B) (Bush et al. 1995). De ce fait, avant l'apparition des nouveaux macrolides, le premier antibiotique de choix pour le traitement de la maladie du Légionnaire a été l'érythromycine. La première résistance à l'érythromycine chez les *Legionellaceae* a été décrite en 2000 (Nielsen et al. 2000).

Dans cette étude, la résistance à l'érythromycine a été analysée chez 46 souches de *Legionella pneumophila* serogroupe 1, à savoir 20 souches provenant d'eaux potables (eaux de divers robinets) et de tours de refroidissement et 26 souches isolées de patients infectés.

Aucune association statistique significative entre les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour l'érythromycine et l'origine, clinique ou environnementale des souches testées, n'a pu être mise en évidence (Fig. 5).

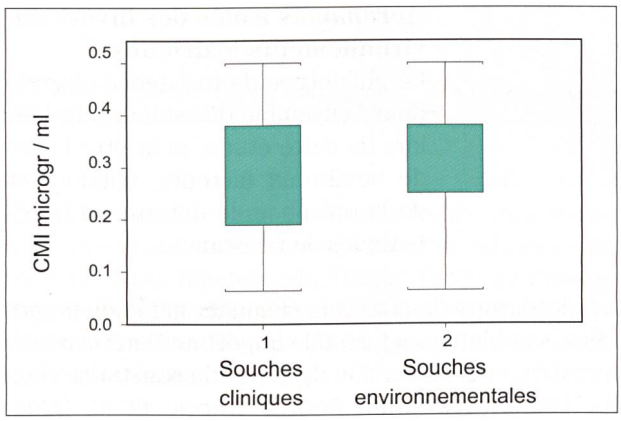

Fig. 5. Valeurs des CMI pour l'érythromycine de souches de Legionella pneumophila *serogroupe 1 d'origine clinique et environnementale.*

En revanche, une corrélation significative (p= 0.00012) entre valeurs de CMI pour ce macrolide et souches appartenant à un type moléculaire spécifique appelé SBT 1,4,3 a pu être mise en évidence. La typisation moléculaire SBT (Sequence Based Typing) est une technique moléculaire utile en épidémiologie et développée pour typiser les souches cliniques de *Legionella pneumophila* sur la base de la séquence obtenue de 3 trois gènes (flaA, pilE et asd) et selon les directives édictées par le Groupe de Travail Européen sur les Infections dues aux *Legionella* (European Working Group on *Legionella* Infections) (Gaia et al.2005).

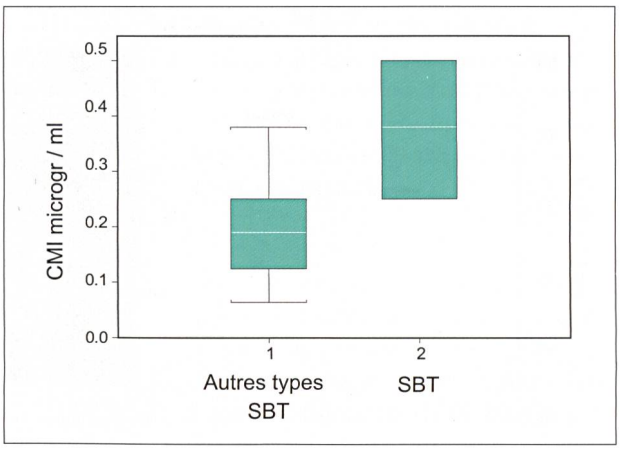

Fig. 6. Valeurs des CMI de souches de Legionella pneumophila *appartenant au génotype SBT 1,4,3 et aux autres génotypes.*

Les souches de *Legionella pneumophila* appartenant au type SBT 1,4,3 se sont avérées avoir des valeurs de CMI plus élevées. Les valeurs des CMI des souches appartenant au type 1,4,3 sont comprises entre 0.25 et 0.5 mg/ml, celles des autres types SBT sont, en revanche, comprises entre 0.12 et 0.25 mg/ml. Ce résultat démontre une résistance plus grande à l'érythromycine des souches de *Legionella pneumophila* appartenant au type SBT 1,4,3 par rapport aux souches de *Legionella pneumophila* appartenant aux autres génotypes (Fig. 6).

Corrélation entre concentrations de ciprofloxacine et résistances dans les eaux usées des hôpitaux

Dans certains échantillonnages d'eaux usées d'hôpitaux, de fleuves et d'affluents et effluents de stations d'épuration, les concentrations de ciprofloxacine et de norfloxacine (fluoroquinolones), ainsi que d'érythromycine et de clarithromycine (macrolides), ont été déterminées à l'Institut Fédéral pour l'aménagement, l'épuration, et la protection des eaux par le groupe du Prof. Dr. Giger (EAWAG-ETH, Dübendorf, Suisse).

Une corrélation a pu être observée entre les concentrations de ciprofloxacine mesurées dans les eaux usées des hôpitaux et le profil de résistance des souches d'*Aeromonas* et d'*Acinetobacter* isolées. Ainsi, plus la concentration de ce fluoroquinolone s'est avérée élevée dans un échantillon d'eau donné, plus les diamètres des zones d'inhibition déterminés par antibiogramme des souches isolées à cet endroit se sont avérés étroits (Fig. 7).

En d'autres termes, nous avons pu constater une augmentation de la résistance des souches présentes dans les environnements hydriques à mesure que la concentration de l'antibiotique analysé augmente.

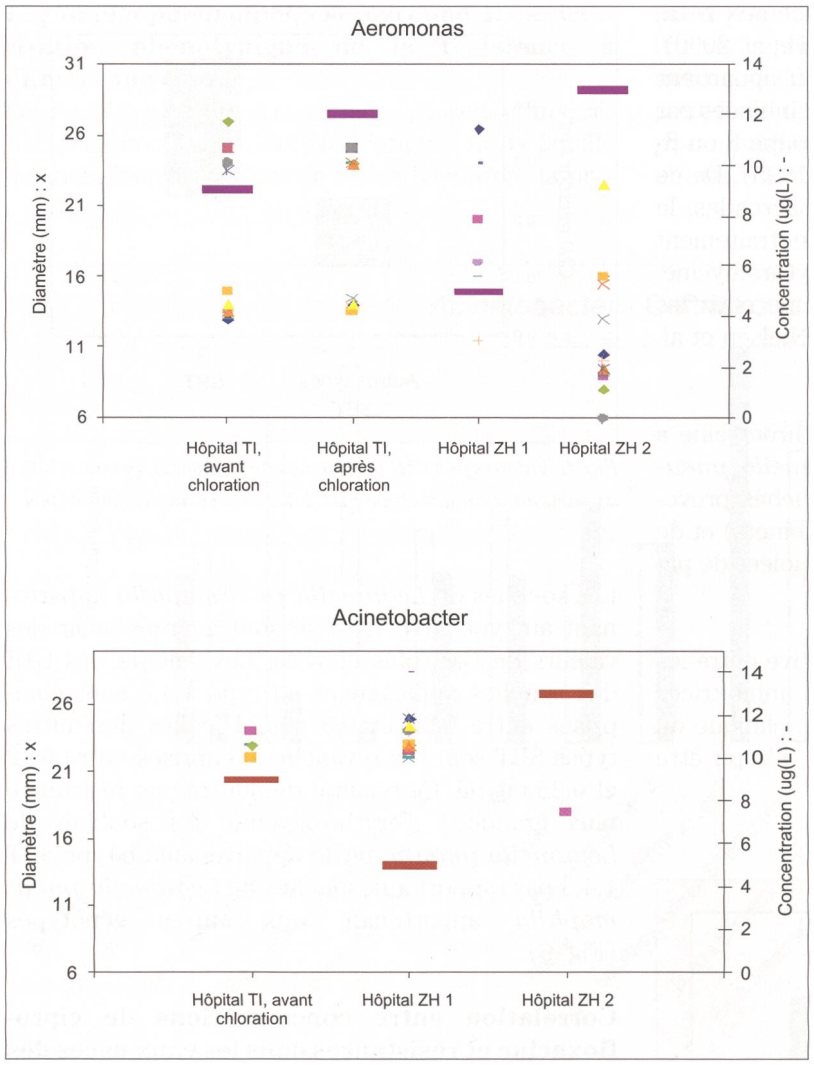

*Fig. 7. Corrélation entre concentrations de ciprofloxacine (µg/l) quantifiées dans les eaux usées des hôpitaux et profil phénotypique de résistance (mm) des souches d'*Aeromonas *et d'*Acinetobacter *isolées.*

Cette remarque est valable aussi bien pour les *Aeromonas*, que pour les *Acinetobacter* isolés de ces milieux hydriques.

Vu les très faibles concentrations que les antibiotiques atteignent dans l'environnement, ce résultat tend en outre à indiquer que même des concentrations basses, soit sub-inhibitrices, d'antibiotiques présentes dans les milieux hydriques peuvent affecter le profil de résistance des bactéries.

La présence d'antibiotiques dans les eaux souillées hospitalières est clairement due à leur utilisation clinique. La même origine clinique peut être attribuée aux bactéries présentes dans ces mêmes eaux. Cependant, la majorité des infections à *Aeromonas* se ne traduise que par de légères gastro-entérites, les patients infectés ne sont ainsi que rarement hospitalisés. De plus, les isolats fécaux sont généralement sensibles aux antibiotiques. Ces considérations indiquent que, dans les milieux hydriques hospitaliers, la présence des ces bactéries peut être corrélée à une origine environnementale, plutôt qu'à une origine clinique. Les *Aeromonas*, ainsi présents, sont soumis à une pression de sélection due à la présence d'antibiotiques pouvant, effectivement, résulter dans le développement et la croissance de souches plus résistantes. A l'envers, les *Acinetobacter* sont fréquemment responsables d'infections nosocomiales et cause d'hospitalisation. Ainsi, la présence d'*Acinetobacter* résistants dans les eaux souillées, même si corrélée à la quantité d'antibiotiques, peut aussi bien être due aux patients infectés hospitalisés, qu'aux rejets hospitaliers.

Profil génétique de résistance: intégrons de classe 1 chez les *Aeromonas* isolés des divers environnements hydriques

Le phénotype de résistance observé pour l'ensemble des souches isolées lors de cette étude, peut être l'effet de nombreux facteurs, notamment de la présence de déterminants génétiques de résistance.

Les intégrons de classe 1, éléments génétiques mobiles, semblent jouer un rôle important dans la dissémination et la dispersion de gènes de résistance chez les bactéries à Gram négatif (Riccio et al. 2000; Schmidt et al. 2001; Poirel et Nordmann 2002) et représentent la majorité des intégrons reportés dans les isolats cliniques (Brown et al. 1996; Rosser et Young 1999). Ces éléments possèdent la capacité de reconnaître, d'intégrer et d'exprimer des gènes d'origine exogène contenus dans des structures dites cassettes.

Les intégrons de classe 1 ont été recherchés par PCR dans un total de 493 souches d'*Aeromonas* isolées des divers environnements hydriques étudiés. Les résultats obtenus pour les *Aeromonas* et pour les divers lieux d'échantillonnage sont exposés dans la figure ci-dessous (Fig. 8 a et b).

Sur les 493 souches d'*Aeromonas* testées, 40.8% se sont avérées être positives pour les intégrons de classe 1. Les intégrons de classe 1 pourvus de

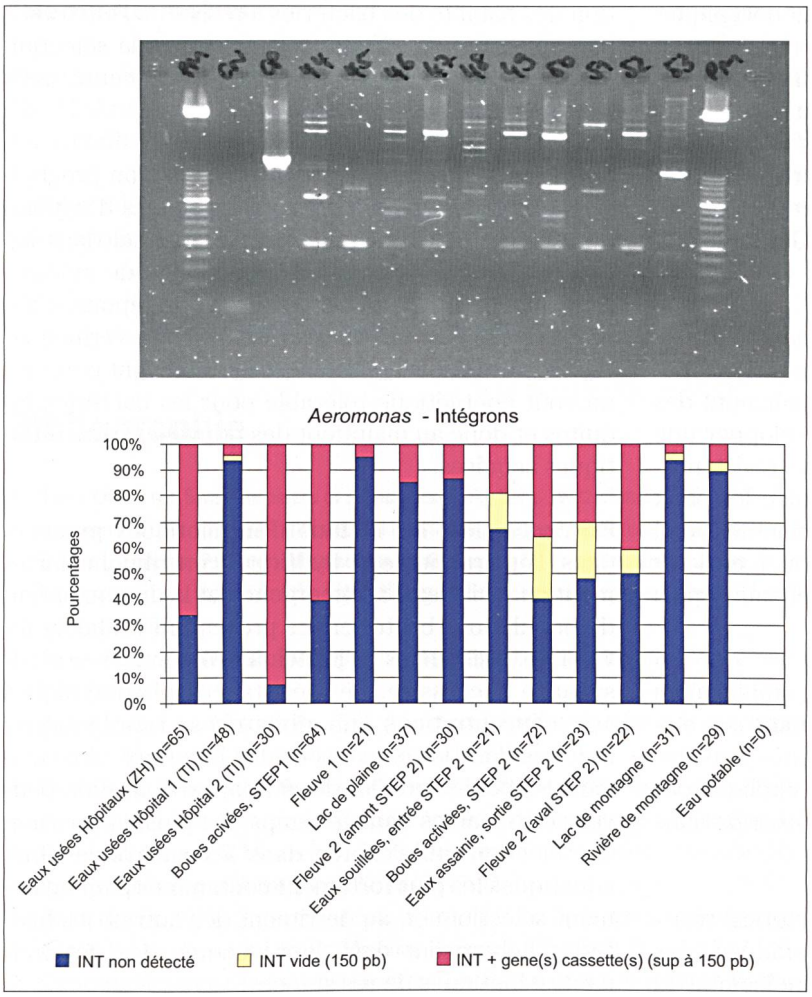

Fig. 8. a) Electrophorèse sur le gel d'agarose après PCR pour la visualisation des intégrons de classe 1; b) Pourcentage des intégrons de classe 1 pourvus ou non de gène(s) cassette(s) chez les Aeromonas *environnementaux.*

gène(s) cassette(s) ont pu être détectés dans 6.3% et 93.3% de souches d'*Aeromonas* isolées des eaux usées de deux hôpitaux du Tessin. Cette différence importante était difficilement explicable et ne pouvait pas être corrélée aux phénotypes de résistance aux antibiotiques.

Dans d'autres situations, par contre, la présence d'intégrons a pu être mise en relation avec la provenance des souches. Par exemple, le 66.2% des souches d'*Aeromonas* isolées des eaux usées d'un hôpital à Zurich, où des résidus d'antibiotiques ont pu être quantifiés dans un ordre de grandeur compris entre 0.03 et 13 µg/l, montraient héberger dans leur génome des intégrons de classe 1 pourvus de gène(s) cassette(s). Ces mêmes souches s'étaient avérées phénotypiquement résistantes à nombreux antibiotiques. De même, 60.9 et 36.1% de souches hébergeant des intégrons de classe 1 avaient été détectées dans deux stations d'épuration. Dans la deuxième station, l'absence d'hôpitaux, ainsi que les habitations rurales caractérisant la région, pourraient expliquer la présence moins élevée de souches possédant dans leur génome des intégrons. Cette hypothèse est soutenue par la quantification de résidus d'antibiotiques dans les boues activées des deux stations d'épuration, montrant clairement une présence plus élevée de substances antimicrobiennes dans les échantillons récoltés dans la première station.

Dans un fleuve, avant les rejets d'une station d'épuration, le pourcentage de souches d'*Aeromonas* hébergeant des intégrons de classe 1 de longueur supérieure à 150 pb, soit pourvus de gène(s) cassette(s), s'élevait à 13.3%. Après le déversement dans le fleuve des effluents de la station, ce taux dépassait les 40%.

La capacité génétique préexistante chez les *Aeromonas* avait été investiguée en étudiant la présence de souches hébergeant des intégrons dans un lac situé à 1921 m au dessus du niveau de la mer, lieu où la pression de sélection exercée par les antibiotiques peut être considérée comme absente. Le 3.2% des souches possédait des intégrons, la même fréquence avait été retrouvée pour les structures de longueur supérieure à 150 pb. Dans la rivière exutoire du lac de montagne, échantillonnée après quelques habitations, le nombre de souches contenant des intégrons de classe 1 pourvus de gène(s) cassette(s), augmente légèrement et atteint les 6.9%.

Conclusion

Les environnements hydriques comme les eaux usées des hôpitaux, les eaux souillées à l'entrée des stations d'épuration ou encore les boues activées de la phase biologique des stations d'épuration peuvent contenir et concentrer un nombre important de substances chimiques toxiques (résidus d'antibiotiques, résidus d'autres substances pharmaceutiques, métaux lourds, huiles usagées, etc...), ainsi qu'un ensemble de conditions adverses de survie pour les micro-organismes. Les pressions multiples de sélection s'exerçant dans ces environnements pourraient de ce fait favoriser l'émergence, le développement et la dissémination vers les eaux de sur-

face de populations bactériennes phénotypiquement et / ou génétiquement moins sensibles ou mieux préparées à développer une résistance ultérieure. De plus, la présence d'une grande et nombreuse diversité microbienne dans les boues activées pourrait faciliter l'échange de déterminants génétiques de résistance entres les différentes bactéries (Szczepanowski et al. 2004; De Gelder et al. 2005).

Ainsi, les stations d'assainissement des eaux permettent de concentrer, non seulement, des souches phénotypiquement plus résistantes, mais également des souches génétiquement préparées à développer une résistance ultérieure ou à exprimer une résistance. En assumant ce rôle d'intermédiaire entre les eaux polluées et les milieux hydriques environnementaux, les stations d'épuration contribuent, ainsi, à enrichir les eaux de surface en souches potentiellement plus résistantes.

Si la résistance acquise est un caractère stable, alors le faible pourcentage des isolats contenant ces éléments génétiques mobiles, mis en évidence dans les fleuves et le lac de plaine, pourrait être expliqué par l'effet de dilution de la population d'*Aeromonas* dans les eaux de surface.

Les cliniciens, préoccupés par les bactéries résistantes, mais convaincus que le dosage standard des antibiotiques, ainsi que la réponse immunologique du patient suffisent à l'extinction des éventuelles sous-populations bactériennes moins sensibles, ignorent trop souvent l'émergence clinique des phénotypes de faibles résistances (Baquero 2001) et se soucient bien peu de l'effet de la persistance des antibiotiques dans l'environnement hydrique. Pourtant cette adaptation phénotypique et génotypique progressive de faibles niveaux de résistances ou diminutions progressives de la sensibilité pourrait servir d'étape évolutive vers le développement de degrés plus élevés de résistances et constituer une véritable voie d'entrée à la résistance.

Ainsi et malgré les risques potentiels de l'utilisation massive d'antibiotiques et les échecs croissants de l'antibiothérapie en milieux clinique et ambulatoire, peu d'études sur les risques liés à la présence de faibles concentrations d'antibiotiques dans l'environnement aquatique sont disponibles.

Cette étude a permis d'apporter des éléments de réponse pratique à cette interrogation et de démontrer que l'interaction entre agents chimio-thérapeutiques d'origine anthropogénique et populations bactériennes, qui s'exerce dans l'environnement aquatique, de façon progressive et à des concentrations sub-inhibitrices, contribue à une légère augmentation de l'habilité des bactéries à résister à l'effet antimicrobien de ces substances, ainsi qu'à la sélection de variants plus résistants aux faibles concentrations d'antibiotiques.

Cette étude montre encore que l'exposition progressive à de faibles concentrations hydriques d'antibiotiques peut produire un stress substantiel dans les populations bactériennes d'origine clinique et environnementale, pouvant engendrer des réponses génétiques adaptatives variées. La stabilité vérifiée *in vitro* de ces faibles résistances induites font penser à un coût énergétique tolérable pour les bactéries induites et donc au maintient des nouvelles caractéristiques acquises.

En conclusion, les résidus d'antibiotiques présents dans l'environnement hydrique contribuent fortement au maintient, à l'émergence et la dissémination de populations bactériennes présentant un faible niveau de résistances et prêtes à évoluer vers une résistance successive. Les résistances phénotypiques aux concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques induites dans les eaux usées des hôpitaux, ainsi que dans les boues activées des stations d'épuration peuvent être stables dans le temps. De plus, la pression de sélection qui s'exerce dans les environnements aquatiques les plus fortement contaminés peut également sélectionner, au détriment des autres, les bactéries hébergeant dans leur génome des déterminants génétiques de résistances.

En l'absence de la pression de sélection exercée par les résidus hydriques d'antibiotiques un pourcentage faible de souches hébergeant des intégrons de classe 1 contenant des gènes cassettes ou des intégrons vides reste détectable dans l'environnement hydrique. La capacité génétique évolutive des bactéries peut être, de ce fait, maintenue en l'absence de l'inducteur.

La pression de sélection exercée par les résidus d'antibiotiques présents dans les divers environnements hydriques représente, ainsi, un vrai portail d'entrée non seulement à la résistance progressive de souches environnementales, mais également à la résistance clinique.

Un traitement adéquat des eaux usées rejetées par les hôpitaux permettant, à la fois, une détérioration chimique des résidus d'antibiotiques actifs et autres substances pharmacologiques actives, ainsi que l'élimination du plus grand nombre de bactéries présentes dans ces milieux, pourraient représenter une mesure utile et préventive, non seulement pour contenir les échecs thérapeutiques et les coûts de la santé, mais également pour la préservation de notre environnement aquatique.

Remerciements

Prof. Dr. W. Giger, Dr. E. Molnar, Dr. AC. Alder, Dr. CS. McArdell, Dr. HP. Kohler, Dr. E. Golet et collaborateurs du groupe HUMABRA (PNR 49), de l'Institut Fédéral pour l'aménagement, l'épuration, et la protection des eaux (EAWAG-ETH, Dübendorf, Suisse) pour avoir quantifié les résidus d'antibiotiques dans certains de nos échantillons, notamment les eaux usées des hôpitaux tessinois et de Zurich, ainsi que pour les échanges d'informations effectuées au cours de ce travail de recherche.

Prof. Dr. Sacher et collaborateurs du DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe, Allemagne, pour avoir effectué, avec disponibilité, les dosages des résidus d'antibiotiques dans les boues activées des stations d'épuration.

Bibliographie

- **Trust Office for Swiss Importers of Antibiotics** (TSA), Bern, Switzerland. 1998.
- **Baquero F.** 2001. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. Drug Resistance Updates. 4: 93-105.
- **Boschi L, Mercuri Ps, Riccio Ml, Amicosante G, Galleni M, Frere Jm, Rossolini Gm.** 2000. The *Legionella* (*Fluoribacter*) *gormanii* metallo-beta-lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44: 1538-1543.
- **Brown Hj, Stokes Hw, Hall Rm.** 1996. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. Journal of Bacteriology. 178: 4429-4437.
- **Bush K, Jacoby Ga, Medeiros Aa.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39: 1211-1233.
- **De Gelder L, Vandecasteele Fp, Brown Cj, Forney Lj, Top Em.** 2005. Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. Applied and Environmental Microbiology. 71: 5309-5317.
- **Filippini M, Masiero G, Moschetti K.** 2006. Socioeconomic determinants of regional differences in outpatient antibiotic consumption: evidence from Switzerland. Health Policy. Aug 22; 78 (1): 77-92.
- **Fu Kp, Neu Hc.** 1979. Inactivation of beta-lactam antibiotics by *Legionella pneumophila*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16: 561-564.
- **Gaia V, Fry Nk, Afshar B, Lück Pc, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison Tg.** 2005.
- Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology. 43: 2047-2052.
- **Göbel A, Thomsen A, Mcardell Cs, Joss A, Giger W.** 2005. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and thrimethoprim in activated sludge treatment. Environmental Science & Technology. 39: 3981-3989.
- **Jawad A. Hawkey Pm, Heritage J, Snelling Am.** 1994. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. J Clin Microbiol. 32: 2353-2358.
- **Marre R, Medeiros Aa, Pasculle Aw.** 1982. Characterization of the beta-lactamases of six species of *Legionella*. Journal of Bacteriology. 151:216-221.
- **Murray Ge, Tobin Rs, Junkins B, Kushner Dj.** 1984. Effect of chlorination on antibiotics resistance profiles of sewage-related bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 48: 73-77.
- **Nielsen K, Bangsborg Jm, Hoiby N.** 2000. Susceptibility of *Legionella species* to five antibiotics and development of resistance by exposure to erythromycin, ciprofloxacin and rifampicin. Diagnostic Microbiology and Infection Disease. 36: 43-48.
- **Poirel L, Nordmann P.** 2002. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. Current Pharmaceutical Biotechnology. 3: 117-127.
- **Recchia Gd, Hall Rm.** 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends Microbiology. 5: 389-394.
- **Riccio Ml, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rosser Sj, Young Hk.** 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 44: 11-18.
- **Schmidt As, Bruun Ms, Larsen Jl Dalsgaard I.** 2001. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47: 735-743.
- **Szczepanowski R, Krahn I, Linke B, Goesmann A, Puhler A, Schluter A.** 2004. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. Microbiology. 150 (Pt 11): 3613-3630.
- **Swissmedic.** Institut Suisse des produits thérapeutiques. Division médicaments vétérinaires. Information aux spécialistes. Premières données sur la commercialisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire, 27 février 2006. www.swissmedic.ch.
- **Swissmedic.** Institut Suisse des produits thérapeutiques. Médicaments à usage vétérinaire. Statistique des ventes d'antibiotiques. Distribution d'antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire 2005-2007, 4 décembre 2008. www.swissmedic.ch.
- **Stamm C.** 2005. Produits agrochimiques: Quels danger pour le milieu aquatique? EAWAG news 59: 3-5.
- **Ternes Ta.** 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research. 32: 3245-3600.