

Les bactéries autochtones antibiorésistantes : occurrence et diversité

Tamara Garcia-Armisen, Julien Passerat, Adriana Anzil, et Pierre Servais*

Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles

*personne à contacter : 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 des activités récréatives ou pour 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'elles causent ne peuvent pas être traitées par des antibiotiques. Le travail sur l'antibiorésistance mené dans le cadre du PIREN-Seine, s'est donc, dans un premier temps, intéressé à la présence de bactéries fécales résistantes aux antibiotiques dans les eaux du bassin de la Seine.

Au cours de travaux réalisés de 2005 à 2007, des souches d'*Escherichia coli* et d'entérocoques intestinaux ont été isolées d'échantillons de rivières du bassin de la Seine, 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. Ces mesures ont montré une présence significative de bactéries fécales antibiorésistantes (Servais et Passerat, 2009). Ainsi, 42 % des 214 isolats de *E. coli* provenant des échantillons d'eau de rivières étaient résistants à au moins un antibiotique sur les 16 testés. Pour les isolats d'entérocoques, 83 % des 146 isolats provenant des échantillons d'eau de rivières étaient résistants à au moins un antibiotique sur les 10 testés. 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 quatre sources de bactéries fécales caractérisées par des origines différentes des bactéries pouvaient être classées par taux de résistance décroissants : eaux usées hospitalières (bactéries fécales provenant de patients hospitalisés), eaux usées domestiques (bactéries fécales d'origine principalement humaine), rejets agricoles (bactéries fécales provenant des animaux d'élevage) et enfin ruisseaux forestiers (bactéries fécales provenant des animaux sauvages). L'analyse de ces résultats a indiqué que la source principale de bactéries entériques antibiorésistantes trouvées dans les rivières était les eaux usées domestiques (Servais et Passerat, 2009).

La mise en évidence d'une population de bactéries entériques antibiorésistantes dans l'environnement aquatique pose la question de la possibilité de dissémination de l'antibiorésistance vers les bactéries autochtones du milieu naturel. On peut en effet imaginer sans peine le schéma suivant : des bactéries entériques se retrouvent en présence de quantités non négligeables d'un antibiotique dans le tube digestif d'un patient ou d'un animal traité aux antibiotiques, certaines d'entre elles acquièrent une antibiorésistance et sont excrétées, elles rejoignent ensuite le milieu aquatique naturel via les eaux usées et s'y retrouvent en présence des bactéries autochtones auxquelles elles sont susceptibles de transférer leur antibiorésistance par échange de matériel génétique. Dans un tel schéma, le milieu aquatique représenterait alors une source de dissémination de l'antibiorésistance.

Des expériences ont été conduites pour investiguer la vraisemblance d'un tel schéma. A cet effet, sur certains échantillons d'eau et de sédiments issus de rivières différemment contaminées du bassin de la Seine, nous avons comparé le niveau d'antibiorésistance d'un type de bactéries entériques (*E. coli*) et de la flore autochtone cultivable. Par ailleurs, la diversité et l'identification phylogénétique des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été étudiées sur certains échantillons d'eau de rivières du bassin de la Seine en utilisant une approche polyphasique, combinant des méthodes basées sur la mise en culture et des méthodes moléculaires.

2 Antibiorésistance des bactéries autochtones du milieu aquatique

2.1 Matériel et méthodes

L'analyse parallèle de l'antibiorésistance des bactéries autochtones et des *E. coli* a été réalisée sur 27 échantillons d'eau de rivières différemment contaminées. Par ailleurs, les bactéries (autochtones et fécales) ont été extraites par sonication de sédiments collectés dans diverses rivières du bassin et leur antibiorésistance a été étudiée. Les bactéries autochtones ont été dénombrées sur une gélose R2A après 7 jours d'incubation à 20 °C. Le R2A est une gélose non sélective permettant de dénombrer les bactéries hétérotrophes aérobies cultivables présentes dans les échantillons d'eau. Les bactéries autochtones ont également été dénombrées sur des géloses R2A respectivement supplémentées en amoxicilline (AMX, 4 mg/L), en tétracycline (TE, 4 mg/L) et en acide nalidixique (NA, 8 mg/L). Ces concentrations sont les concentrations critiques basses des trois antibiotiques selon le CA-SFM (CA-SFM, 2008). Une souche dont la croissance est inhibée à la concentration critique basse d'un antibiotique est considérée comme sensible à cet antibiotique. En parallèle, les *E. coli* ont été dénombrés sur gélose sélective Chromocult Coliform Agar (CCA), ainsi que sur des géloses CCA contenant l'un des trois antibiotiques à la même concentration que celle utilisée pour le milieu R2A. Le rapport entre le dénombrement effectué sur la gélose supplémentée en antibiotique et celui effectué sur la gélose non supplémentée en antibiotique donne une estimation du taux de résistance des bactéries autochtones ou de *E. coli* à l'antibiotique considéré.

2.2 Résultats

La figure 1 présente les pourcentages de bactéries autochtones résistantes aux trois antibiotiques testés portés en fonction de l'abondance des *E. coli* pour les échantillons d'eau (Fig. 1a) et de sédiments (Fig. 1b) analysés. Considérant la teneur en *E. coli* comme un indicateur de contamination fécale récente, on n'observe aucune relation entre le niveau de contamination fécale et la proportion de bactéries autochtones résistantes aux trois antibiotiques testés aussi bien pour celles provenant des échantillons d'eau que pour celles provenant des échantillons de sédiments.

Un test ANOVA a montré des différences significatives entre les niveaux de résistances des bactéries hétérotrophes (échantillons d'eaux et de sédiments confondus) entre les trois antibiotiques testés $F(2, 99) = 20,78$, $p < 0.0001$. Pour quantifier plus précisément ces différences, un test de Tukey's pour les comparaisons multiples a été appliqué. Le pourcentage de bactéries autochtones résistantes montre des différences significatives entre les trois antibiotiques ($p < 0,01$). La résistance à l'acide nalidixique (19,3%) est en moyenne plus élevée que celle à l'amoxicilline (11,3%) et les pourcentages les plus faibles sont observés pour la tétracycline (2,9%).

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les pourcentages de bactéries autochtones résistantes dans les sédiments par rapport à ceux observés à partir des échantillons d'eau et cela pour aucun des trois antibiotiques testés.

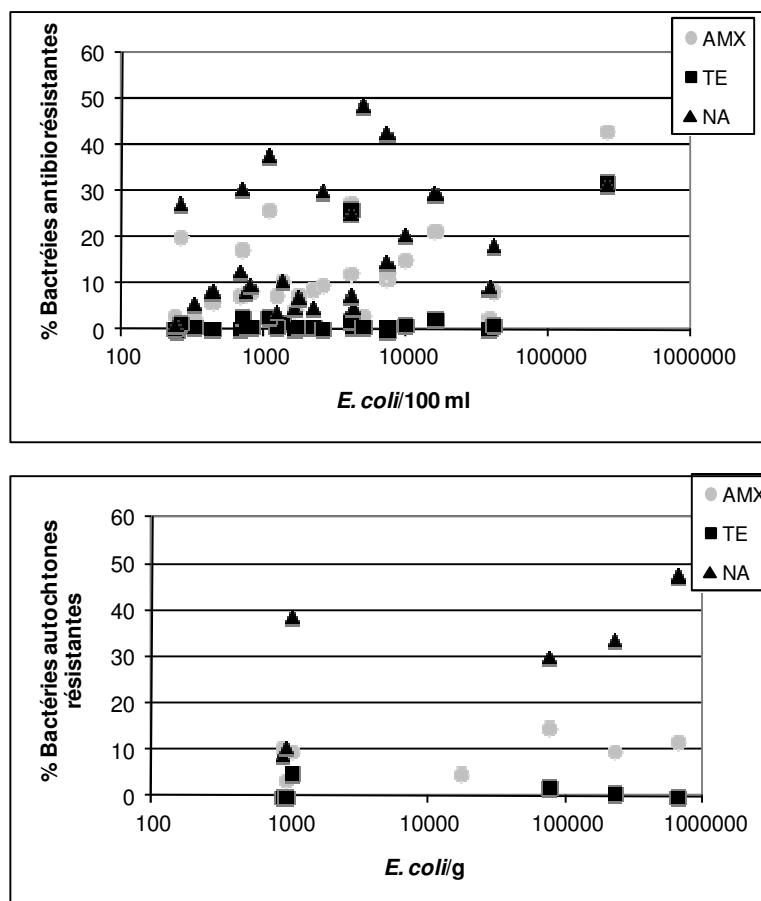


Figure 1. Pourcentages de bactéries autochtones résistantes aux trois antibiotiques testés (AMX : amoxicilline ; TE : tétracycline ; NA : acide nalidixique) portés en fonction de la teneur en *E. coli* pour les échantillons d'eau (Fig. 1a) et de sédiments (Fig. 1b)

La figure 2 présente la comparaison du taux de résistance des bactéries autochtones et de *E. coli*. Cette comparaison ne révèle aucune relation apparente entre les taux de résistance observés pour *E. coli* et ceux observés pour les bactéries autochtones. Le niveau de résistance observé chez les bactéries autochtones semble ainsi indépendant de celui des *E. coli* trouvés à leur côté dans les échantillons d'eaux et de sédiments.

Un test ANOVA a montré des différences significatives entre les niveaux de résistance des *E. coli* entre les trois antibiotiques testés $F(1, 84) = 12.9$, $p < 0.0001$. Pour quantifier plus précisément ces différences un test de Tukey's pour les comparaisons multiples a été appliqué. Le pourcentage d'*E. coli* résistants montre des différences significatives entre l'amoxicilline et les deux autres antibiotiques ($p < 0,01$). Aucune différence significative n'a pu être observée entre les taux de résistance des *E. coli* à la tétracycline et à l'acide nalidixique.

Le pourcentage de résistance à l'amoxicilline (échantillons d'eaux et de sédiments confondus) (19,4 %) est en moyenne plus élevé que ceux observés pour la tétracycline (9,9%) et l'acide nalidixique (6,0%).

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les pourcentages d'*E. coli* résistants dans les sédiments par rapport à celles isolés à partir de l'eau et cela pour aucun des trois antibiotiques testés.

Ce pattern de résistance est différent de celui observé pour les bactéries autochtones où des différences significatives étaient observées entre les trois antibiotiques et où le plus grand pourcentage de résistance se trouvait associé à l'acide nalidixique et pas à l'amoxicilline.

L'analyse statistique a mis en évidence le manque de corrélation entre les pourcentages de résistances des deux groupes de bactéries, et cela pour les trois antibiotiques testés. (AMX: $R^2 = 0.0310$ $p = 0.319$; TE: $R^2 = 0.0285$ $p = 0.348$; NA: $R^2 = 0.0007$ $p = 0.877$).

Il est donc probable que les bactéries cultivées sur gélose R2A supplémentée d'un antibiotique appartiennent à des espèces autochtones naturellement résistantes. Cette résistance naturelle semble très répandue chez les bactéries aquatiques autochtones. Dans ces conditions, si des transferts de gènes de résistance ont lieu de *E. coli* vers les bactéries autochtones, la méthode utilisée ici ne permet pas de les mettre en évidence car ces événements pourraient être moins fréquents que l'occurrence de résistances naturelles chez les autochtones.

Il serait donc intéressant d'en savoir plus sur cette population de bactéries antibiorésistantes et ce à différents endroits du bassin de la Seine. Plusieurs questions se posent aujourd'hui. Quelle est la composition phylogénétique des bactéries autochtones résistantes dans le bassin de la Seine ? Cette communauté est elle différente dans des rivières présentant différents niveaux de pollution ? Quel est le pattern de multirésistance de ces souches ?

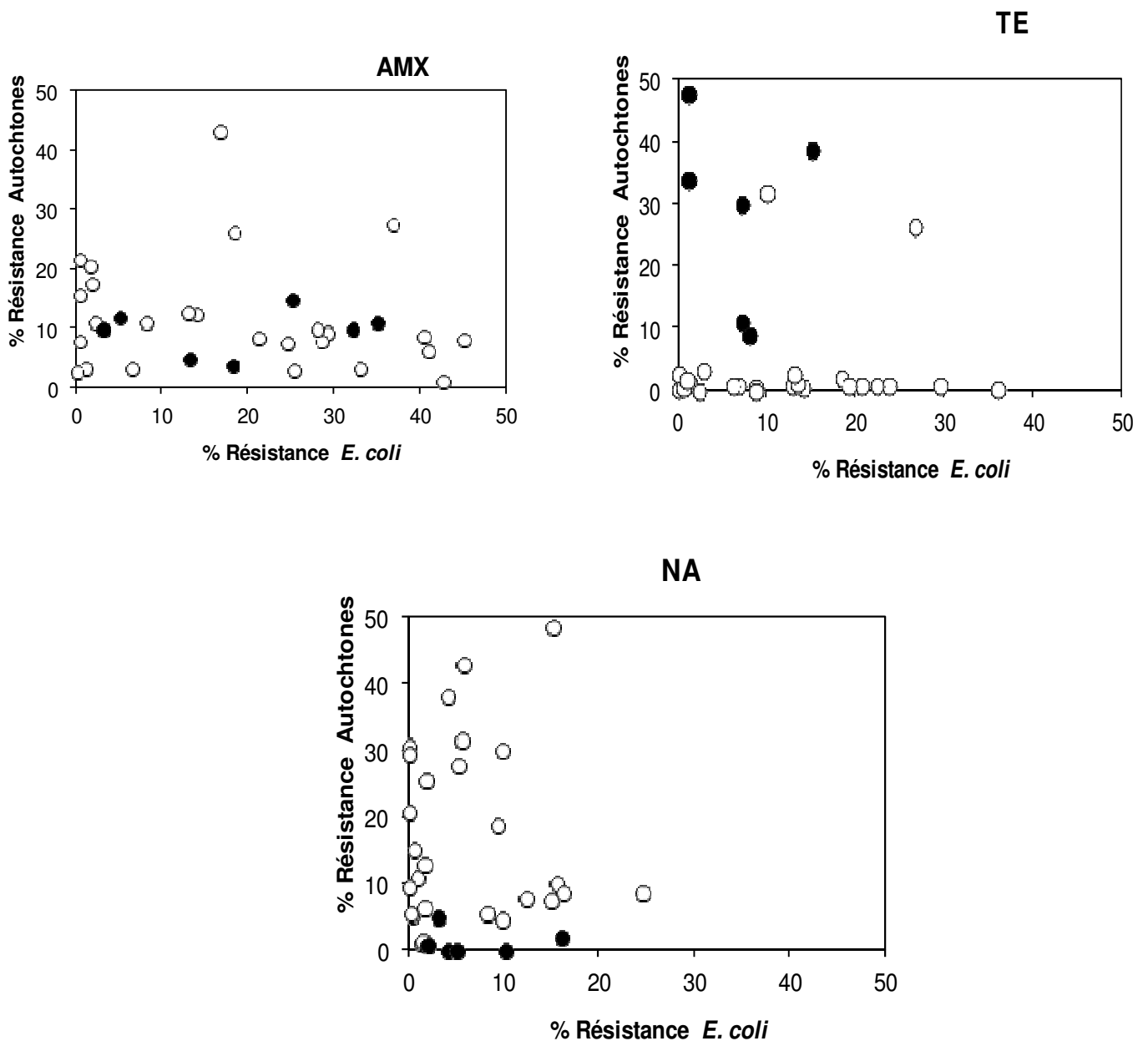


Figure 2 : Comparaison des taux de résistance à l'amoxicilline (AMX), à la tétracycline (TE) et à l'acide nalidixique (NA) chez E. coli et chez les bactéries autochtones provenant d'échantillons d'eau (symboles ouverts) et de sédiments (symboles noirs).

3 Diversité des bactéries autochtones antibiorésistantes

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1. Sites d'étude

Pour explorer la diversité des bactéries antibiorésistantes dans le bassin de la Seine, nous avons choisis trois sites d'études sur de base de l'impact anthropique supposé. Un ruisseau forestier du bassin de l'Oise a été échantillonné en amont de tout rejet domestique (RF. Oise), Deux prélèvements ont été effectué en Seine, l'un en amont de l'agglomération parisienne, à Evry (S. Evry) et un en aval de l'agglomération Parisienne, à Conflans (S. Conflans). Les échantillons d'eau utilisés pour cette expérience ont été caractérisés par différents paramètres physico-chimiques (Température, pH, O₂ dissous, conductivité) ainsi que par leur degré de contamination fécale tel qu'estimé par la concentration d'*E. coli* dans ces eaux.

3.1.2. Approche basée sur la mise en culture

3.1.2.1 Dénombrements

L'étude de l'abondance et de la diversité des bactéries autochtones a été réalisée sur 3 échantillons d'eau de rivières différemment contaminées. Deux milieux de culture différents ont été utilisés : Le R2A et du bouillon nutriment dilué 100 fois (DNB). Le milieu R2A est une gélose non sélective permettant de dénombrer les bactéries hétérotrophes aérobies cultivables présentes dans les échantillons d'eau ; les comptages sur milieu R2A ont été effectués après 7 jours d'incubation à 20 °C. Le milieu DNB est un milieu très pauvre conseillé pour le développement de bactéries oligotrophes à croissance lente (Hiroyuki and Tsutomu, 1983) ; les comptages sur DNB ont été effectués après 15 et 28 jours d'incubation à 20°C. Les bactéries autochtones ont également été dénombrées sur des géloses (R2A et DNB) respectivement supplémentées en amoxicilline (AMX, 4 mg/L et 100 mg/L), en tétracycline (TE, 4 mg/L et 300mg/L) et en sulfométhoxazole (SUL, 16 mg/L et 300 mg/L). Ces concentrations sont : pour les plus basses, les concentrations critiques basses des trois antibiotiques selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie et pour les plus élevées les valeurs maximales trouvées dans des essais similaires dans la littérature.

Nous avons choisis trois antibiotiques appartenant à des familles différentes, et pour lesquels nous disposons de mesures de concentrations dans le bassin de la Seine. Du point de vue mode d'action, l'amoxicilline est un β -Lactame qui inhibe la formation de la paroi cellulaire; la tétracycline se lie aux ribosomes bactériens inhibant ainsi la synthèse protéique et le sulfométhoxazole est un sulfonamide qui inhibe la synthèse de l'acide folique et par conséquent affecte la synthèse de l'ADN. Par rapport à l'étude précédente (section 2), nous avons choisi de substituer l'acide nalidixique par le sulfométhoxazole car des concentrations importantes ont été rapportées dans la Seine en aval de Paris (Tamtam et al., 2008)

Le rapport entre le dénombrement effectué sur la gélose supplémentée en antibiotique et celui effectué sur la gélose non supplémentée en antibiotique donne une estimation du taux de résistance des bactéries cultivables à l'antibiotique considéré.

3.1.2.2. Isolement et identification

A partir des milieux gélosés R2A, 10 colonies résistantes ont été choisies pour chacun des antibiotiques et chacun des sites échantillonnés (pour un total de 90 souches). Ces souches ont été purifiées par la méthode des cadrans.

Les souches bactériennes qui ont réussi à se développer lors de cette étape de purification ont été identifiées par le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Brièvement, une petite quantité de cellules bactériennes a été transférée dans un tube eppendorf contenant 50 μ l de tampon Tris-EDTA. Ces tubes ont été soumis à trois cycles de 10 min -80 °C suivis de 5 min à 100 °C afin de lyser les

bactéries. Ce lysat a été directement utilisé comme point de départ pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S. La PCR a été effectuée avec les amorces universelles 27f et 1492r (Frank et al., 2008) ; les cycles ont été programmés comme suit : 20 cycles (94 °C pendant 1 min, 48°C pendant 1 min et 72 °C pendant 2 min). Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 50 µl, contenant 5µl du lysat de bactéries, 0.2mM de dNTPs, 0.4 mM de chaque amorce, 1.25 IU de Taq ADN polymérase (Qiagen, Hilden, Germany), 10 mM TrisHCl, 50 mM KCl et 1.5 mM MgCl₂. Les produits de PCR ont été envoyés au séquençage dans une entreprise spécialisée (Acrogène). Les séquences obtenues ont été utilisées pour l'identification phylogénétique. Le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a été utilisé pour rechercher dans la base de données GenBank les séquences les plus similaires.

Ces souches seront testées prochainement pour leur résistance à un pool de 6 antibiotiques pour établir un pattern de multirésistance.

3.1.3. Approche moléculaire

Pour éliminer le passage par mise en culture et accéder directement aux bactéries antibiorésistantes nous avons fait une expérience en batch dans laquelle les trois échantillons d'eau de rivières ont été incubés pendant 24h en présence des trois antibiotiques aux concentrations suivantes : AMX (50mg/L), TE (150mg/L), SUL (150 mg/L). Un contrôle d'eau de rivière qui ne contenait pas d'antibiotiques a également été incubé en parallèle pendant 24h.

3.1.3.1. Dénombrements

Le kit Bactlight (Invitrogen) a été utilisé suivant les indications du fabricant, pour distinguer par microscopie à épifluorescence les bactéries ayant conservé leur intégrité membranaire après 24 d'incubation de celles ayant perdu cette intégrité membranaire. Les bactéries ayant conservé leur intégrité membranaire seront considérées comme résistantes dans le cadre de cette étude.

3.1.3.2. Diversité

Pour accéder à la diversité des bactéries antibiorésistantes sans passer par la mise en culture, ces échantillons incubés pendant 24h ont été soumis à un traitement avec du PMA (propidium monoazide) qui va se lier aux molécules d'ADN des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, les rendant ainsi non amplifiables par PCR. Les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire ne seront donc pas prises en compte dans les analyses après PCR qui ne concernera donc que les cellules ayant conservé leur intégrité membranaire. L'amplification par PCR et séparation par DGGE des gènes codant pour l'ARNr 16S des bactéries ayant conservé leur intégrité membranaire nous permettra de connaître les groupes bactériens résistants aux différents antibiotiques dans chacun des sites échantillonnés.

3.2. Résultats

3.2.1. Sites d'étude

La table 1 présente la caractérisation des échantillons analysés dans le cadre de cette étude. Des différences sont observées entre le ruisseau forestier et les deux points échantillonnés en Seine. La station de Conflans, en aval de Paris, présente la concentration en oxygène dissous la plus basse et la plus élevée en *E. coli*, reflétant l'impact des rejets d'eaux usées traitées de l'agglomération parisienne.

Tableau 1. Caractérisation des échantillons choisis dans le cadre de cette étude.

	Ruisseau Forestier (Oise)	La Seine en amont de Paris (Evry)	La Seine en aval de Paris (Conflans)
Température (°C)	4,5	11,7	14
pH	7,44	8,08	7,67
O2 (ml/L)	12,2	10,11	8,81
O2 (%)	94,5	94,1	86,4
Conductivité (µS/cm)	440	455	591
<i>E. coli</i> (UFC/100ml)	800	1200	9000

3.2.2. Dénombrements

Les figures 3 et 4 présentent la proportion de bactéries résistantes dans les trois échantillons testés ici. La figure 3 concerne les dénombrements réalisés dans le milieu R2A et la figure 4 les dénombrements réalisés sur le milieu DNB. En comparant les trois sites d'échantillonnage, on peut observer que c'est le site de Conflans qui présente les pourcentages les plus élevés de bactéries résistantes, pour les trois antibiotiques et dans les deux milieux de culture. Ceci va dans le sens de ce qui avait été observé par Garcia-Armisen et al. (2011), c'est à dire des proportions plus importantes de bactéries antibiorésistantes sur géloses en aval des grandes agglomérations.

En comparant les résistances aux trois antibiotiques testés sur le milieu R2A, on peut observer que le pourcentage de bactéries résistantes à l'amoxicilline et au sulfométhoxazole est plus important que celui des bactéries résistantes à la tétracycline au moins avec les concentrations testées ici. On peut aussi remarquer que pour l'amoxicilline et le sulfométhoxazole, on observe des pourcentages de bactéries résistantes plus élevés dans l'Oise qu'à Evry.

Les différences observées entre les pourcentages obtenus avec les deux milieux de culture différents mettent aussi en évidence l'importance des efforts de mise en culture dans ce type d'étude. En effet, des communautés bactériennes avec des besoins nutritionnels différents se développeraient dans ces milieux. On observe ainsi que sur le milieu DNB à Conflans les pourcentages les plus élevés sont observés pour le sulfométhoxazole, suivi par la tétracycline et l'amoxicilline qui présente les pourcentages les plus faibles, à la différence de ce qui est observé sur le milieu R2A.

La concentration en antibiotique joue un rôle important dans les résultats des comptages et l'effet ne suit pas les mêmes tendances pour les différents antibiotiques, les différents sites d'échantillonnages et les milieux de culture utilisés. Par exemple, pour l'amoxicilline dans le milieu R2A, alors qu'à 4mg/l, 77% des bactéries sont résistantes dans la Seine à Conflans et 25 % dans l'Oise, alors qu'à une concentration de 100 mg/l, on retrouve presque le même pourcentage dans les deux échantillons (8,0% et 8,8% respectivement). Dans le cas du sulfométhoxazole, la différence entre les pourcentages de bactéries résistantes aux deux concentrations testées, est moins marquée (sur le milieu R2A) dans la

Seine à Conflans (47% à 16mg/l et 36% à 300 mg/l) que dans le ruisseau du bassin de l'Oise ou la Seine à Evry (20% et 7% à 16mg/l et 1,8% et 0,7 % à 300 mg/l, respectivement). Par contre, sur le milieu DNB supplémenté en sulfométhoxazole, le pourcentage de bactéries résistantes retrouvées dans le ruisseau forestier du bassin de l'Oise est plus élevé à la plus haute concentration. Ces résultats reflètent bien la difficulté à comparer ces résultats entre eux et avec ceux de la littérature d'un point de vue quantitatif ; ces différences et changements sont probablement dus à des shifts dans le type de bactéries présentes dans les échantillons et qui arrivent à se développer sur boîtes de Pétri dans les différentes conditions de mise en culture.

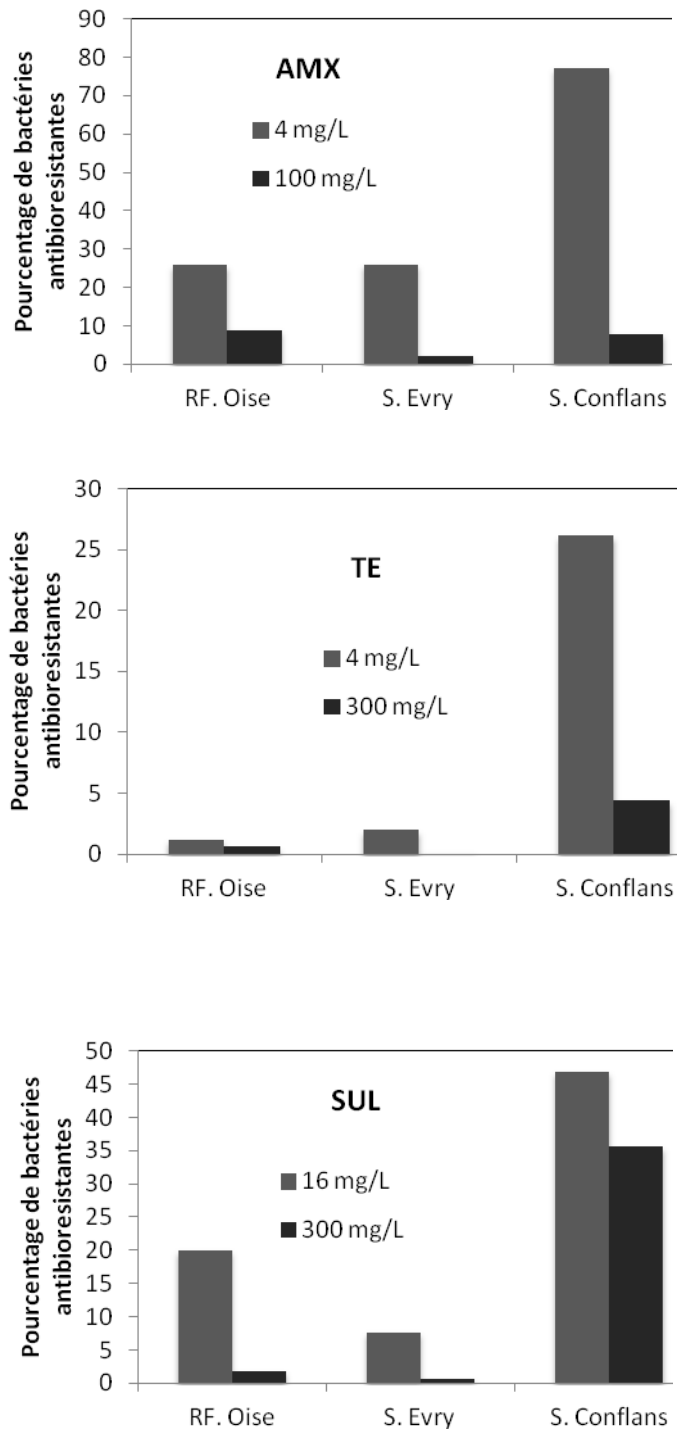


Figure 3 : Pourcentages de bactéries résistantes dénombrées sur le milieu gélosé R2A dans les trois points d'échantillonnage choisis. Amoxiciline (AMX), Tétracycline (TE) et Sulfométhoxazole (SUL)

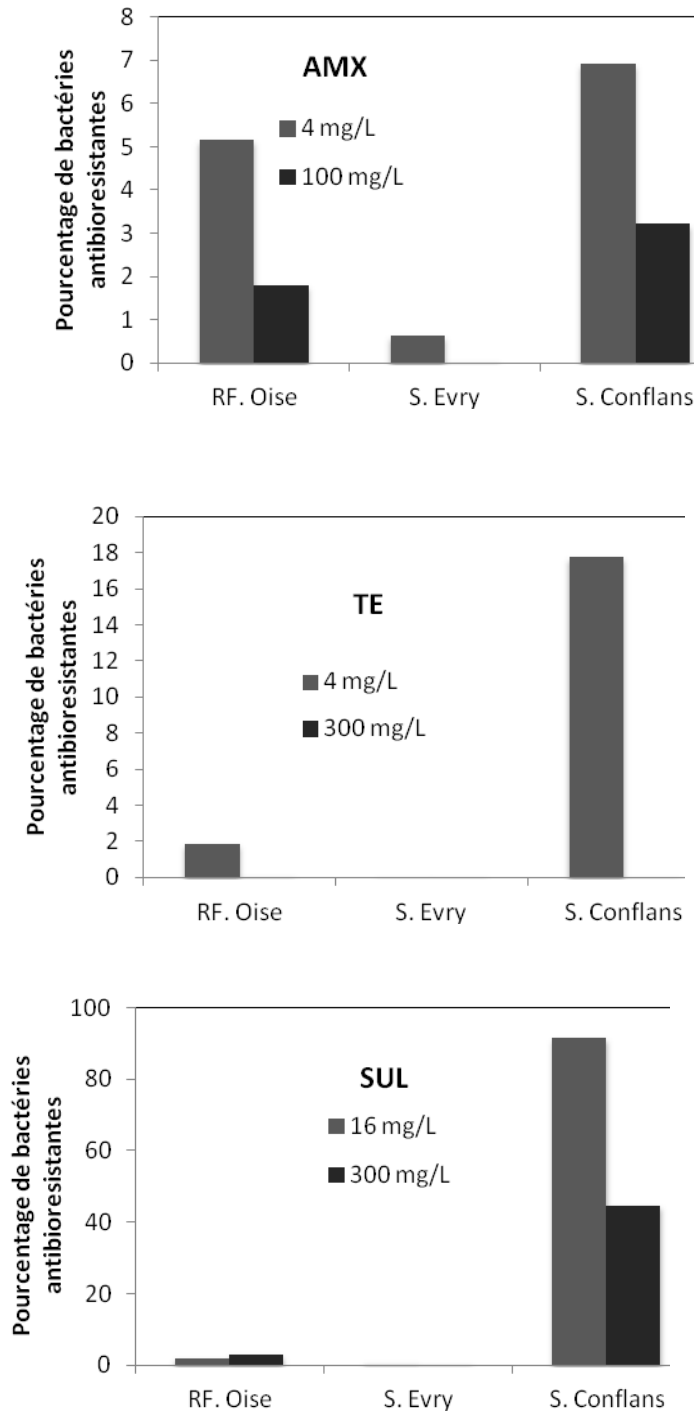


Figure 4 : Pourcentages de bactéries résistantes dénombrées sur le milieu gélosé DNB dans les trois points d'échantillonnage choisis. Amoxiciline (AMX), Tétracycline (TE) et

Sulfométhoxazole (SUL)

La figure 5 présente les pourcentages de bactéries résistantes dénombrés par microscopie à épifluorescence après marquage avec le kit bactlight. A la différence de ce que l'on observe avec la mise en culture des bactéries, aucune différence n'est observée entre les trois échantillons. Par contre, la différence entre les pourcentages de résistance aux antibiotiques suit la même tendance dans les trois échantillons. La résistance au sulfométhoxazole est plus fréquente à la concentration utilisée que les résistances aux deux autres antibiotiques. Par ailleurs il est aussi remarquable qu'alors que les bactéries résistantes à la tétracycline sont difficilement cultivables on les dénombre par microscopie, dans la Seine, en quantités plus importantes que les résistantes à l'amoxicilline.

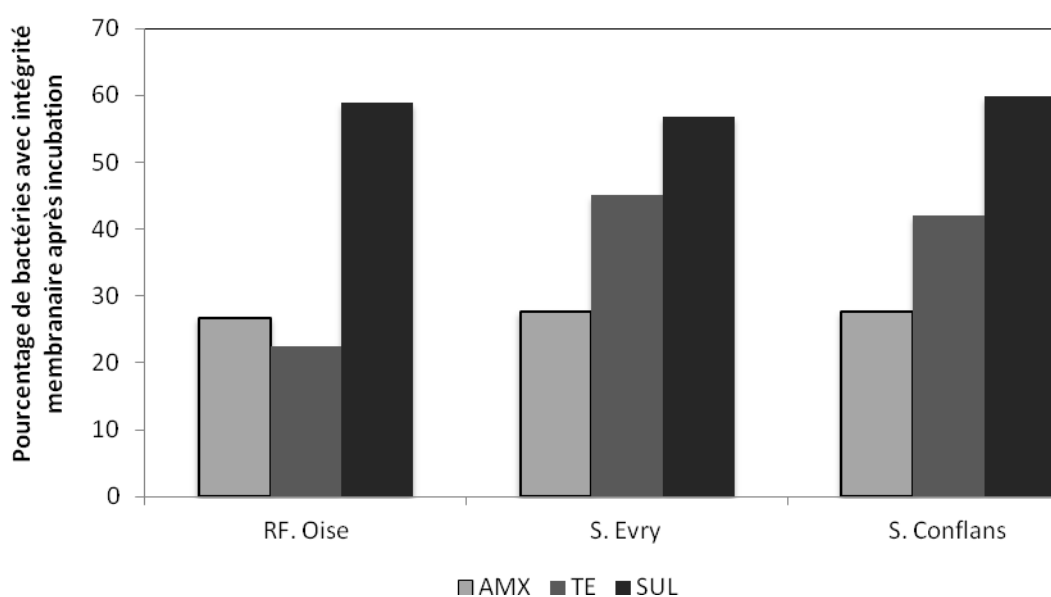


Figure 5: Pourcentages de bactéries résistantes dénombrées par microscopie à épifluorescence.

Bien entendu, il est délicat de comparer les résultats de comptages en boîtes de Pétri et ces comptages en microscopie qui caractérisent de manière très différente la résistance aux antibiotiques. Les dénombrements en microscopie tiennent compte de toutes les bactéries ayant conservé leur intégrité membranaire après 24h d'incubation dans un échantillon supplémenté d'un antibiotique. Dans le cas des comptages sur boîte de Pétri, il est nécessaire que les bactéries ne soient pas seulement intègres mais aussi capable de se multiplier et de former une colonie dans les conditions nutritionnelles déterminées par les milieux de culture utilisés.

Néanmoins, on peut comparer une tendance qui n'est pas la même dans tous les échantillons, et ces résultats suggèrent que les différences observées dans les pourcentages de résistances avant et après le rejet de l'agglomération parisienne seraient plutôt dus à une plus grande proportion de bactéries antibiorésistantes cultivables.

3.2.3. Identification

Nous avons utilisé la fonction « classifier » du site RDP (Ribosomal Database Project) pour avoir un aperçu de l'appartenance phylogénétique des différentes souches antibiorésistantes isolées sur les

milieux de culture. Nous avons considéré uniquement les séquences au dessus d'un seuil de 95% de confiance. Dans la suite de la discussion, nous resterons à des niveaux phylogénétiques élevés (de phylum à famille), mais la majorité des séquences peut être assignée à un genre avec des similitudes égales ou supérieures à 97%.

La figure 6 présente l'ensemble de séquences obtenues pour les souches dans les deux milieux et les trois antibiotiques confondus. Un total de 74 souches ont pu être identifiées. Trois phyla sont représentés: Actinobacteria avec une seule séquence, Bacteroidetes avec 13 séquences dans les classes Flavobacteria et Sphingobacteria et 60 d'entre elles peuvent être associées au phylum des Protéobactéries ; 13 aux Betaprotéobactéries et 47 aux Gammaprotéobactéries. A l'intérieur des Gammaprotéobactéries, les familles les mieux représentées sont les Aeromonadaceae et les Pseudomonadaceae. On peut aussi remarquer que les Entérobactériaceae sont très bien représentées avec 10 séquences appartenant à cette famille.

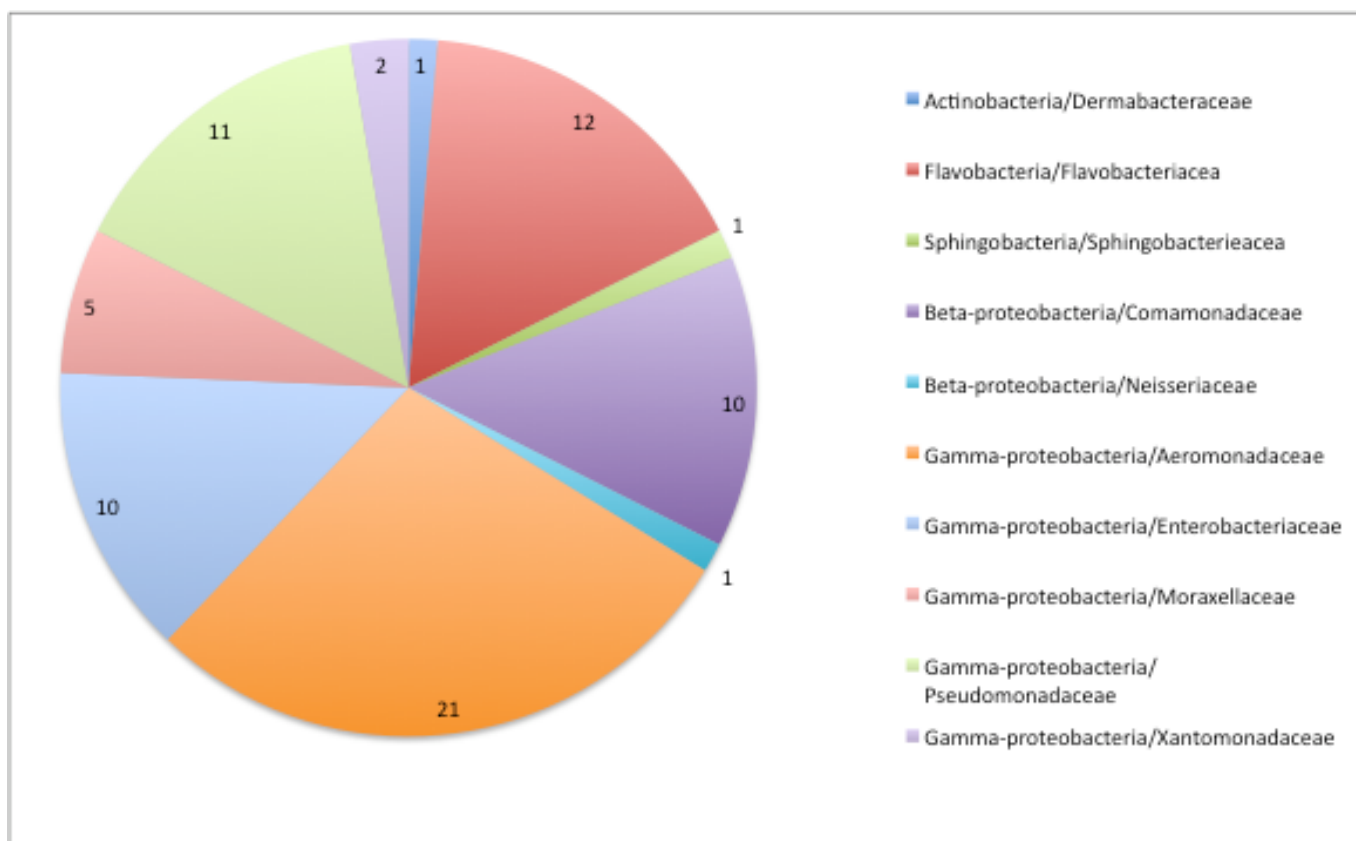


Figure 6: Classification phylogénétique (classe/famille) des souches antibiorésistantes (n=74) isolées sur gélose dans les échantillons des rivières du bassin de la Seine. Les chiffres correspondent au nombre de souches identifiées comme appartenant à ces familles.

La figure 7 présente la classification des souches isolées sur les milieux gélosés supplémentés avec chacun des trois antibiotiques utilisés. On observe que dans le cas de l'amoxicilline les différentes familles sont assez équitablement distribuées, alors que presque la moitié des souches isolées à partir des milieux supplémentés avec la tétracycline sont des Aeromonadaceae et que les Flavobactériaceae dominent parmi les souches isolées à partir des milieux supplémentés avec le sulfométhoxazole.

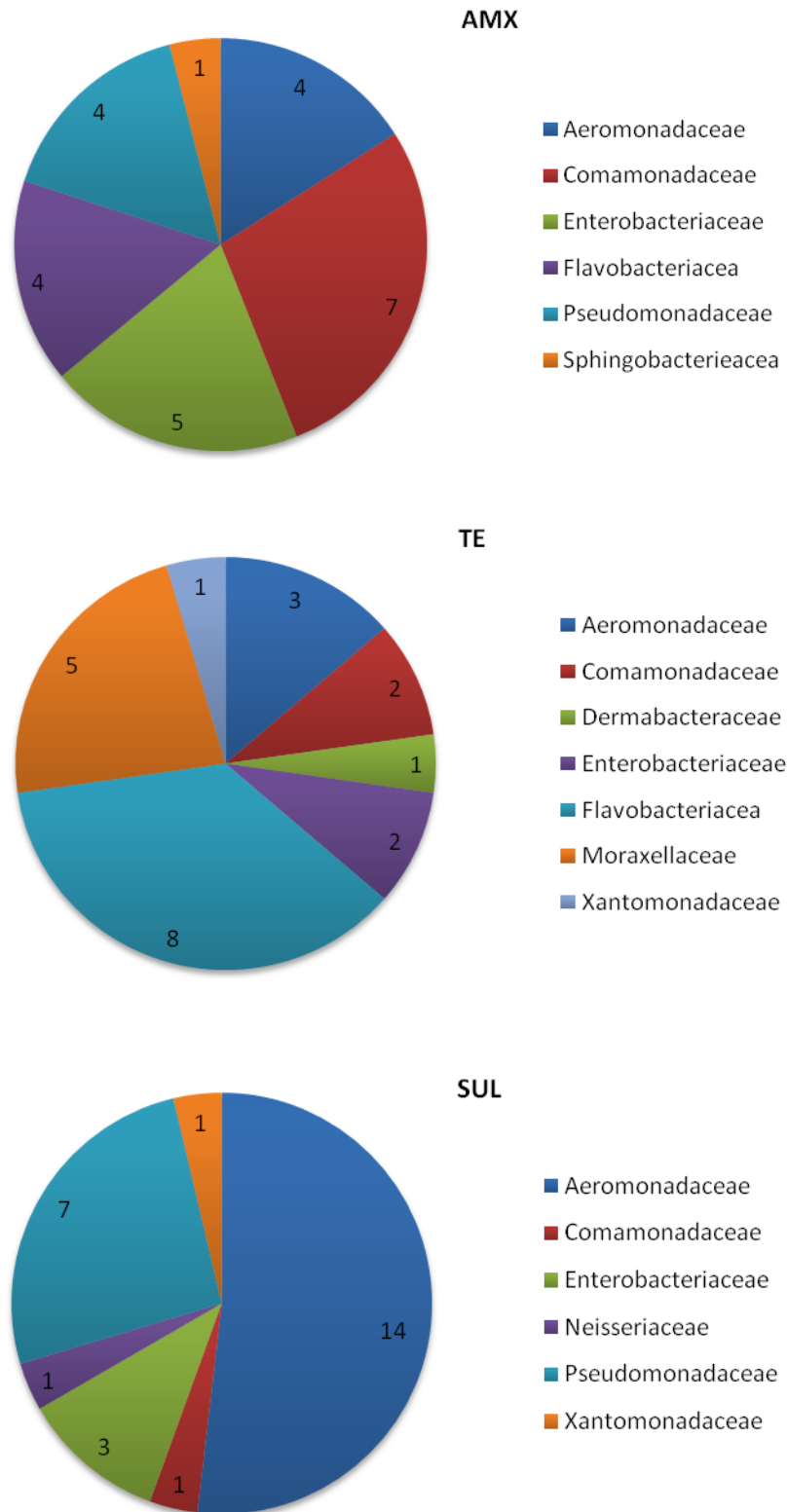


Figure 7: Classification phylogénétique des souches antibiorésistantes isolées sur gélose dans les échantillons des rivières du bassin de la Seine pour chacun des trois antibiotiques utilisés. AMX n= 25, SUL n= 27, TET n= 22

Les trois antibiotiques utilisés ayant des mécanismes d'action différents sélectionnent des groupes bactériens différents, mais certains groupes comme les *Aeromonadaceae* se retrouvent bien représentés entre les souches résistantes aux trois antibiotiques. Par contre, les Flavobactéries et les bactéries de la famille des *Comamonadaceae* semblent être sensibles à la tétracycline et les *Pseudomonadaceae* ne se retrouvent pas parmi les souches résistantes au sulfométhoxazole.

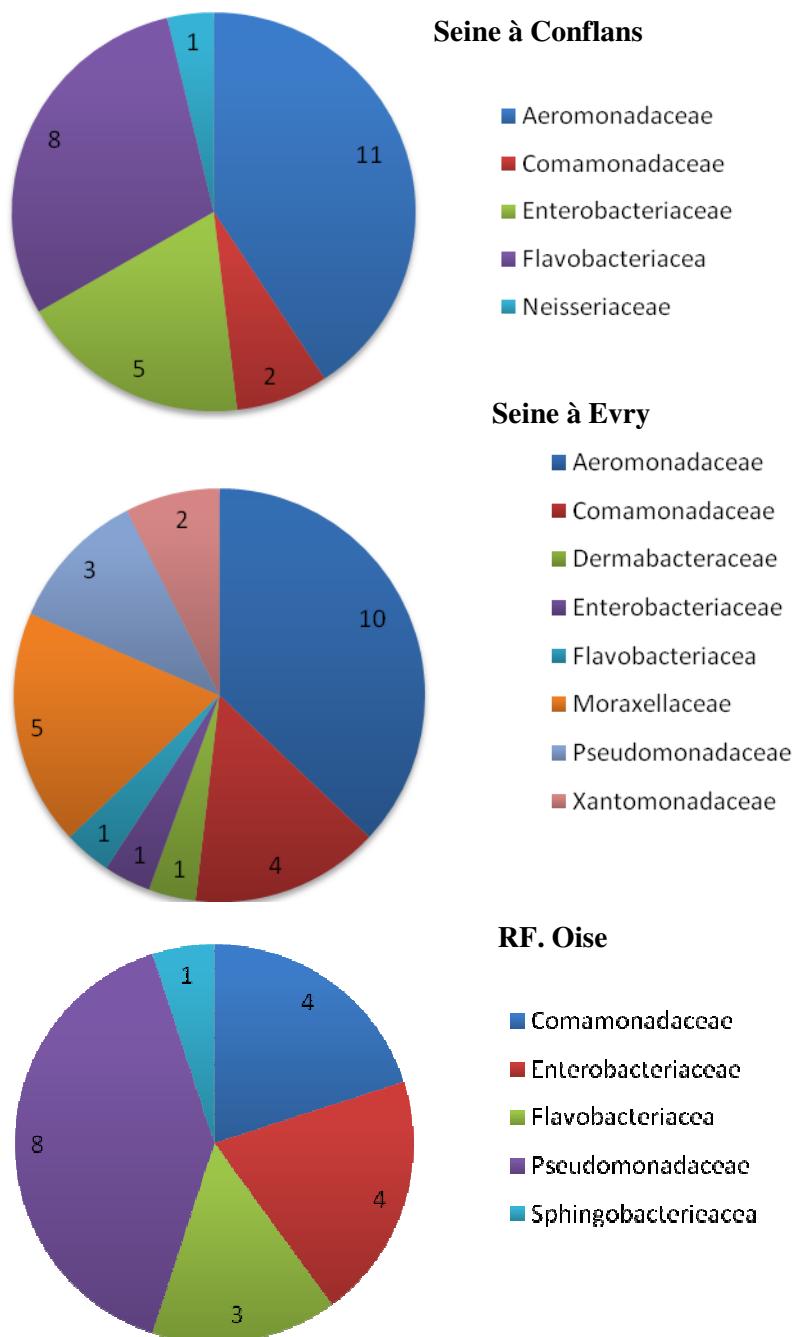


Figure 8: Classification phylogénétique des souches antibiorésistantes isolées sur gélose dans les échantillons des rivières du bassin de la Seine tout antibiotique confondu. S. Conflans n= 27, S. Evry n= 27, RF. Oise n= 22.

La figure 8 présente la distribution des différents phylotypes dans les trois échantillons étudiés, tout antibiotique confondu. On voit que les deux stations de la Seine, en amont et aval de Paris, sont dominées par des souches de la famille des Aeromonadaceae. Par contre, à Conflans, en aval des rejets des eaux usées parisiennes, les Entérobactéries et les Flavobactéries sont plus fréquentes qu'à Evry. Dans le ruisseau forestier du bassin de l'Oise, on observe une communauté complètement différente, dominée par des Pseudomonadaceae; les entérobactéries et les flavobactéries sont également largement présentes. Il est intéressant de noter que nous n'avons pas isolé d'Aeromonas de cet échantillon, alors que ce groupe domine largement les deux autres stations.

Des analyses du pattern de multirésistance des souches isolées sont en cours ce qui nous permettra de voir si ce pattern est influencé par le site d'échantillonnage.

Par ailleurs, les expériences de PCR-DGGE qui nous permettront d'accéder à la diversité des bactéries antibiorésistantes sans passage par mise en culture sont en cours en ce moment.

4 Conclusions

Des pourcentages non négligeables de résistances aux antibiotiques testés ont été mesurés pour les bactéries autochtones des échantillons environnementaux. L'absence de relation entre les pourcentages de résistances des *E. coli* et des bactéries autochtones dans les échantillons environnementaux ne permet pas de démontrer un transfert de l'antibiorésistance des bactéries fécales vers les autochtones.

Le dénombrement et l'identification des souches autochtones antibiorésistantes en trois points du bassin de la Seine a mis en évidence des différences dans l'abondance des bactéries antibiorésistantes cultivables entre les différents sites d'échantillonnage, les pourcentages les plus élevés se trouvant systématiquement à Conflans, en aval de l'agglomération parisienne. Les groupes phylogénétiques identifiés semblent être associés pas seulement aux antibiotiques utilisés comme pression de sélection mais aussi aux sites d'échantillonnage. L'analyse du pattern de multirésistance des souches isolés ainsi que l'étude de la diversité des bactéries antibiorésistantes sans passage par mise en culture nous permettra de dresser un meilleur tableau sur l'occurrence de l'antibiorésistance parmi les bactéries autochtones dans le bassin de la Seine.

Références

- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8), 2461-2470.
- Hiroiyuki, O., Tsutomu, H., 1983. Oligotrophic bacteria on organic debris and plant roots in a paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 15 (1), 1e8.
- Garcia-Armisen, T., Vercammen, K., Passerat, J., Triest, D., Servais, P. and Cornelis, P. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. *Water Research*. 2011. 45 : 788-796.
- Servais, P and Passerat, J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river basin (France). *Science of the Total Environment*. 2009. 408: 365-372.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Dinh, Q.T., Clement, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment* 393 (1), 84-95.