



Occurrence et devenir des populations d' *Escherichia coli* antibiorésistantes dans différents environnements aquatiques

Fabienne Petit, Antoine Andremont , Thierry Berthe, Erick Denamur, Olivier Clermont, Roland Leclercq, Jean Paul Dupont, Vincent Cattoir, Hélène Budzinski, Nicolas Massei, Yves Levi

UMR CNRS 6143 M2C, SFR SCALE, Normandie Université, INSERM IAME Université Paris Diderot, EA4655, CHU de Caen, Normandie Université, UMR CNRS 5805 EPOC-LPTC, Université de Bordeaux, ESE Faculté de Pharmacie Université Paris Sud



FR 3730



Origine des antibiotiques et des gènes de résistance aux antibiotiques ?

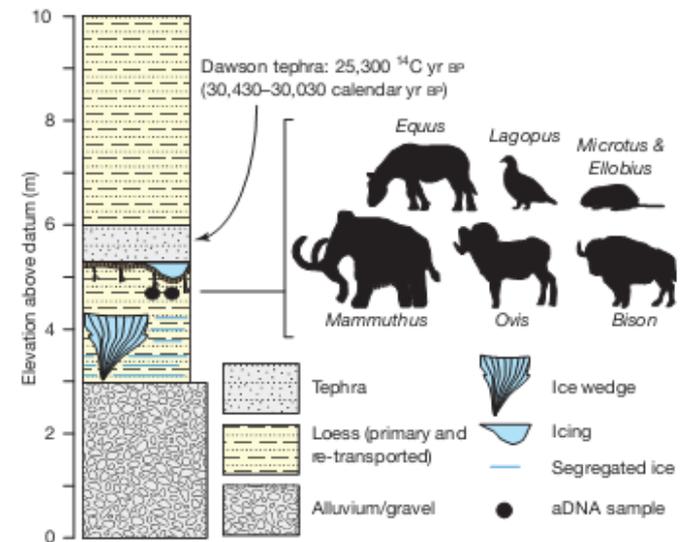
- Présence d'antibiotiques et des gènes de résistance dans l'environnement, bien avant leur usage en thérapie humaine et animale (D'Costa et al., 2011 Bhullard et al., 2012)
- ... à des concentrations *in situ*, pour lesquelles l'effet bactéricide ou bactériostatique, emblématique de ces molécules, n'est pas observé (Aminov, 2009 ; Allen, 2010).

LETTER

doi:10.1038/nature10388

Antibiotic resistance is ancient

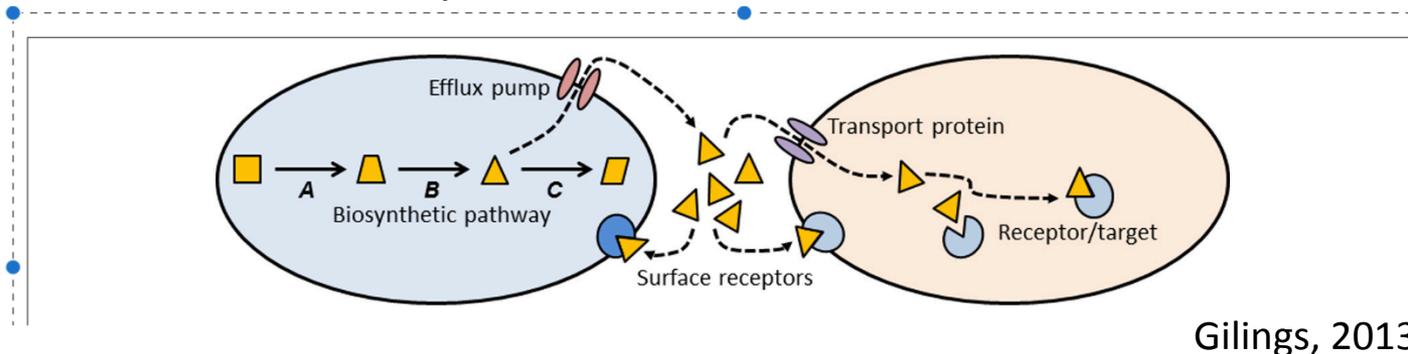
Vanessa M. D'Costa^{1,2*}, Christine E. King^{3,4*}, Lindsay Kalan^{1,2}, Mariya Morar^{1,2}, Wilson W. L. Sung⁴, Carsten Schwarz³, Duane Froese⁵, Grant Zazula⁶, Fabrice Calmels⁵, Regis Debruyne⁷, G. Brian Golding⁴, Hendrik N. Poinar^{1,3,4} & Gerard D. Wright^{1,2}



Gènes codant les voies de biosynthèse des antibiotiques ou les mécanismes de résistance aux antibiotiques dans l'ADN extrait de carottes glaciaires datant du Pleistocène (30 000 ans) . D'Costa et al., 2011

Origine des antibiotiques et des gènes de résistance aux antibiotiques ?

- Les antibiotiques appartiennent à une classe de molécules bioactives (Parvome)



- L'action mutagène des antibiotiques aux concentrations sub-inhibitrices :
 - activation de la réponse SOS, augmentation de la fréquence des transferts horizontaux de gènes, et de la transposition, apparition de phénotypes hypermutateurs (Goh et al., 2002 ; Davies et al., 2006 ; Kohansk et al., 2010 ; Gulberg et al., 2011 ; Blasquez et al., 2012)

- Paramètre de contrôle de la dynamique des communautés microbiennes dans l'environnement , qu'il faut replacer dans un contexte évolutif (Aminov, 2009 ; Blasquez et al., 2012 ;).

Origine des antibiotiques et des gènes de résistance aux antibiotiques ?

914 J. Nesme and P. Simonet

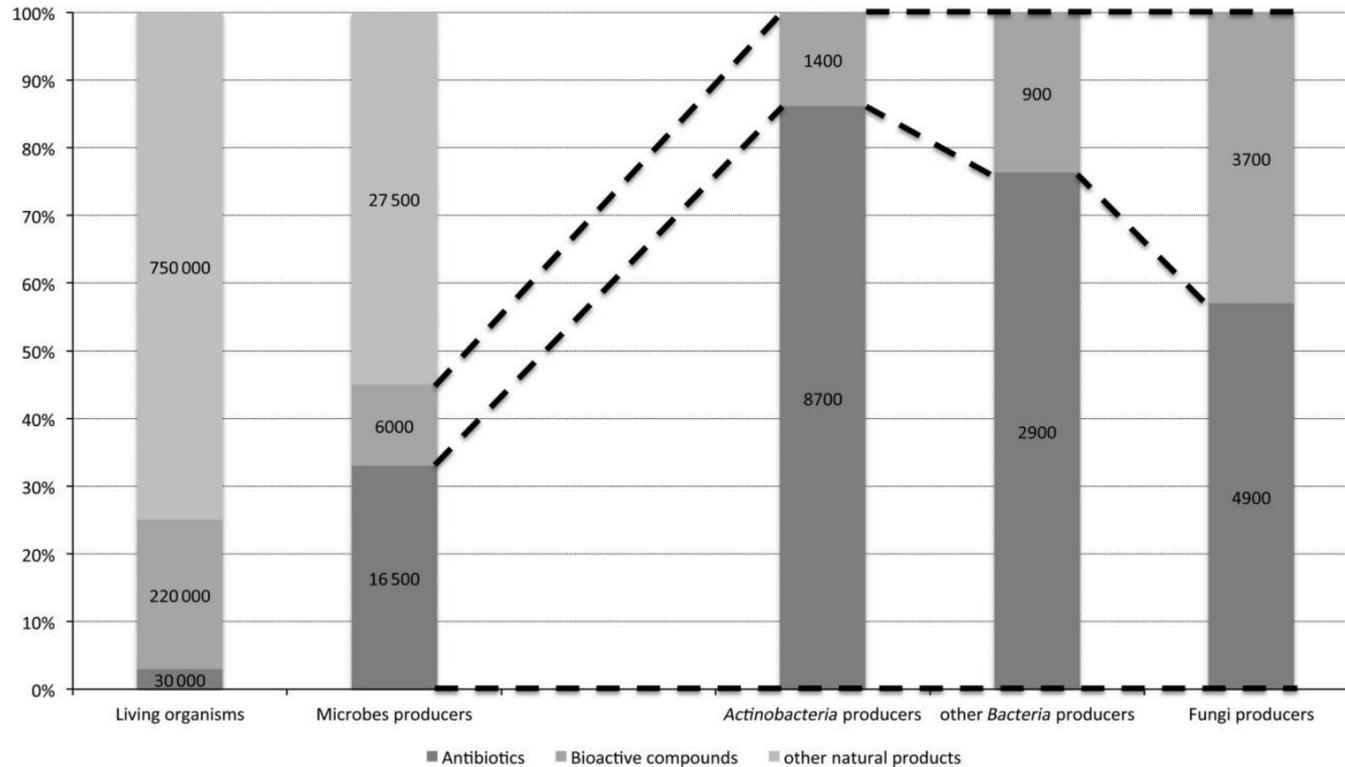
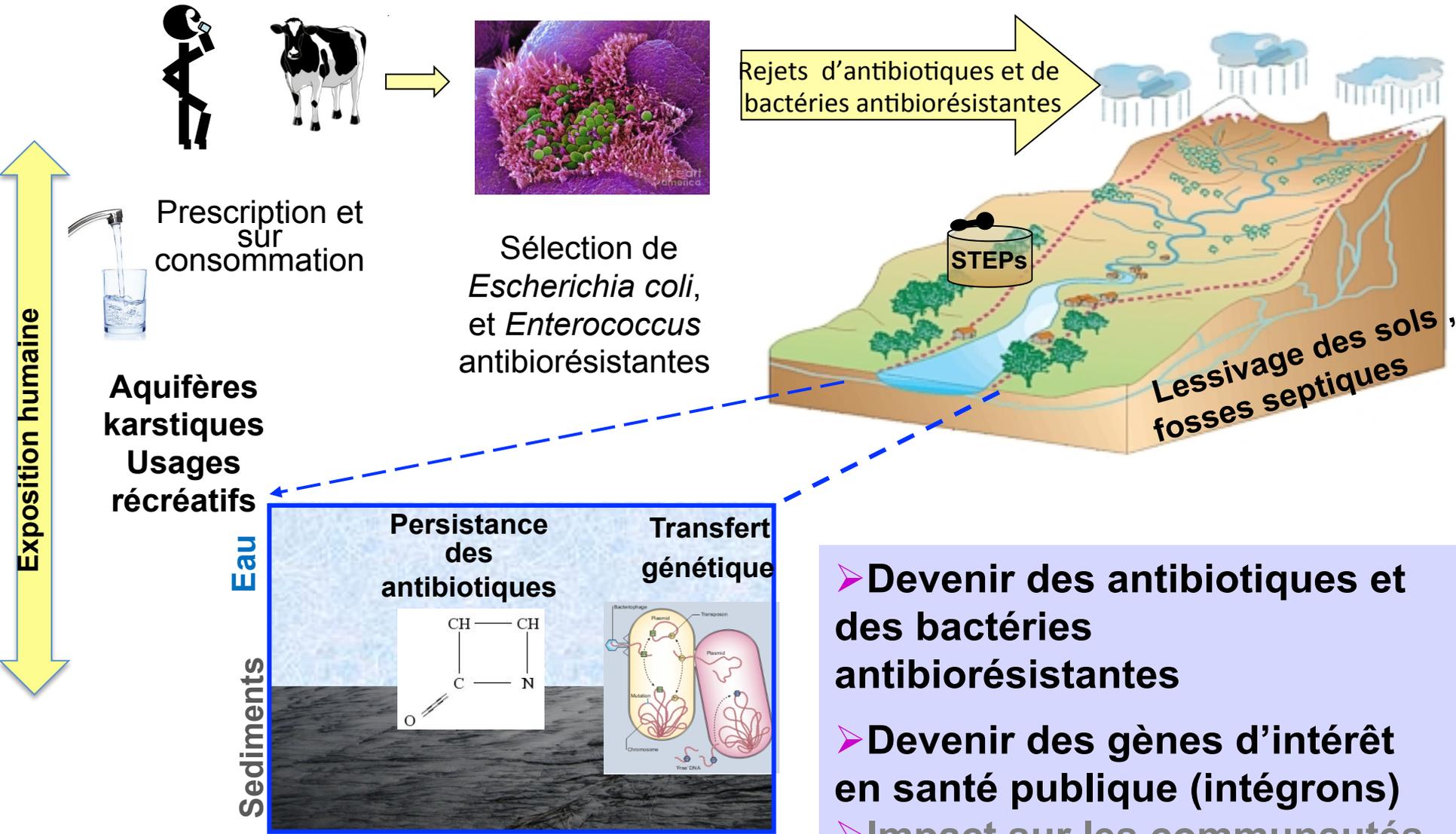


Fig. 1. Stacked histogram showing the relative antibiotic and bioactive compounds percentage in known natural products from living organisms. Staked histograms are showing the proportion of known bioactive and antibiotics molecules produced by (from left to right): all living organisms from the three domain of life; microorganisms only; *Actinobacteria*; other bacteria and fungi. All data are from Bérdy (2005).

Les antibiotiques sont des molécules bioactives produites par les microorganismes du sol (Nesme & Simonet, 2014).

L'antibiorésistance bactérienne : une problématique environnementale et de santé publique



- Devenir des antibiotiques et des bactéries antibiorésistantes
- Devenir des gènes d'intérêt en santé publique (intégrons)
- Impact sur les communautés fonctionnelles

Vulnérabilité d'un hydrosystème karstique à la contamination par des *E. coli* antibiorésistantes



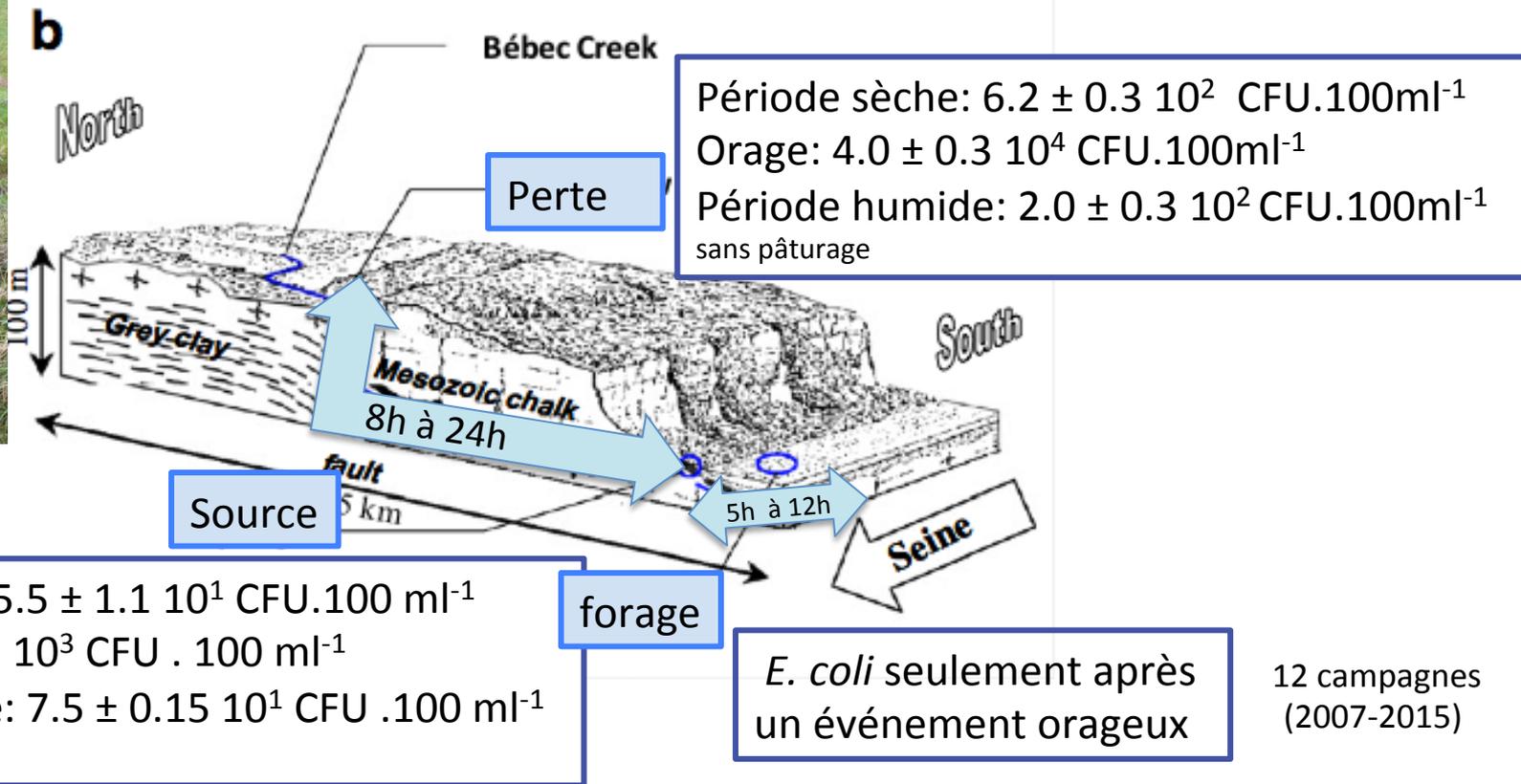
L'aquifère karstique : ressource d'eau potable pour 33 % de la population française

Vulnérabilité d'un hydrosystème karstique à la contamination par des *E. coli* antibiorésistantes

INSU/CNRS
SNO Karst

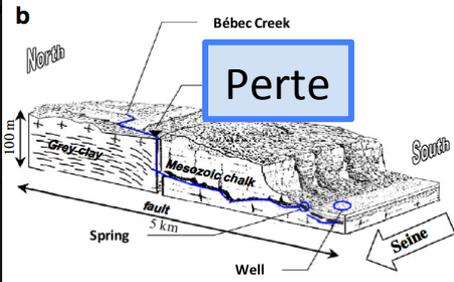


639 hab, 172 bovins
Bassin versant (10 km²)



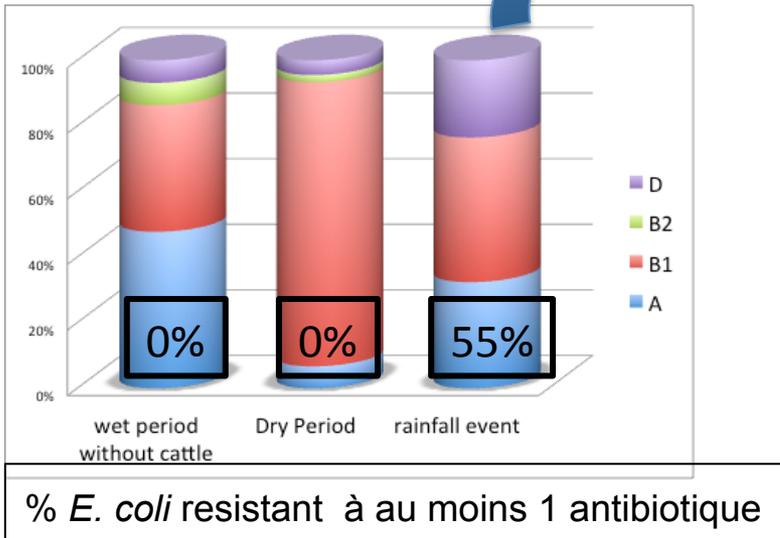
- Apport d' *E. coli* dépend de la pluviométrie et des périodes de pâturage
- Diminution de 3 ordres de grandeurs entre la perte et le forage due à la dilution avec l'aquifère de la craie

Vulnérabilité d'un hydrosystème karstique à la contamination par des *E. coli* antibiorésistantes

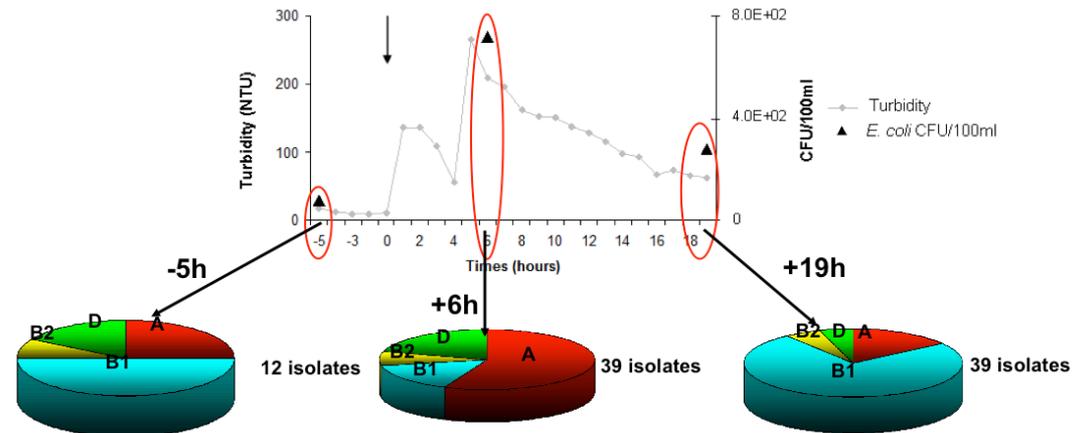


Distribution des phylogroupes et résistance aux antibiotiques

Conditions hydrologiques contrastées à la perte



Evènement orageux



- Phylogroupe A
- 45% *E. coli* résistant (à au moins 1 antibiotique)
- 59% *E. coli* résistant (à au moins 1 antibiotique)
- phylogroupe B1 (*hly*⁺)

➤ Lors d'un événement orageux, un changement dans la structure des populations *E. coli* est du à un apport d'*E. coli* origine humaine (phylogroupe A résistant aux antibiotiques), et d'origine bovine (B1 phylogroup, *hly*⁺)

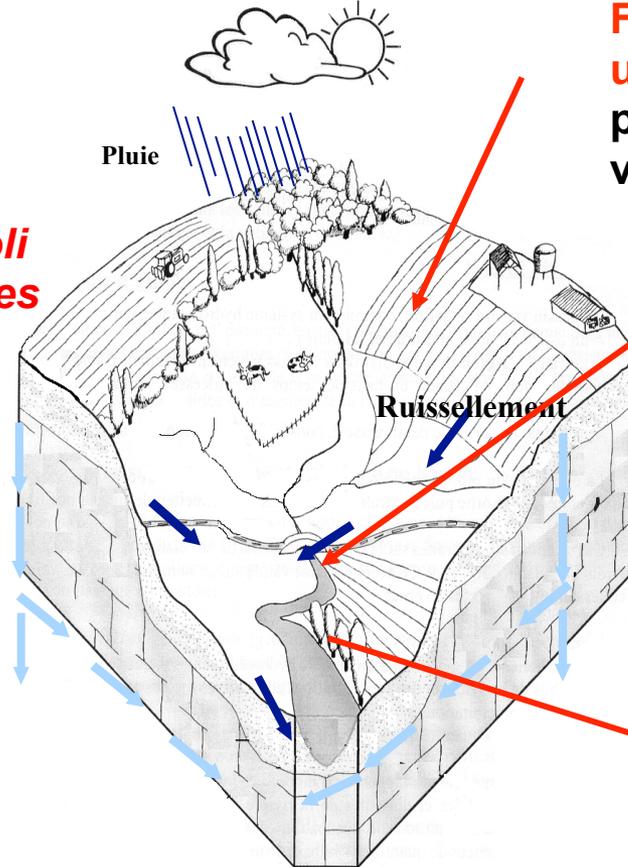
Vulnérabilité d'un hydrosystème karstique à la contamination par des *E. coli* antibiorésistantes

SNO karst



Suivi de la contamination d' *E. coli* dont les souches antibiorésistantes

*Suivi des intégrons cliniques
Leur présence étant fonction des usages du bassin versant (Ribeiro et al, 2012)*



Facteurs hydrologique et usage : pâturages , pluviométrie, pratiques vétérinaires

Survie vitesse de transfert: attachement aux particules, Biofilms

Paramètres (SNO):

- Variables hydrologiques (précipitations, débits et niveaux d'eau)
- Variables physico-chimiques (conductivité électrique, température, turbidité, pH)

Perspectives: Relation turbidité / *E. coli* (morphopgranulomètre Laser) afin de modéliser et prédire les périodes de contamination de l'eau par des *E. coli* antibiorésistantes

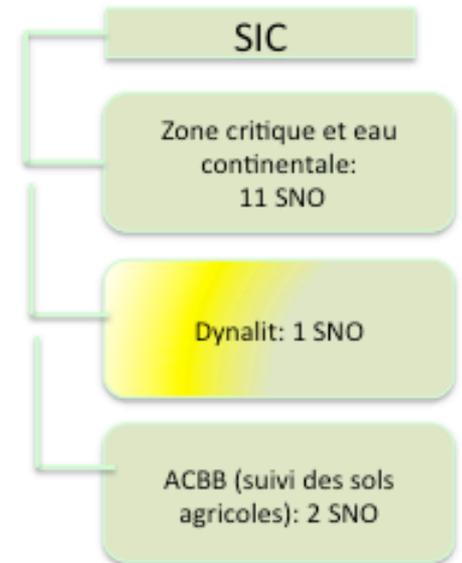
Les « Services Nationaux d'Observation » (SNO)



Observer, expérimenter, comprendre, modéliser,
pour prévoir, agir et traiter.

- Les SNO ont vocation à documenter sur le long terme la formation, l'évolution, la variabilité des milieux terrestres,
- les SNO sont rassemblés par l'INSU au sein d'Actions Nationales pour l'Observation (ANO).
- Validation et archivage des données acquises au service de la communauté

Surfaces et interfaces continentales (SIC)



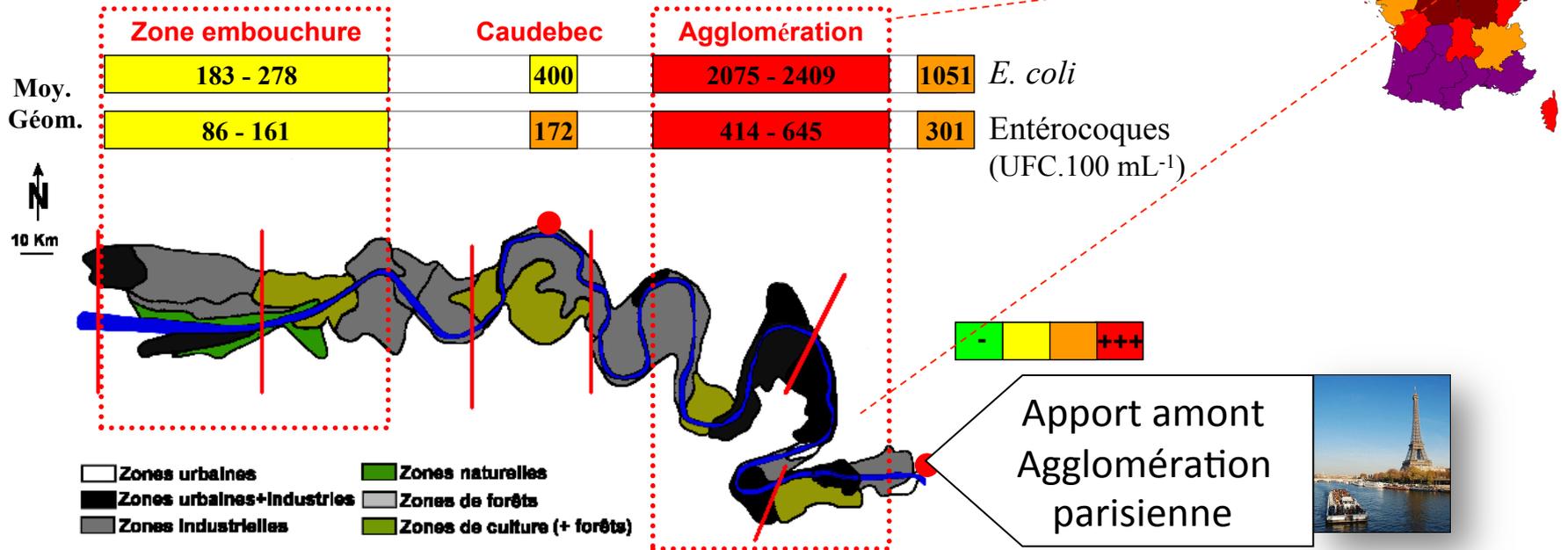


Vulnérabilité des milieux estuariens à la contamination par des bactéries antibiorésistantes



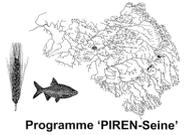
Vulnérabilité des milieux estuariens à la contamination par des bactéries antibiorésistantes

➤ **France:** 4^{ème} consommateur de médicaments au monde



- **L'estuaire de Seine** un des estuaires les plus anthropisés d'Europe (30% de la population française)
- Contamination de l'eau en antibiotiques: 40 ng.L⁻¹ à 100 ng.L⁻¹
- Qualité microbiologique médiocre
- Contamination permanente en souches d' *E. coli* antibiorésistantes de 30 à 56%, dont 11% contenant un intégron

Devenir des antibiotiques, Flux de gènes et de bactéries Antibiorésistantes dans les Hydrosystèmes de surface



Projet Flash



➤ Etude à petite échelle spatiale : de la source (prescription) au milieu récepteur (rivière)

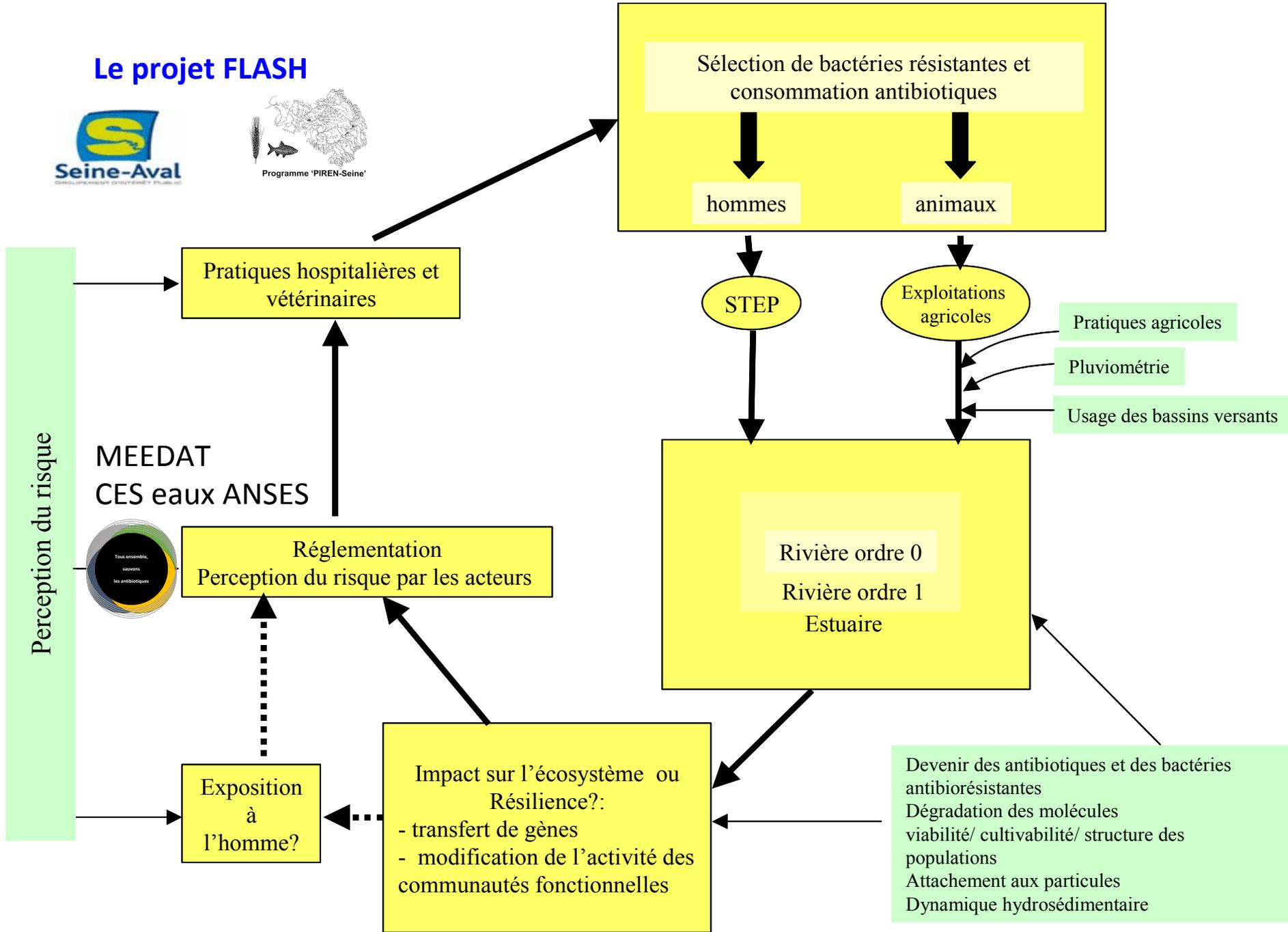
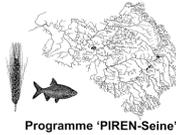
➔ continuum agricole élevage bovin- rivière-Risle

➔ continuum centre de soins- STEP-rivière

➤ Multidisciplinarité: épidémiologistes (UMR INSERM IAME, CHU CAEN), écologistes microbiens (UMR CNRS M2C, UMR Metis), chimistes (UMR CNRS EPOC LPTC), hydrogéologues (UMR M2C),

➤ Collaboration des prescripteurs médecins, pharmaciens, vétérinaires exploitants et des gestionnaires de STEP et de l' hôpital

Le projet FLASH

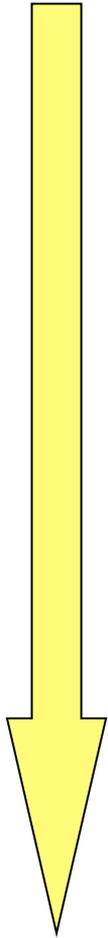


Approche DPSIR (Driving forces, Pressure, State, Impact, Response)

Le continuum agricole

396 habitants
4592 bovins

Pression anthropique



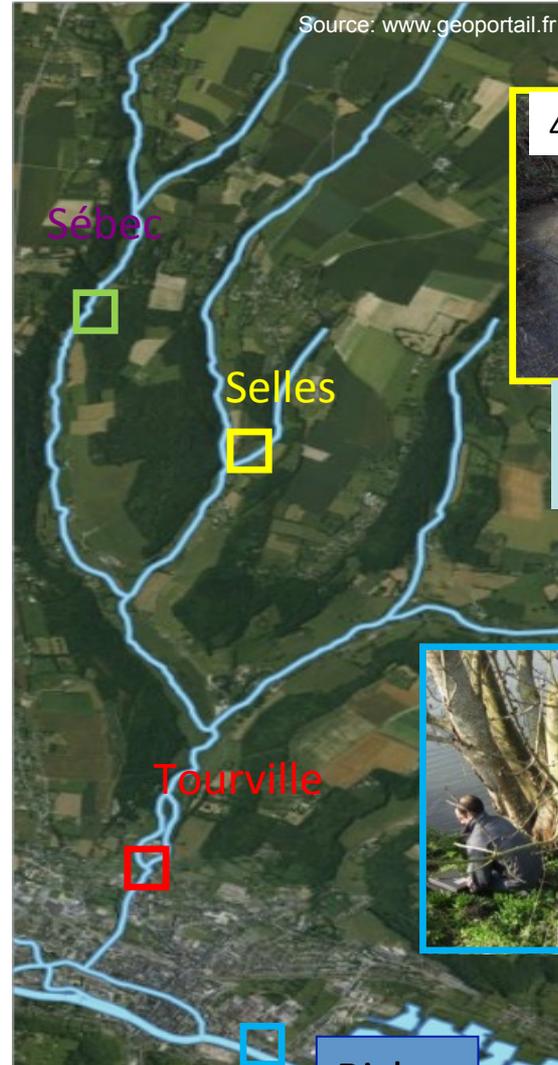
9058 habitants
45 bovins



Site n°1:
Zone forestière
(Sebec)



Site n°3:
Entrée zone urbaine
(Tourville)



450 bovins

Site n°2:
50m exploitation bovine
(Selles)

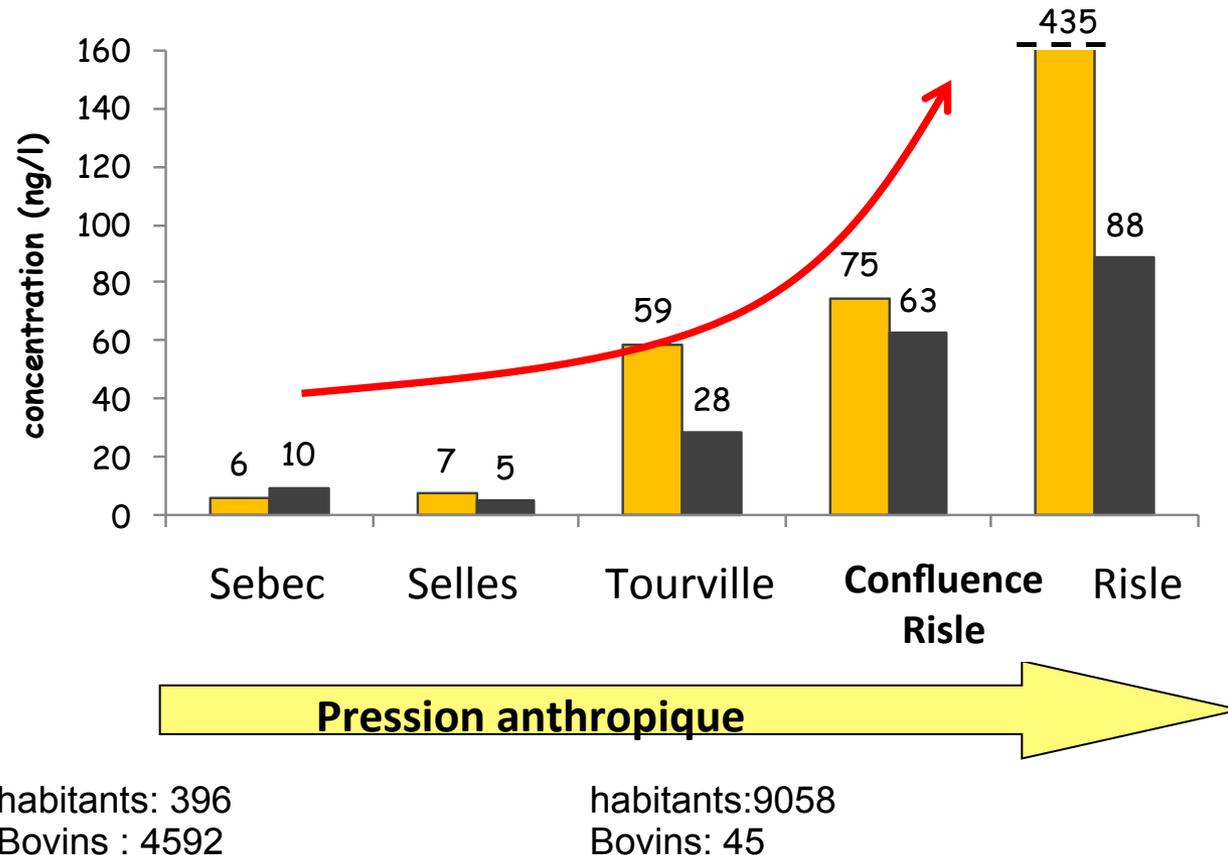


Site n°4:
Zone urbaine
(Risle)

Risle

2 campagnes conditions hydrologiques identiques

Contamination en antibiotiques le long du continuum agricole



Méthode analytique développée au LPTC –UMR EPOC, qui permet la détection de 34 molécules antibiotiques avec un seuil de détection de 1ng.L^{-1} .

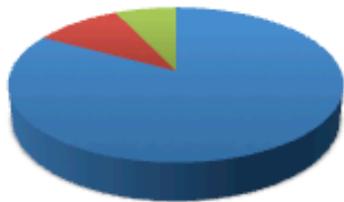
Marion Justine EPOC

Occurrence d'*E. coli* antibiorésistants le long du continuum agricole

% *E. coli* Antibioresistant



$9 \pm 2 \cdot 10^2$ CFU.100ml⁻¹



$2.1 \pm 0.7 \cdot 10^3$ CFU.100ml⁻¹



% *E. coli* Antibioresistant



$1.6 \pm 0.3 \cdot 10^3$ CFU.100ml⁻¹

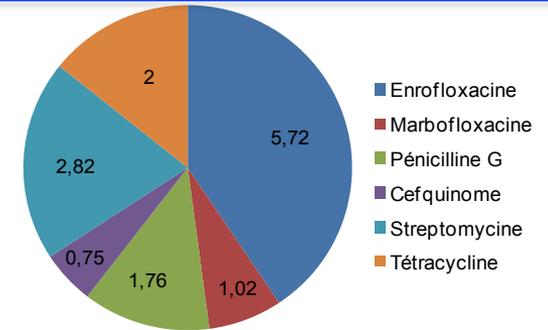


$9.9 \pm 4.1 \cdot 10^3$ CFU.100ml⁻¹

Sensible

Résistant à 1 ou 2 antibiotiques

Résistant à au moins 3 antibiotiques



- 1% résistant à l'amoxicilline
- 1% résistant à la tétracycline
- 1% résistant aux aminosides et chloramphénicol (intégron classe 1)

Continuum hospitalier : centre de Soins – STEP- Risle

Estuaire de Seine

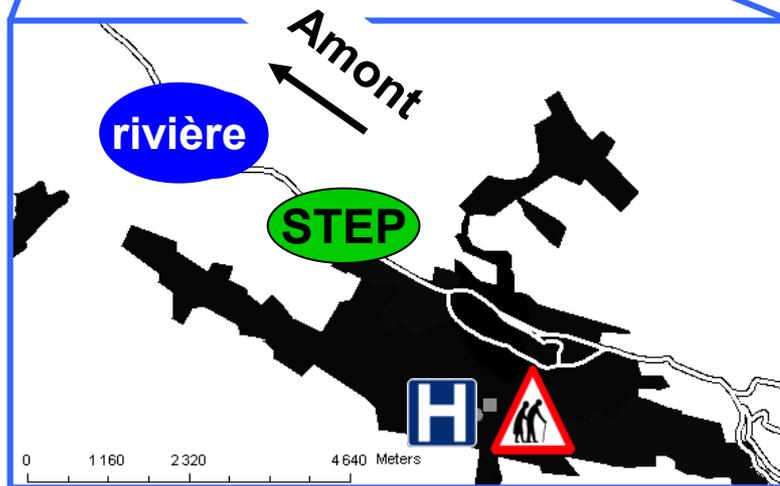


Rivière eau et sédiments



Station Epuration (STEP)

Pont Audemer
9,058 inhabitants



Centre de soins



Hôpital

87 patients

4 à 28 jours



Maison de retraite

180 patients

10 ans en moyenne

Prescription et contamination des effluents hospitaliers



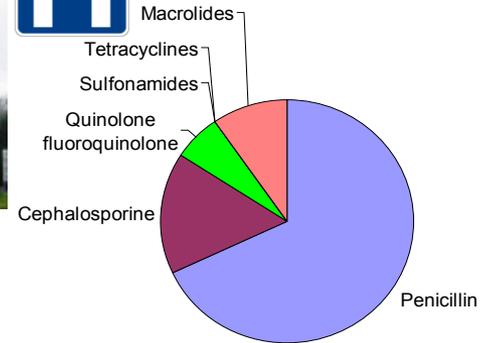
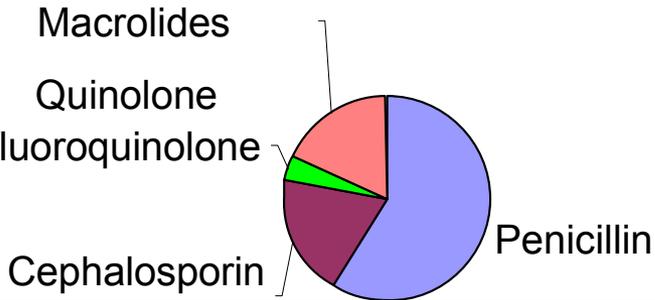
Maison de retraite



Centre médical

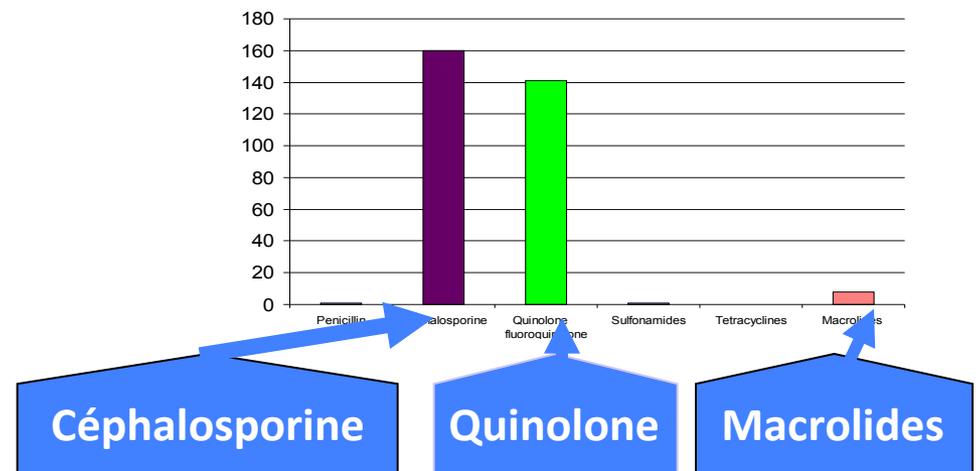
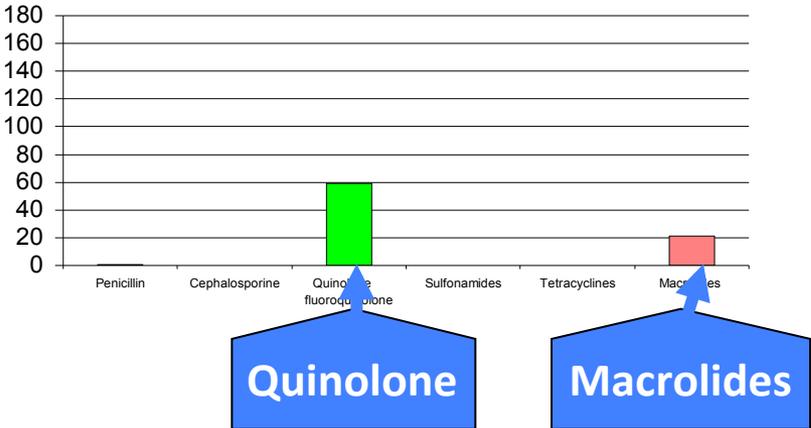


Hôpital



➤ Période épidémique élevée : pénicilline majoritairement prescrite

Antibiotic concentration in effluent ($\mu\text{g.L}^{-1}$)



➤ dans les effluents hospitaliers, seuls les antibiotiques les plus persistants sont détectés (quinolones, céphalosporines, macrolides) Oberlé et al, 2012

Relation entre les prescriptions et l'antibiorésistance d'*E. coli* et *Enterococcus* au centre médical



Maison de retraite



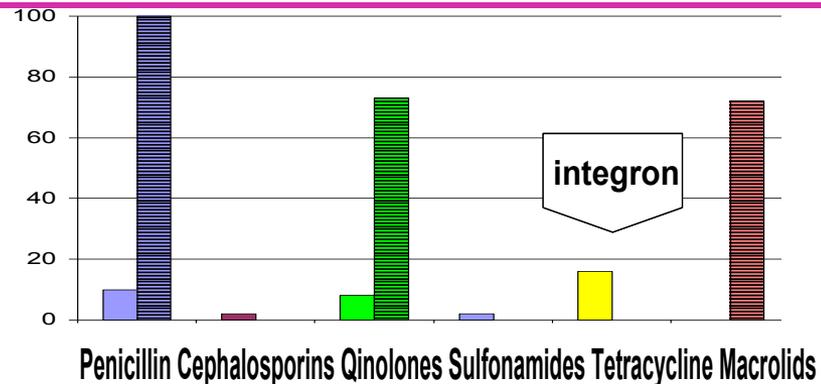
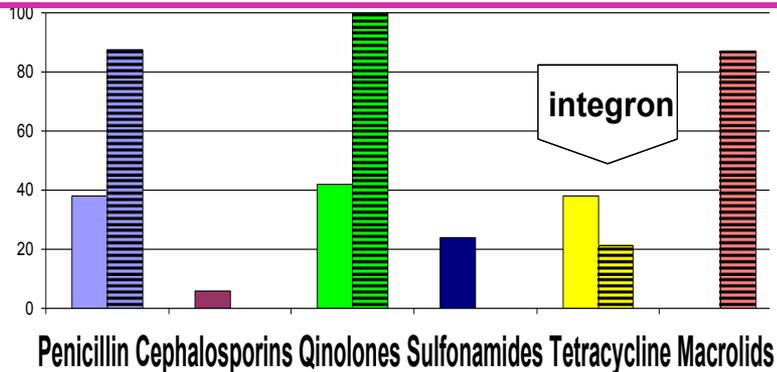
Centre médical



Hôpital

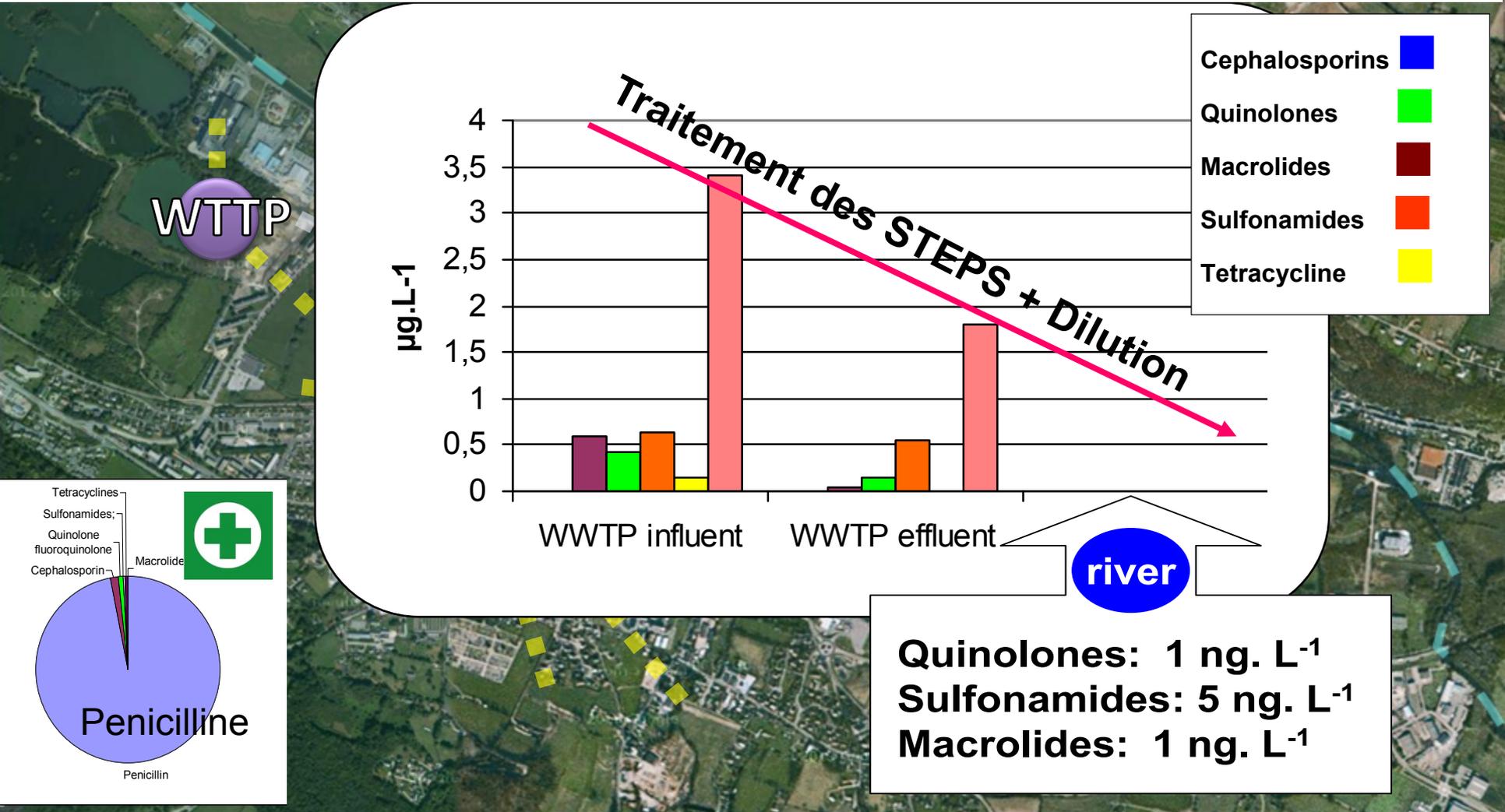
➤ Proportion plus importante de souches résistantes dans les rejets de la maison de retraite (82%) due au plus long séjour

Profil de résistance aux antibiotiques d'*E. coli* ■ et *Enterococcus* ▨ (17 antibiotiques testés)



➤ Les résistances les plus élevées correspondent aux antibiotiques prescrits, parfois associées à d'autres résistances, dues à la présence d'integron Oberlé et al, 2012

Contamination en antibiotiques le long du continuum

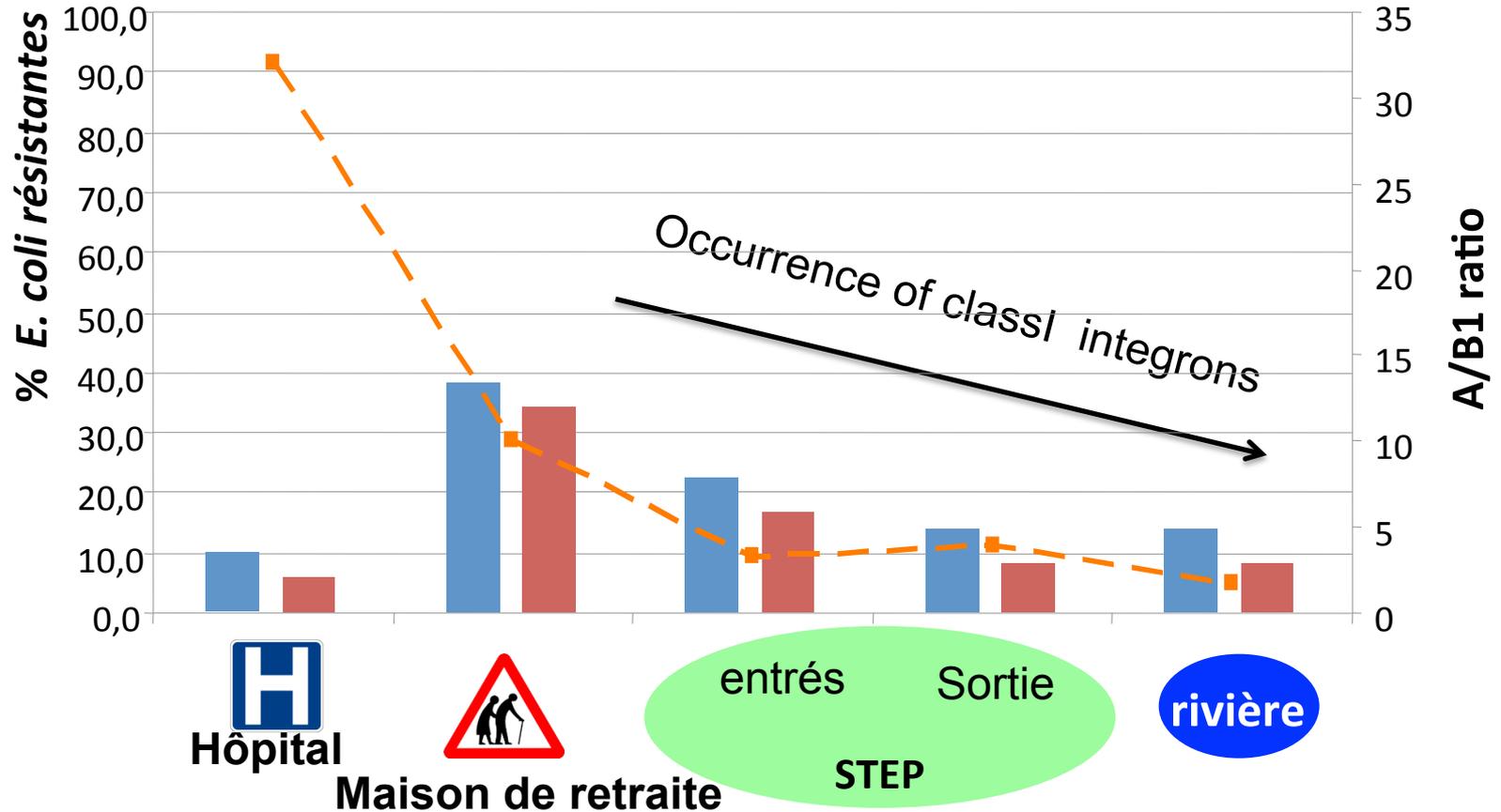


- Diminution des concentrations le long du continuum (µg.L⁻¹ à ng.L⁻¹)
- concentrations trop faibles pour exercer une pression sélective sur les bactéries

Structure et antibiorésistance des populations d' *E.coli*

■ Résistance à au moins 3 antibiotiques

■ integron de classe 1



- Changement de la structure des populations d' *E. coli* (distribution des phylogroupes)
- Diminution du nombre de souches d' *E. coli* avec intégron de classe 1

Survie des souches d' *E. coli* antibiorésistantes dans l'eau



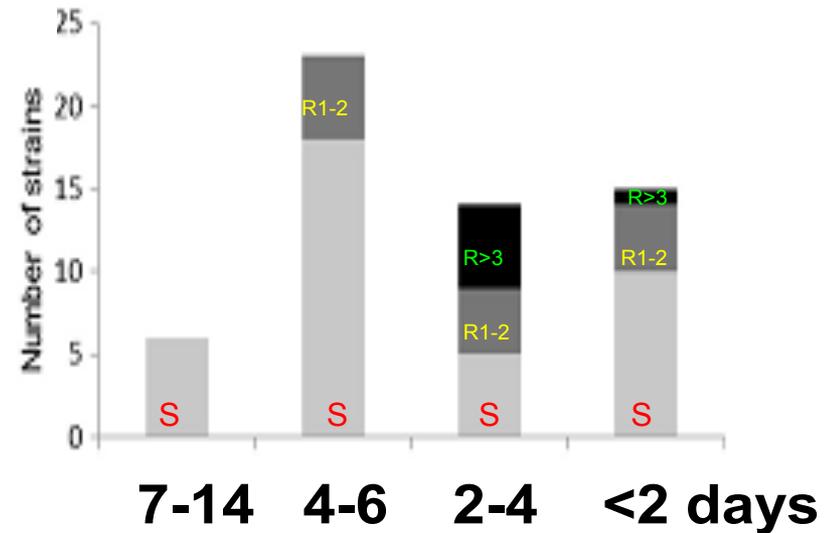
14 jours
10°C

Microcosme eau (88
souches isolées d'eau)

R 3 Resistant to at least 3 antibiotics

R 1-2 Resistant to 1 or 2 antibiotics

S Susceptible to the 17 antibiotics tested

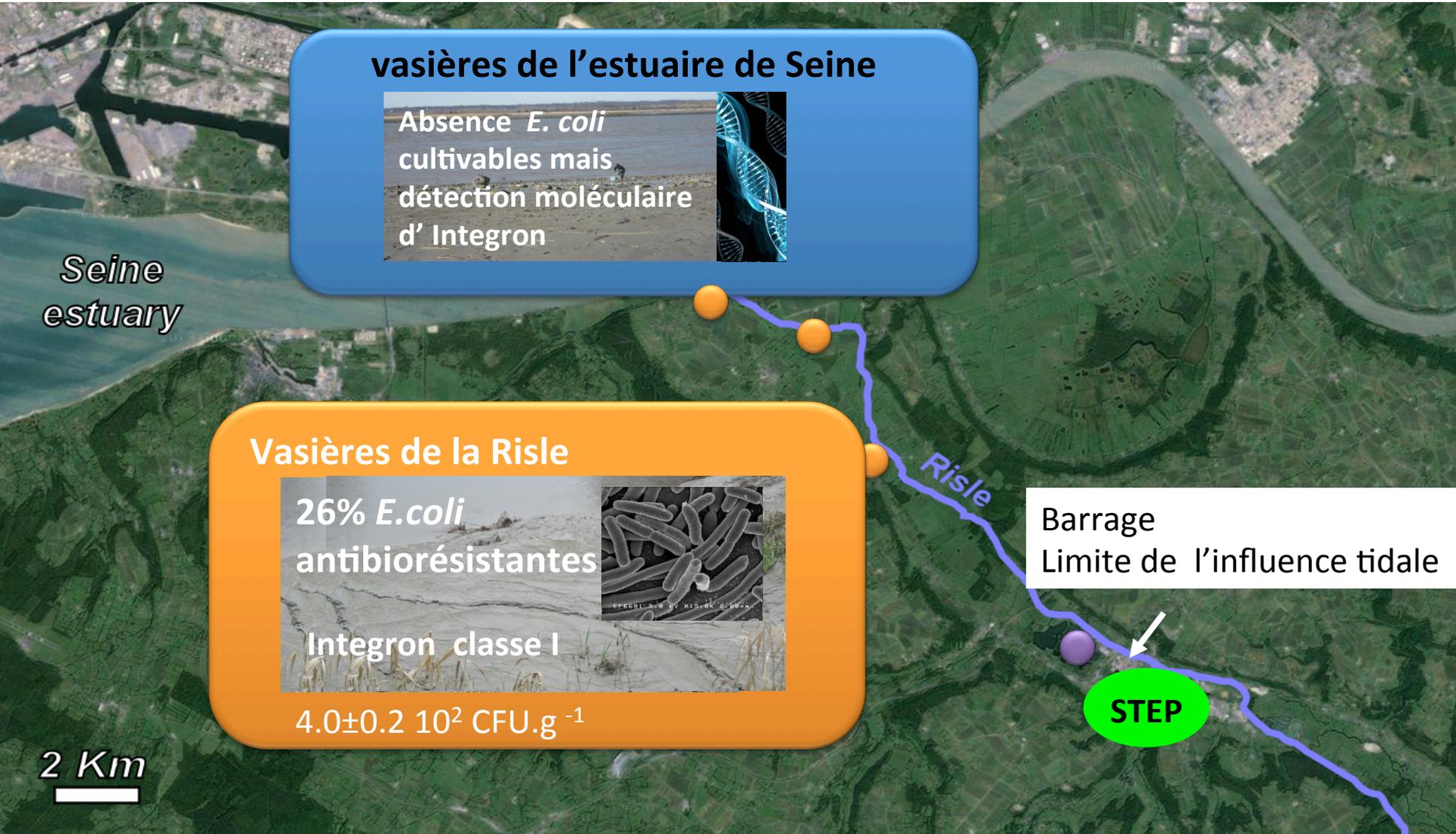


➤ La majorité des souches résistantes à au moins 3 antibiotiques perdent leur cultivabilité avant 4 jours.

➤ Le long du continuum hospitalier les souches multirésistantes disparaissent au profit de souches mieux adaptées à cet environnement

Berthe et al., 2013

Devenir des bactéries antibiorésistantes dans les vasières de l'estuaire



vasières de l'estuaire de Seine

Absence *E. coli* cultivables mais détection moléculaire d'Integron

Vasières de la Risle

26% *E. coli* antibiorésistantes

Integron classe I

$4.0 \pm 0.2 \cdot 10^2 \text{ CFU.g}^{-1}$

➤ le résistome des vasières estuariennes est enrichi par des apports en gènes de résistance aux antibiotiques issus des bactéries fécales

Conclusions

➤ **Relation complexe entre prescription et contamination de l'eau par les antibiotiques et les bactéries antibiorésistantes:**

→ les antibiotiques les plus stables persistent : fluoroquinolones, sulfamides, macrolides

→ les souches d'*E. coli* (et d'*Enterococcus*) d'origine humaine (hôpital) perdent plus rapidement leur cultivabilité dans l'eau

➤ **Quel effet d'une exposition chronique à une multi contamination, en présence de concentrations en antibiotiques dans les eaux inférieures aux concentration subinhibitrices?**

➤ **Enrichissement du résistome environnemental en gènes de résistance, intégrons (vasières et carottes): rétrotransfert à l' Homme?**

Recommandations du groupe de travail au ministère en octobre 2015

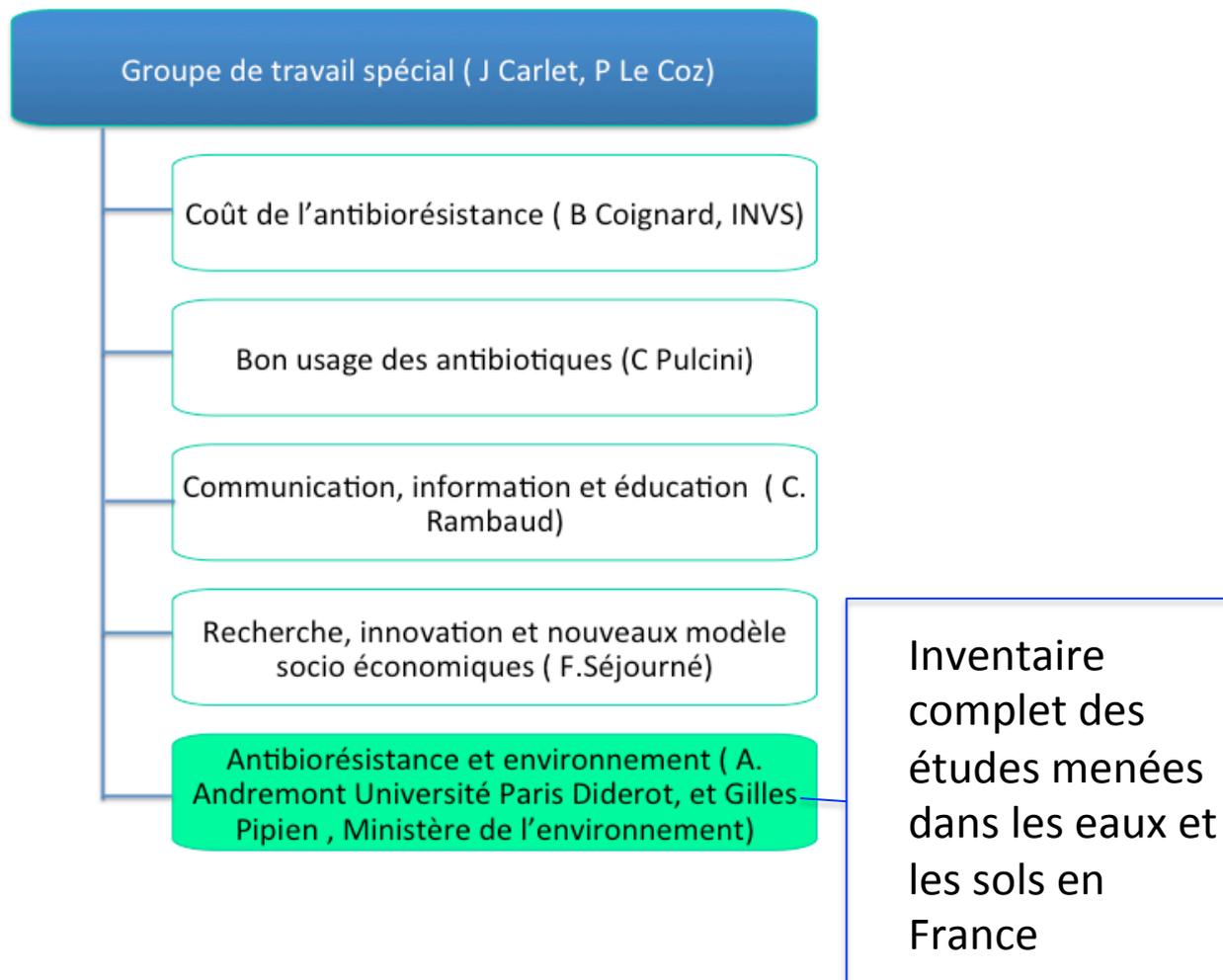
Interface indispensable entre la recherche clinique et recherche en environnement:

- du gène au territoire, sur le long terme
- deux mondes scientifiques aux cultures différentes



Présentation du groupe de travail spécial

Mis en place le 26 janvier 2015, le groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques a eu pour mission de formuler des propositions innovantes, concrètes et réalisables, qui doivent participer à réduire de 25% la consommation d'antibiotiques en France d'ici fin 2016. Trois domaines d'intervention ont été mis en avant dans la lettre de mission :



Recommandations du groupe de travail au ministère en octobre 2015



Groupe antibiorésistance et environnement coordonnée par Antoine Andremont INSERM IAME, Gilles Pipien (ministère de l'environnement)

Décloisonner les actions visant à lutter contre l'antibiorésistance:

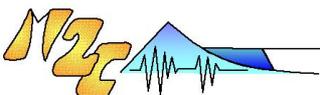
Favoriser la mise en place de sites ateliers coordonnés par un observatoire national de la résistance bactérienne:

- Normalisation des marqueurs permettant de mesurer le niveau d'antibiorésistance dans les différents réservoirs de vie en relation avec les diverses utilisation des antibiotiques
- Suivi à différentes échelles spatiale et temporelle , intégrant différents usages (vétérinaire, exploitation agricole , hôpital et ville) et environnement (sol eau)
- Prise en compte des biocides

➤ ***Une problématique qui relève des Zones Ateliers du CNRS (notes à Allenvi et Avisan)***

- Les Zones Ateliers (ZA) forment un vaste réseau inter-organismes de recherches interdisciplinaires sur l'environnement et les anthropo-écosystèmes en relation avec les questions sociétales d'intérêt national.
- Approche pluridisciplinaire sur le long terme (sciences de la nature, les sciences de la vie, les sciences humaines et les sciences de l'ingénieur) afin de répondre à une question territoriale spécifique pouvant être élaborée en interaction avec les gestionnaires.
- Parmi les 13 ZA, aux situations contrastées et complémentaires du point de vue des milieux et des systèmes sociaux

Problématique antibiorésistance : ZA Seine, ZA Bassin du Rhône



▪ **Hydrologie et Ecologie microbienne UMR CNRS 6143, (M2C), Rouen:**
Thierry Berthe, Nicolas Massei, Jean-Paul Dupont, Julien Deloffre, Robert Lafite, Fabienne Petit

▪ **Microbiologie and Epidemiologie INSERM UMR IAME, Université Paris Diderot, Faculté de médecine, site Xavier Bichat:**

Erick Denamur, Olivier Clermont

▪ **EA 4655 and CHU CAEN EA2125:**

Roland Leclercq, Vincent Cattoir

▪ **Chimie de l'environnement UMR CNRS 5255 LPTC- Université Bordeaux:** Hélène Budzinski



Doctorants: Kenny Oberlé UMR M2C/ LPTC, Marion Justine LPTC, Mehdy Ratajczak (UMR M2C), Laroche Emilie (UMR M2C), Touron Aurélie (UMR M2C), Angela Ribeiro (UMR M2C)

Groupe « antibiorésistance et environnement » : coordonné par Antoine Andremont et Gilles Pipien

ACAR Jacques (OIE) / **ANDREMONT Antoine** (Université Paris Diderot) / **DAGOT Christophe** (Université Limoges) / **HARTEMANN Philippe** (CHU Nancy) / **JARLIER Vincent** (APHP) / **LABANOWSKI Jérôme** (Université Poitiers) / **LEVI Yves** (Université Paris-Sud) / **MADEC Jean-Yves** (Anses) / **NAZARET Sylvie** (Université Lyon 1) / **PETIT Fabienne** (Université Rouen-Caen) / **PIPIEN Gilles** (Ministère de l'Ecologie, du développement durable et de l'Energie) / **PLOY Marie-Cécile** (CHU Limoges) / **RENAUD François (CNRS)** / **SIMONET Pascal** (Ecole Centrale de Lyon) / **SOUBELET Hélène** (Ministère de l'Ecologie, du développement durable et de l'Energie)

adebiotech Paris, 16-17 mars 2016

