



Journée Européenne
d'Information
sur les Antibiotiques



ANTIBIORÉSISTANCES ET ENVIRONNEMENT AQUATIQUE : QUELS RISQUES ?



Fabienne Petit

*Les travaux présentés impliquent tous les scientifiques de projets de recherche
multidisciplinaires coordonnés au laboratoire*

Les antibiotiques et des gènes de résistance aux antibiotiques présents bien avant l'Homme



➤ Microorganismes producteurs d'antibiotiques, et gènes de résistance, bien avant l'apparition de l'Homme (D'Costa et al., 2011; Bhullard et al., 2012)

➤ Des concentrations en antibiotiques *in situ*, pour lesquelles l'effet bactéricide ou bactériostatique, emblématique de ces molécules, n'est pas observé (Aminov, 2009 ; Allen, 2010).

➤ Le sol : réservoir actuel de microorganismes producteurs et gènes de résistance inconnus (Nesme & Simonet, 2015)

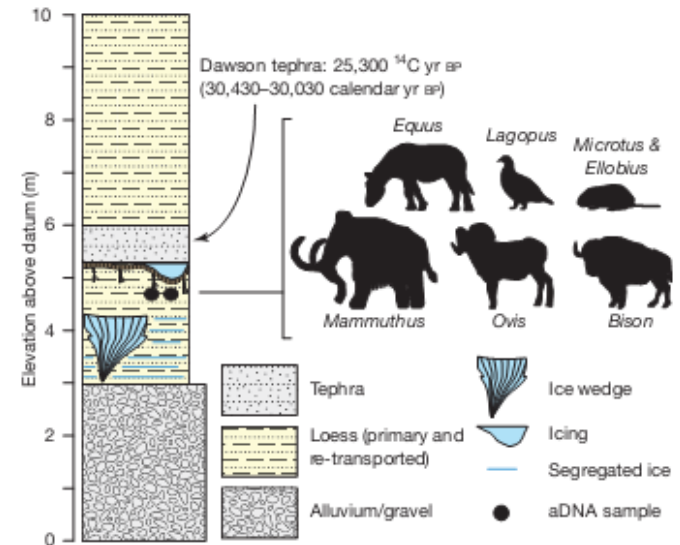
➤ Rôle? : communication inter cellulaire (Gillings, 2013)

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}

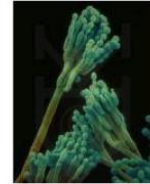


Carottes glaciaires datant du Pleistocène (30 000 ans) . D'Costa et al., 2011

La fin de l'ère des antibiotiques ?

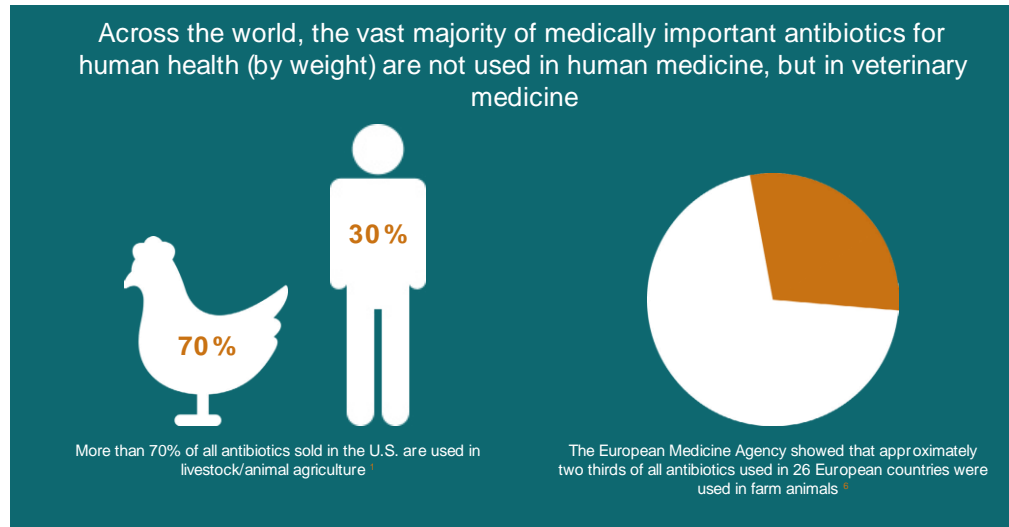


Découverte des antibiotiques (1929) avancées majeures en médecine



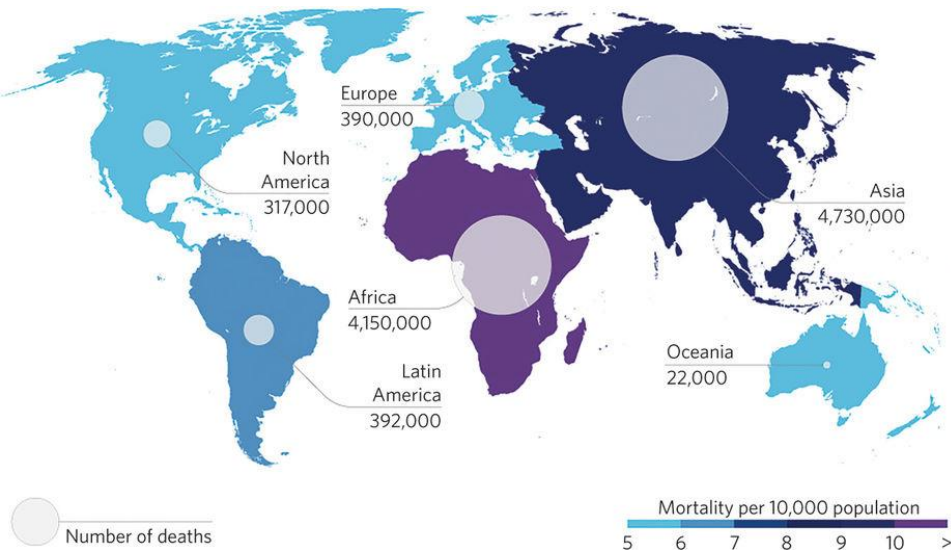
Penicillium chrysogenum

- 2001: L'antibiorésistance bactérienne est un problème de santé mondiale (OMS)
- 2014 (et 2016): Progression constante avec des prévisions pessimistes (OMS)



HCWH Europe, 2017

Mortalité imputable aux bactéries antibiorésistantes (projection 2050)



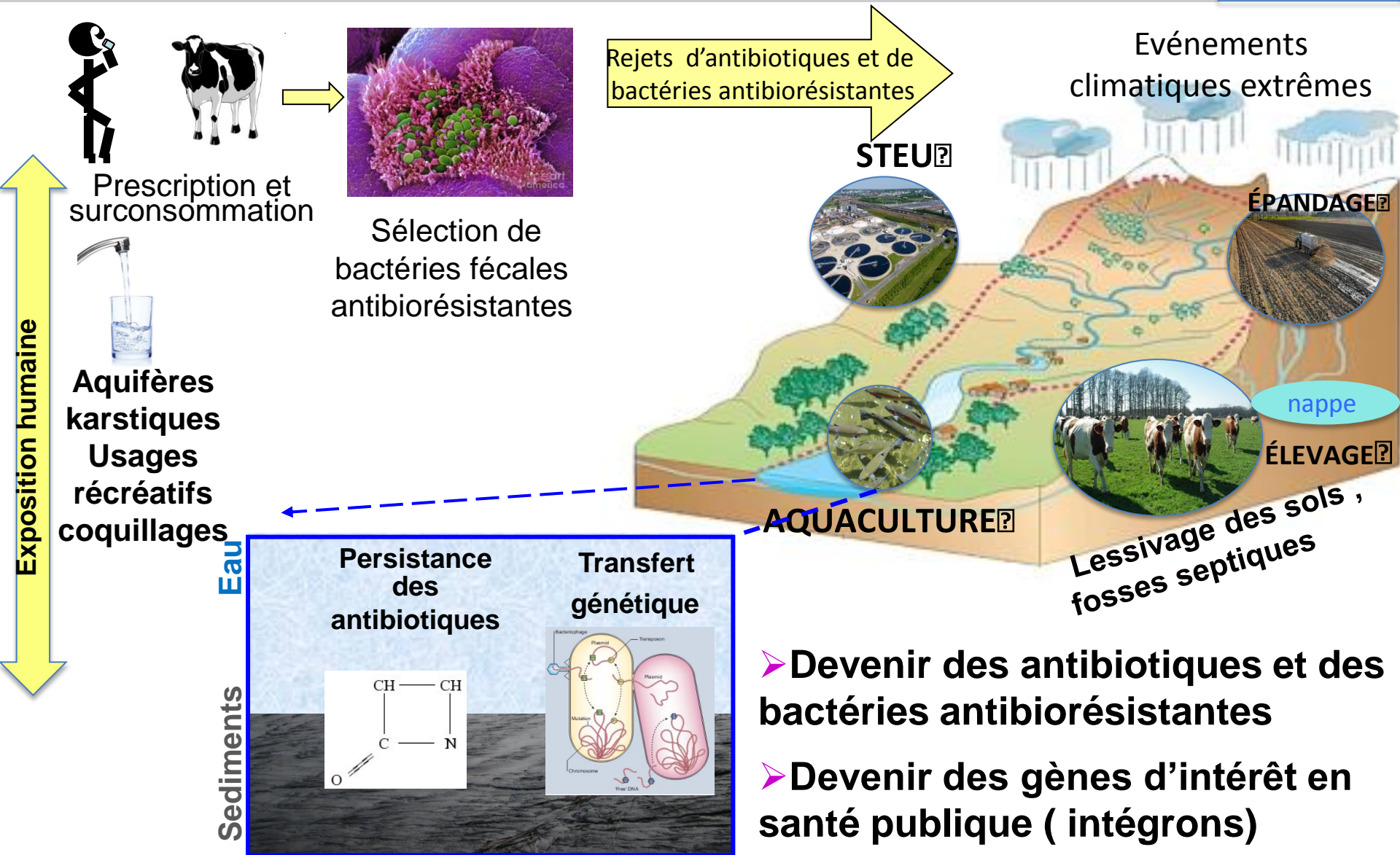
Sugden et al, Nature Microbiology 2016

- Impasse thérapeutique
- Décès 12 500 personnes par an en France (Colomb-Cotinat M, 2012)
- Quel est le rôle de l'environnement (OMS 2014, 2016) ?

➔ En France, rapport Carlet 2015 aboutit à feuille de route du ministère :

- projets d'observatoires « Santé Environnement » repris dans la prospective SIC CNRS ,
- 2018 : revue systématique , Groupe de réflexion national piloté par l'INSERM (AVISAN), JPIAMR
- 2019: CSF Santé – Antibiorésistance, 2020 ANR dédié
- Autosaisine (2018) et Recommandations ANSES 2020

L'eau réceptacle et/ou vecteur de l'antibiorésistance ?



- Devenir des antibiotiques et des bactéries antibiotiques
- Devenir des gènes d'intérêt en santé publique (intégrons)

L'environnement favorable à la dissémination de l'antibiorésistance ?



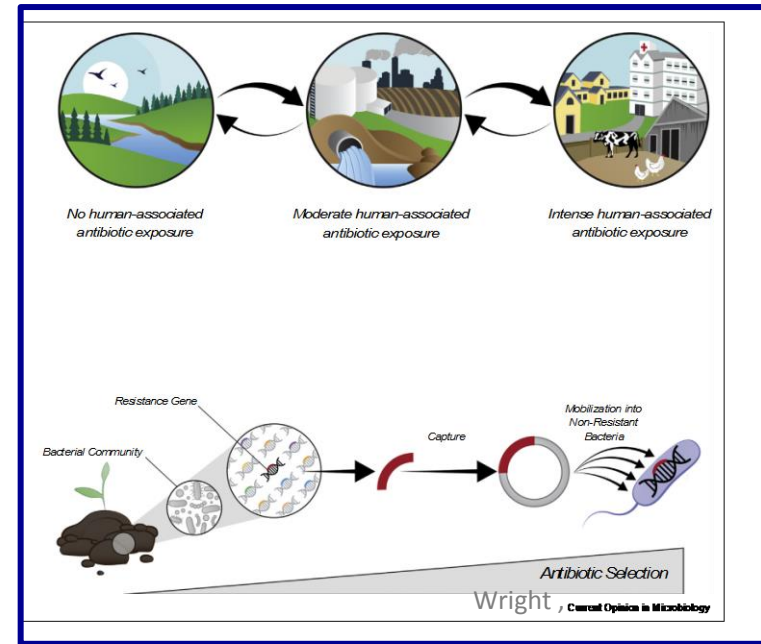
Transfert des gènes de résistance aux antibiotiques sein des populations bactériennes

Des environnements favorables (Hot Spot)

- Transfert de Plasmides Et/ou
- Transfert et Transposition d'éléments génétiques mobiles capable de s'insérer dans le génome (évènements rares mais dont la fréquence augmente en réponse au stress environnementaux)

Évènements rares dont la fréquence varie de 10^{-4} à 10^{-11}

Furuya Nature 2004



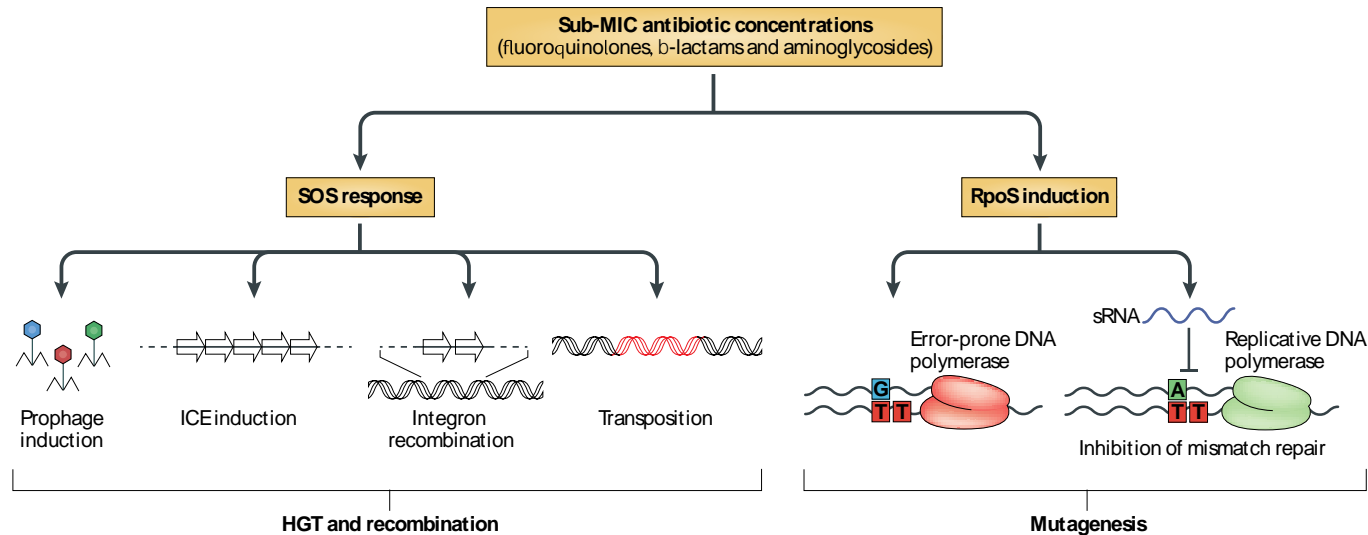
Facteurs favorables :

- présence d'éléments antimicrobiens (métaux , biocides, pesticides) Van Alen et al, 2018
- les concentrations subinhibitrices de certains antibiotiques (Quinolones) Andersson & Hughes Nature Reviews Microbiology, 2014

L'environnement favorable à la dissémination de l'antibiorésistance ?



Rôle des antibiotiques : Les fluoroquinolones, les β -lactamines et les aminoglycosides, à des concentrations sub-inhibitrices (sub-MIC) induisent la réponse SOS et l'activation de RpoS.



➤ Transposition favorisée,

➤ Augmentation du taux de mutations pendant la réplication

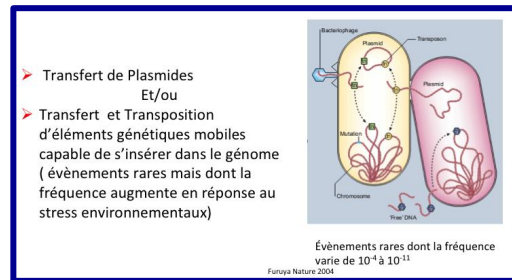
L'environnement favorable à la dissémination de l'antibiorésistance ?



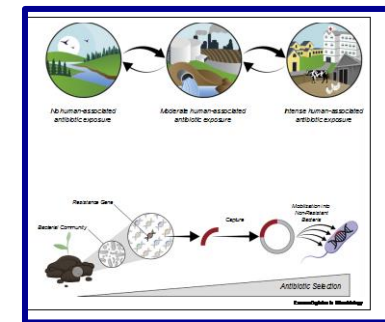
Rôle des « co-sélecteurs » : métaux biocides, pesticides

(Berendonck 2012, Wales et David 2015)

Transfert des gènes de résistance



Environnements favorables



Extrapolation d'expérimentations en laboratoire?

- Observation de co occurrence (Henriques et al, 2016, Dickinson et al 2019, Ji et al, 2012, Devarajan 2015) et relation de causalité
- Pal et al (2017), approche métagénomique: les co- transferts auraient principalement lieu chez l'Homme? , poursuivre l'étude dans l'environnement

Quels marqueurs de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement?



Un marqueur commun à tous les compartiments *Escherichia coli*

➤ Le concept : « One Health »

The One Health Triad

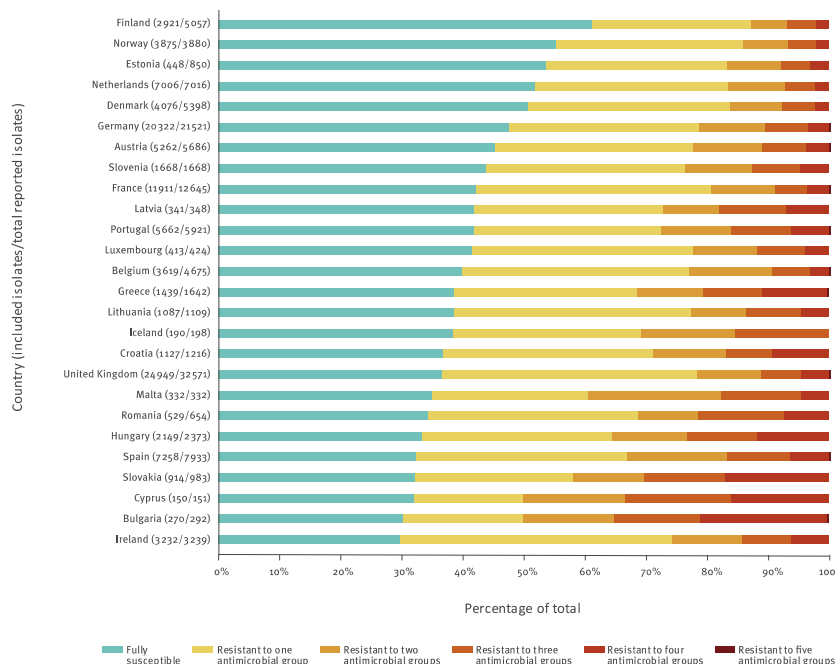


➤ *E. coli* résistant au céphalosporine de 3^{ème} génération retenue comme espèces à suivre prioritairement (OMS,2017, recommandations ANSES 2020)



Escherichia coli
Gram négatif
γ-proteobacteria

Figure 3.1. *Escherichia coli*. Distribution of isolates: fully susceptible and resistant to one, two, three, four and five antimicrobial groups (among isolates tested against aminopenicillins, fluoroquinolones, third-generation cephalosporins, aminoglycosides and carbapenems), EU/EEA countries, 2018



Data are only displayed for countries providing this information for 50% or more of the isolates.

* Only data from isolates tested against all included antimicrobial groups (aminopenicillins, fluoroquinolones, third-generation cephalosporins, aminoglycosides and carbapenems) were included in the analysis.

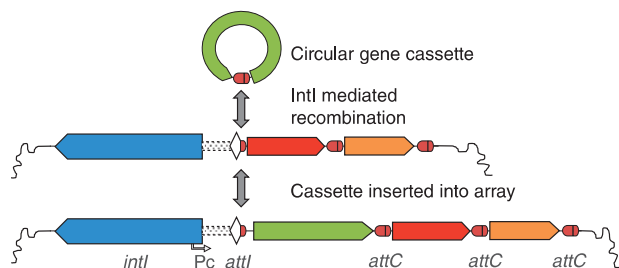


2018

Quels marqueurs de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement?



➤ Les intégrons cliniques: supports génétiques impliqués dans la multirésistance de souches d'intérêt clinique



➤ Contaminants xénogénétiques, marqueurs de la dissémination de l'antibiorésistance (Gillings 2015)

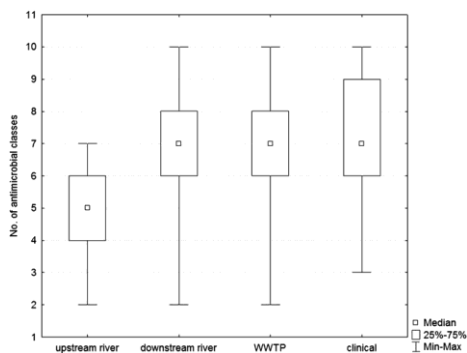
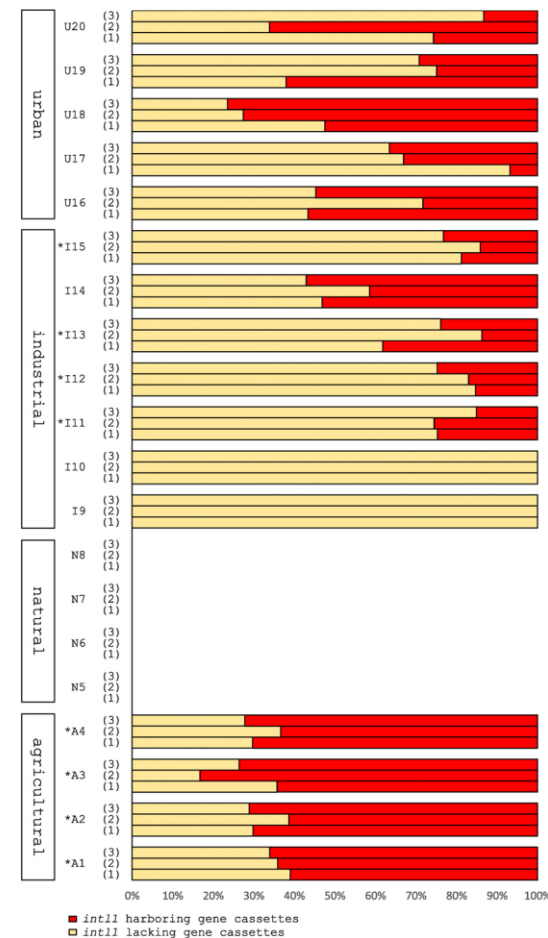


Fig. 1. Box-whisker plot of antimicrobial resistance ranges (the number of antimicrobial classes to which isolates were resistant) of integron-harboring *E. coli* isolates from clinical specimens, wastewater treatment plant (WWTP) and its corresponding river downstream and upstream the WWTP outlet.



➤ **Recommandation ANSES 2020 : Intégron clinique *IntI 1* et *suI1***

Borruso et al, 2016

Quel est le risque majeur pour la santé publique, lié à l'environnement?



→ Transfert de gènes des microorganismes de l'environnement à des souches pathogènes:

- la β -lactamase à spectre étendu (BLSE) de type CTX-M (gène de *Kluyvera*) Poirel et al, 2002
- la résistance aux quinolones (gène *qnrA* de *Shewanella*) , Poirel et al, 2005

→ Transfert de gènes d'origine clinique à des bactéries de l'environnement, pathogènes opportunistes pour l'Homme (ex: *Pseudomonas*,)

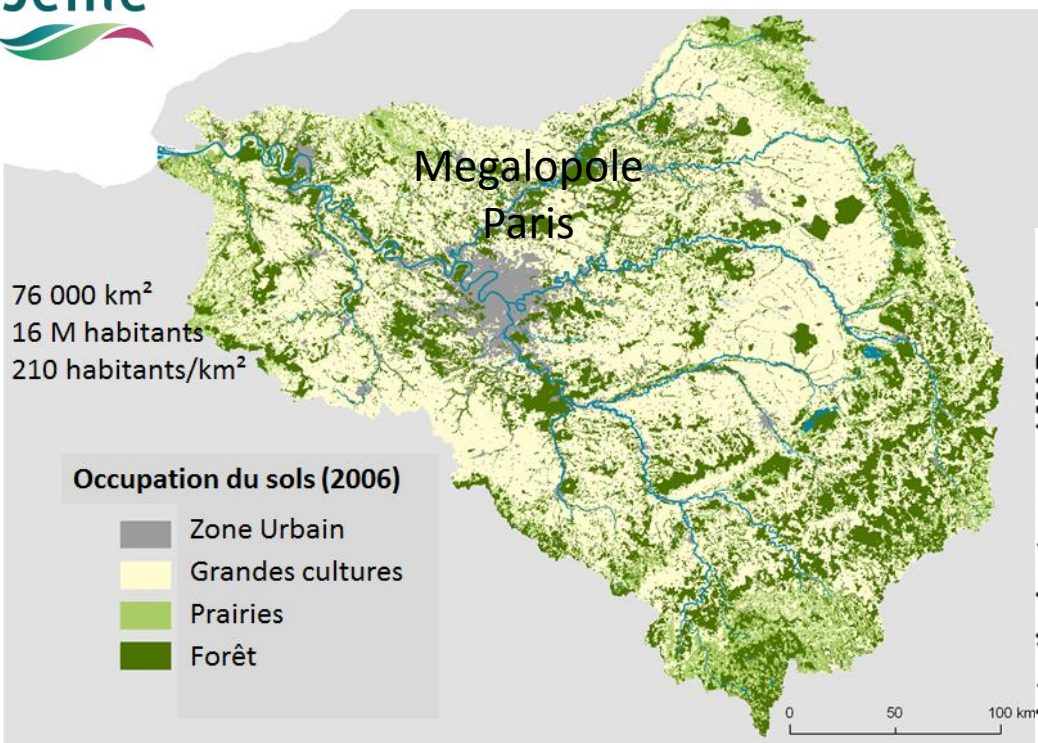


Attention aux raccourcis médiatiques

facteurs favorables : la multi exposition chronique à des concentrations subinhibitrices en antibiotiques et aux contaminants chimiques

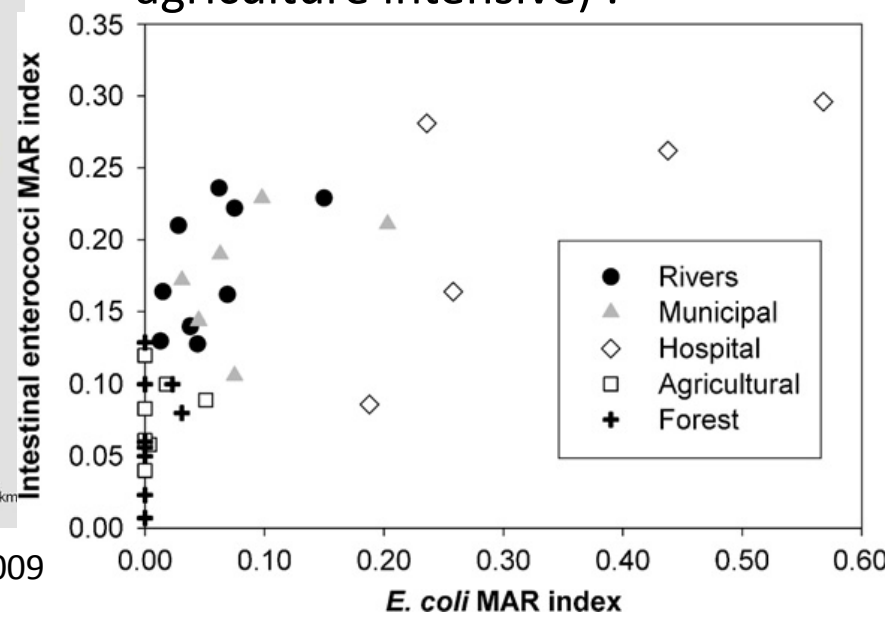
Risque difficile à évaluer, car il s'agit d'évènements rares, à une échelle de temps difficile à déterminer: identifier les sites « hot spots » et périodes favorables

L'abondance en bactéries antibiorésistantes reflète le niveau d'anthropisation du bassin versant



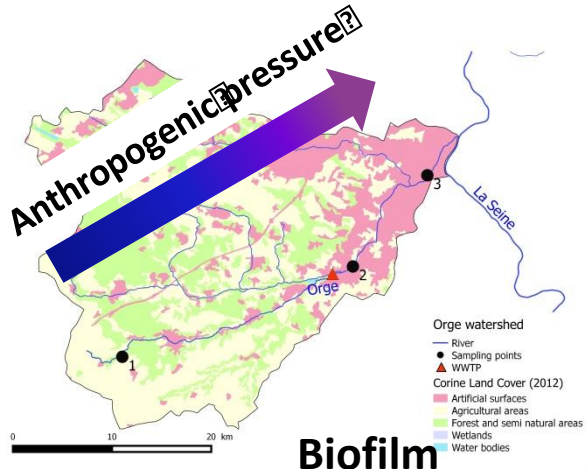
Servais et Passerat, 2009

Le bassin versant de la Seine (75,000 km²) est fortement anthropisé (densité humaine, activité industrielle, et agriculture intensive).



➤ Les principales sources de contamination par ordre d'importance : rejets hospitaliers, STEUs (71%) > STEUs municipales (44%) > rejets diffus d'origine agricoles (16%) > rejets diffus zones forestières (2%). (% *E.coli*) en accord avec Zhu et al (Nature microbiology, 2017)

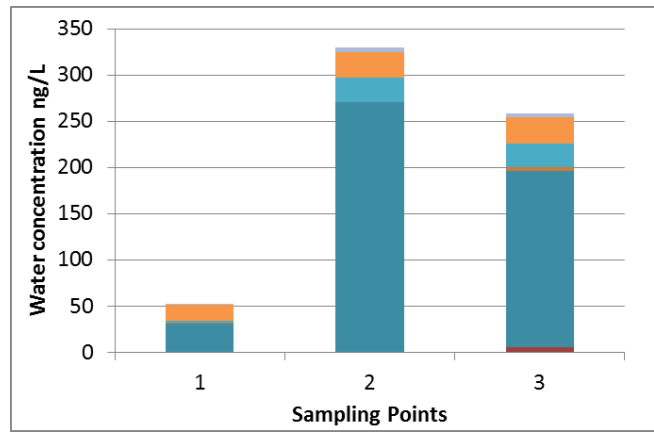
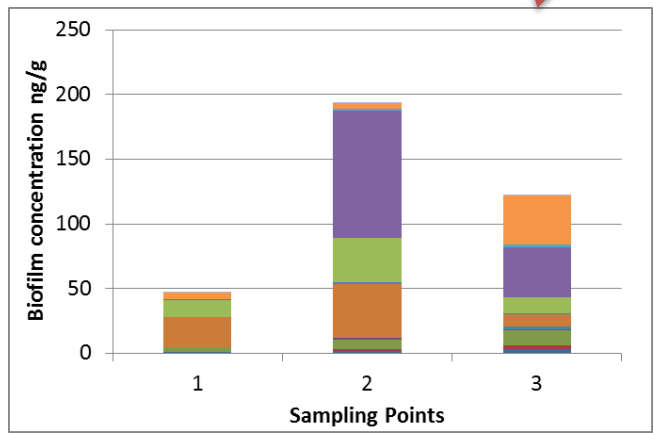
Vulnérabilité des rivières à la contamination par des antibiotiques (Orge)



- | | |
|--------------------|-----------------|
| ■ Trimetoprim | ■ Tetracycline |
| ■ Sulfamethoxazole | ■ Ofloxacin |
| ■ Norfloxacin | ■ Enrofloxacin |
| ■ Enoxacin | ■ Ciprofloxacin |
| ■ Amoxicilline H2O | ■ Flumequin |
| ■ Erythromycine | ■ Ac oxolinique |

Biofilm

Eau



- Eau : Amoxicilline, Sulfamethoxazole and Tetracycline
- biofilms: occurrence of fluoroquinolones and tetracycline
- Augmentation à l'aval des rejets de la STEU

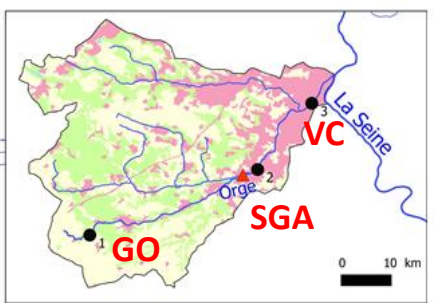


UMR METIS EPHE

Vulnérabilité des rivières à la contamination par des *E. coli* antibiorésistantes (Orge)



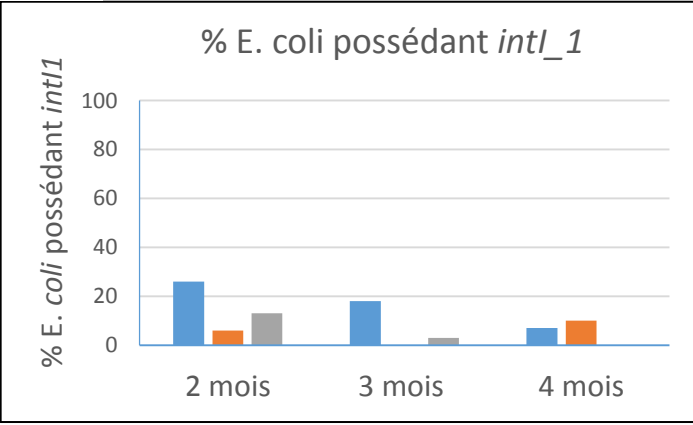
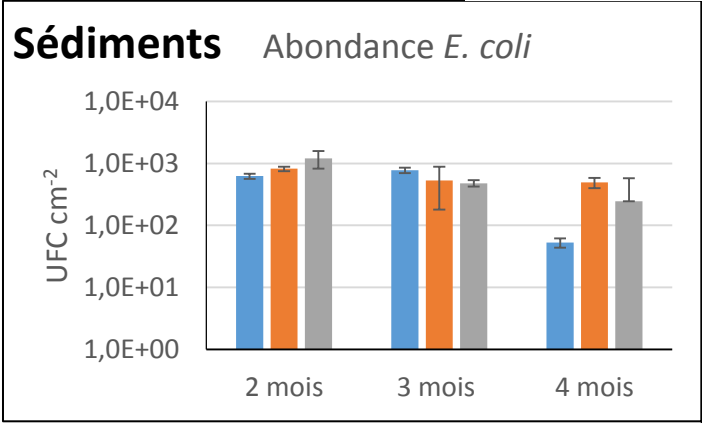
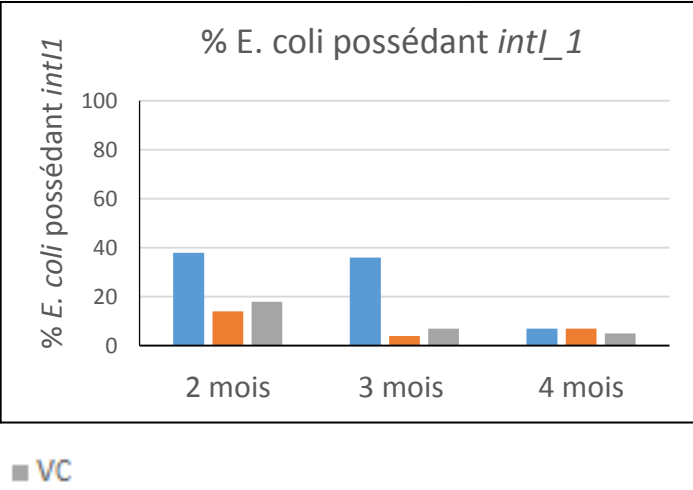
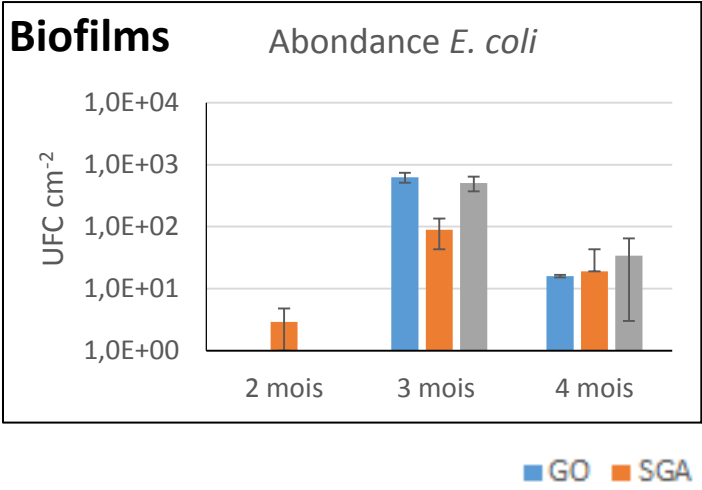
Bassin versant de l'Orge



GO: Gué d'Orge
 SGA: Saint-Germain-lès-Arpajon
 VC: Viry-Châtillon

Bassin de l'Orge

- Points de prélèvement
- ▲ station d'épuration
- Rivières
- Occupation du sol
 - Territoires artificialisés
 - Territoires agricoles
 - Forêts et milieux semi-naturels



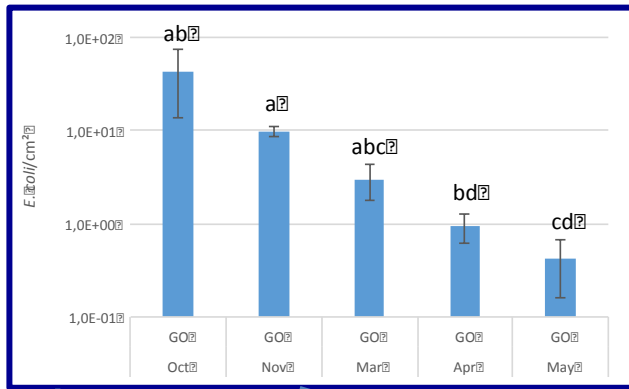
- Les biofilms et sédiments sont des zones de piégeage d'*E. coli* porteur d'intégrons cliniques de classe 1
- Sur les sites aval les plus urbanisés : 7 et 18 % de souches portent des intégrons cliniques de classe 1

Résilience des rivières à la contamination par des *E. coli* antibiorésistantes ?

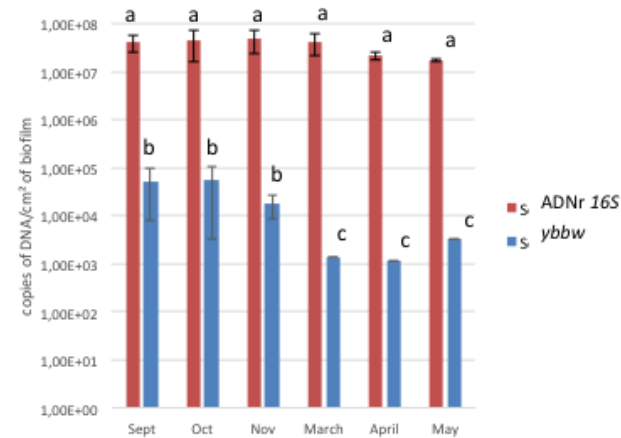


Impact d'une contamination accidentelle consécutive à un événement pluvieux extrême (site amont)

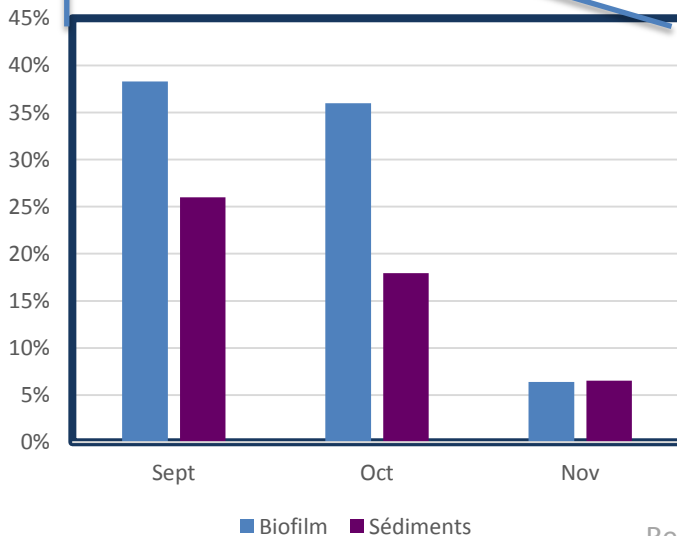
E. coli cultivables



E. coli qPCR (viables et mortes_ADN)



E. coli cultivables portant un intégron *int1*



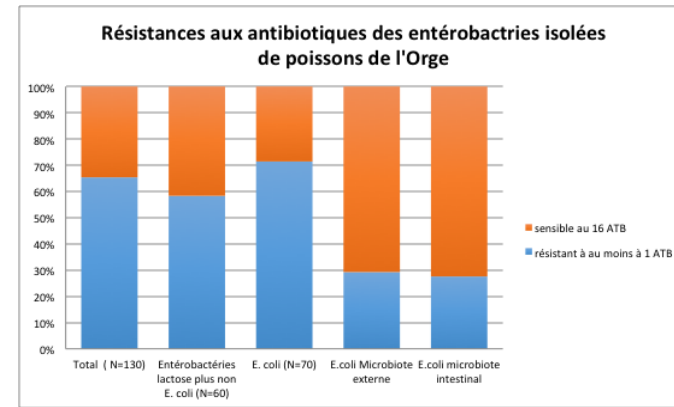
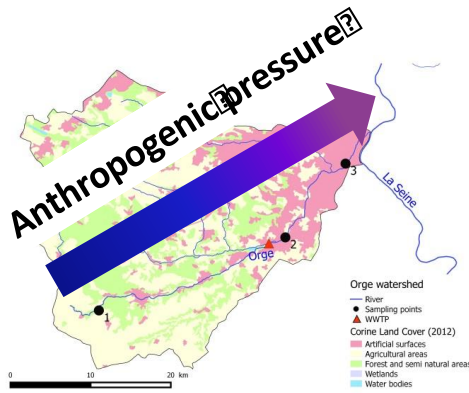
- Diminution du nombre d'*E. coli* cultivables dont les souches portant les intégrons (résilience)
- les *E. coli* sous forme viable non cultivable, ou leur ADN, ne persistent pas

A.L Vivant in prep

Les poissons sauvages vecteurs de l'antibiorésistance ?



- Bollache et al, 2019: les poissons à proximité des STEUs peuvent être vecteurs de *E.coli* BLSE



89 poissons, 8 espèces sur les sites 1,2, 3

Projet lauréat ICAR MITI -80



- Aucun antibiotique détecté dans le poisson sauvage (muscle)
- Pas de variation spatiale
- 71,4% *E.coli* résistant à au moins 1 antibiotique
- Aucune souche multi-résistante
- Aucune souche portant un intégron clinique de classe 1 (0/130)

Prescriptions et contamination en antibiotiques des effluents hospitaliers



Maison de retraite



180 résidents
10 ans en moyenne

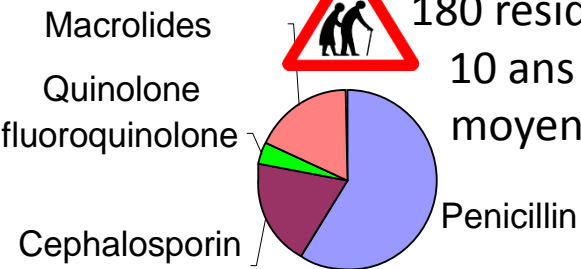
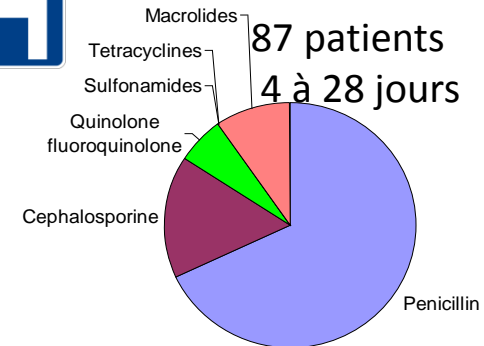


Centre médical



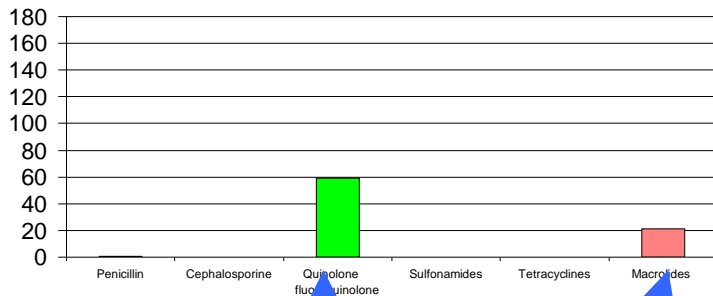
Hôpital

87 patients
4 à 28 jours



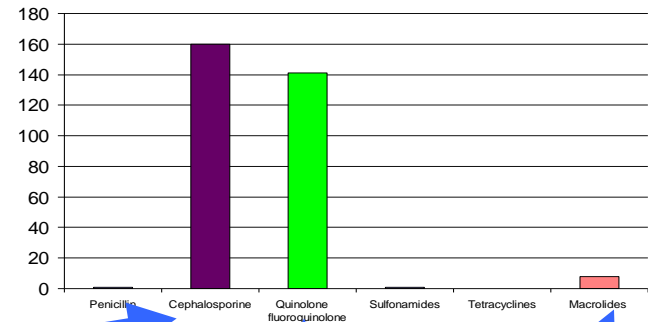
➤ Pénicilline majoritairement prescrite

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



Quinolone

Macrolides



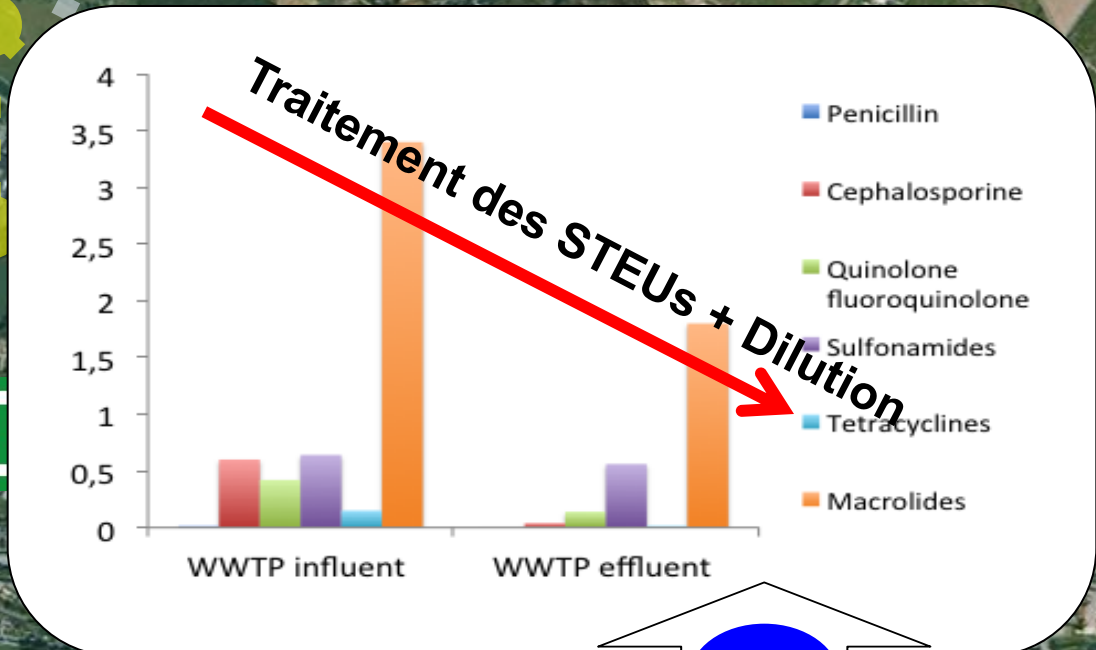
Céphalosporine

Quinolone

Macrolides

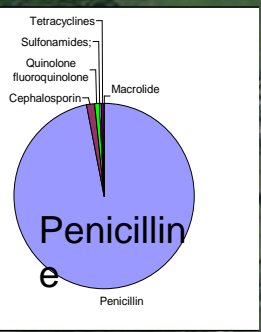
➤ Dans les effluents hospitaliers, les antibiotiques les plus persistants sont détectés : quinolones, céphalosporines, macrolides Oberlé et al, 2012

Devenir des antibiotiques continuum centre de soins -station d'épuration - rivière



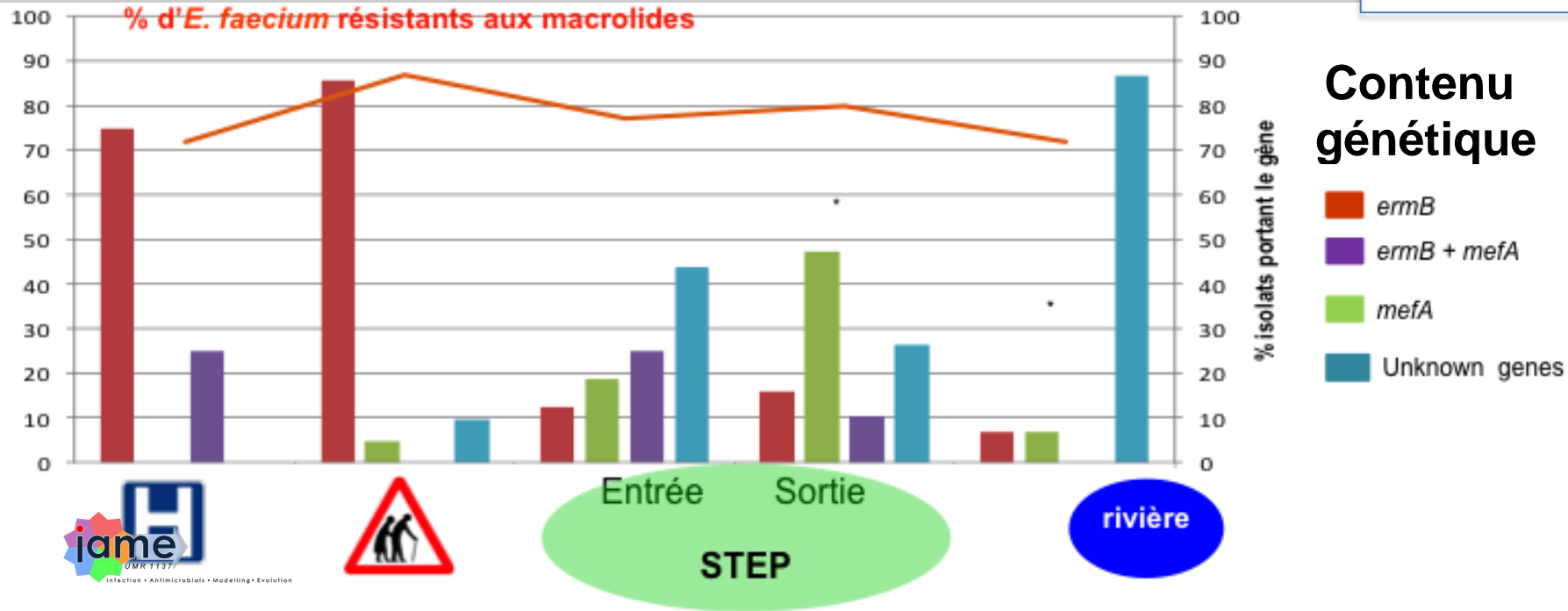
river

Quinolones: 1 ng. L⁻¹
Sulfonamides: 5 ng. L⁻¹
Macrolides: 1 ng. L⁻¹



- Diminution des concentrations le long du continuum (µg.L-1 à ng.L-1)
- Les antibiotiques les plus stables persistent dans l'environnement

Devenir des souches *Enterocoques* antibiorésistants continuum centre de soins - station d'épuration - rivière

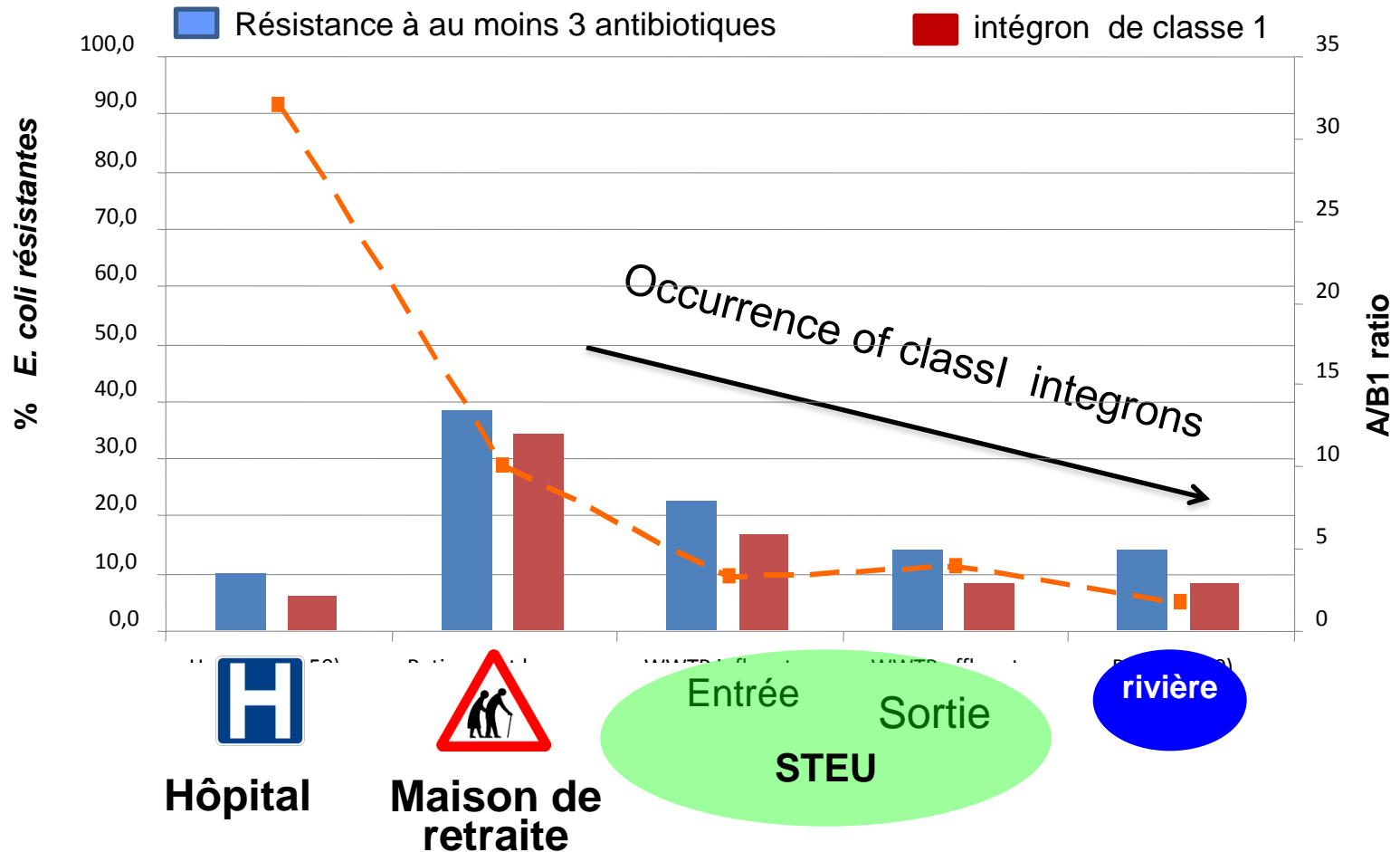


- Le long du continuum hospitalier: proportion constante en *Enterococcus faecium* résistants aux macrolides
 - A l'hôpital: pourcentage élevé d'*Enterococcus faecium* résistants aux macrolides contenant le gène *erm(B)* et du complexe clonal CC17
 - Dans la STEP et la rivière: des gènes différents sont responsables de la résistance aux macrolides
- Leclercq et al, 2013

Devenir des souches *E.coli* antibiorésistantes continuum centre de soins -station d'épuration - rivière



Quel devenir des *E.coli* résistantes aux antibiotiques ?



- Diminution du nombre d'isolats d'*E. coli* antibiorésistantes, avec un intégron de classe 1

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



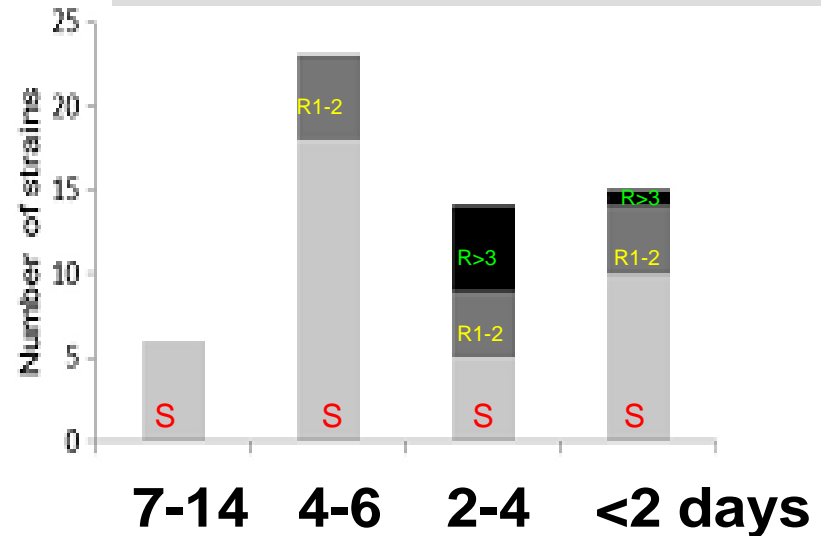
Quel devenir des *E. coli* résistantes aux antibiotiques ?



14 jours
10° C

Microcosme eau (88 isolats d'eau)

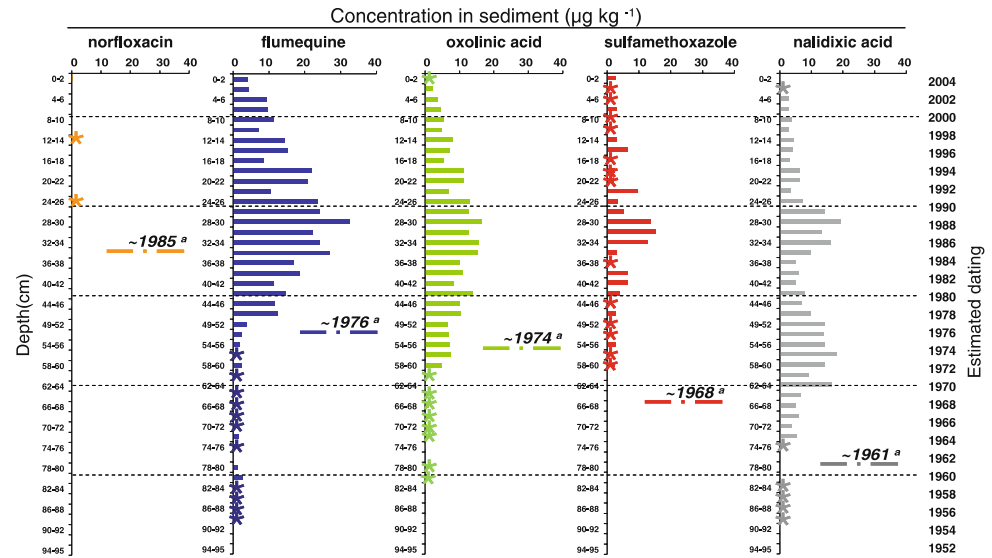
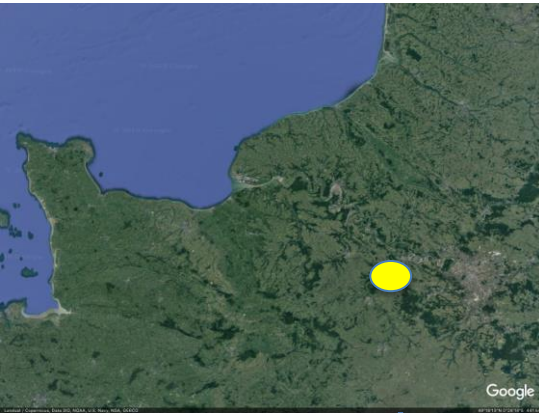
R 3 Résistant to at least 3 antibiotics
R 1-2 Résistant to 1 or 2 antibiotics
S Susceptible to the 17 antibiotics tested



- 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

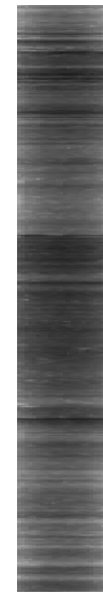
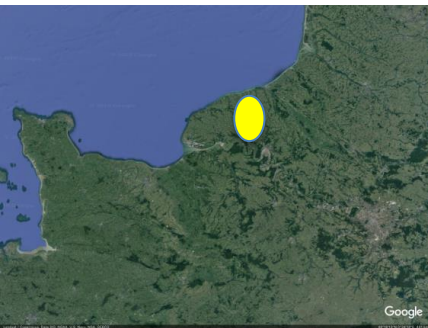
Persistence des antibiotiques dans des archives sédimentaires



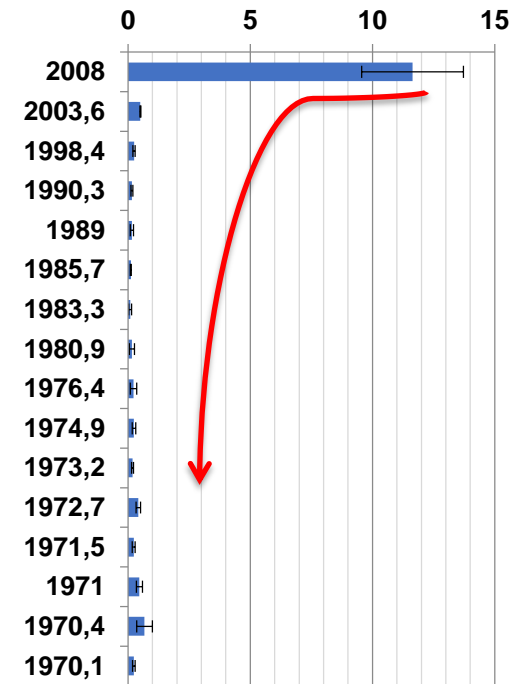
^a Approximative commercialization dates (Arboit et al. 1997; Bergogne-Bérézin and Dellamonica 1999).

- Sulfamethoxazole, et les quinolones (flumequine, acide oxolinic et l'acide nalidixique) persistent dans des carottes sédimentaires avec des maxima à 30 cm de profondeur (1985–1990).

Occurrence d'intégrons clinique dans des archives sédimentaires (40 ans)



Relative abundance of *Int1* (% *int1*)

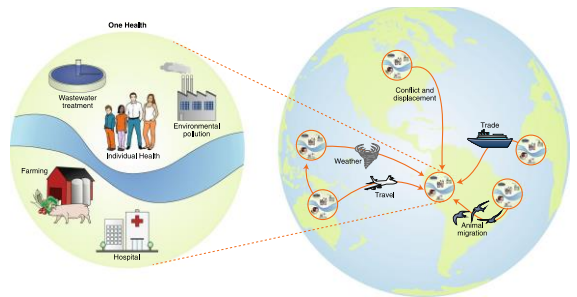


Zone de dépôt non perturbée depuis 1960
 Dans une zone urbanisées à proximité d'un rejet de STEU

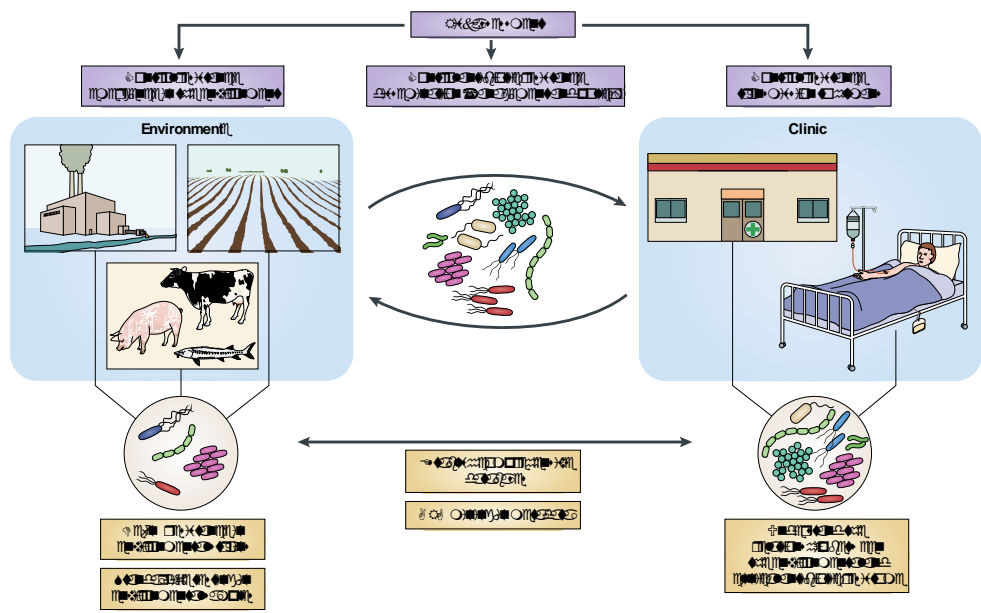
Kaci et al, 2012, 2014
 Thiebault et al a soumettre, 2020

- En Estuaire de Seine les vasières sont des zones de dépôts où les bactéries fécales perdent leur cultivabilité (Berthe et al,2008)
- L'abondance relative en intégron clinique de classe 1 (Int1) diminue de 2 ordres de magnitude dans les sédiments âgés de 4 ans (Projet DYNAPAT)

Solutions ? : une démarche pour la maitrise de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'eau



Hernando-Amado et al Nature microbiology



Berendonk et al, nature review 2015

- L'Identification des points de contrôle critiques : sources (hot spot STEU, épandage, aquaculture)
- l'élaboration de procédures de surveillance: avec des marqueurs et des procédures communes
- Procédés technologiques pour limiter la contamination de l'environnement par des bactéries résistantes (et les gènes) et les antibiotiques au niveau des sources principales
- Une approche One health
- Impact des évènements extrêmes

Solution : Un réseau national d'observatoires santé /environnement dédiés à l'antibiorésistance?



Défis : Evaluer les conditions limites de résilience du milieu
Impact des événements extrêmes (hot moment / hot spots)

Approche globale : associant les institutionnels, les prescripteurs médicaux et vétérinaires, les industries pharmaceutiques, les gestionnaires et les associations

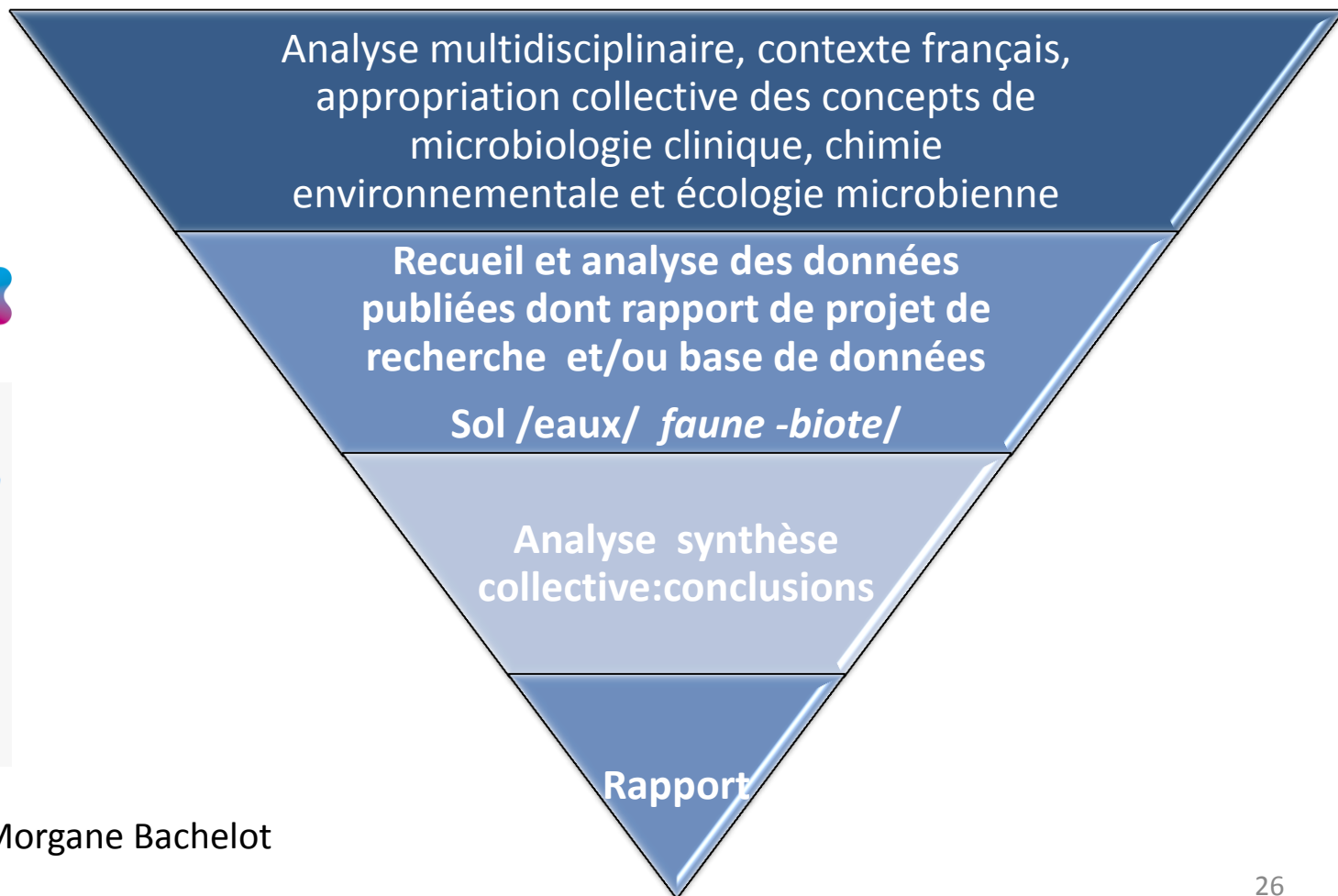
Des observatoires Environnement / Santé répartis sur le territoire:
Feuille de route du ministère /Prospective CNRS SIC

- Adossés aux services nationaux d'observation (SNO) ou des Zones ateliers du CNRS, (site Sipibel Hôpital)
- suivis spatio - temporels des marqueurs de l'antibiorésistance, en parallèle au suivi des paramètres abiotiques à l'échelle des bassins versants,
 - modélisation, scénarii prospectifs à différentes échelles de temps et d'espace,
 - sites ateliers pérennes, emblématiques des différents usages (vétérinaire, exploitations animales, hôpital, ville).

Antibiorésistance et environnement : état des lieux en France (autosaisine de l'ANSES)



« Antibiorésistance et environnement - État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques »



Pdt Didier Hocquet
Coordination ANSES Morgane Bachelot

Antibiorésistance et environnement : état des lieux en France (autosaisine de l'ANSES)



Surveillance :

- Réseau national pérenne de suivi spatio temporel d' **indicateurs commun**
- Bancarisation des données
- Explorer environnements non renseignés?

Analyse multidisciplinaire, en contexte français, appropriation collective des concepts de microbiologie clinique, chimie environnementale et écologie microbienne

Recueil et analyse des données publiées et apportées par le projet de recherche et/ou base de données

Sol / eaux / faune / biote / ...

Analyse / synthèse collective : conclusions

Rapport

Recommandations 2020

Besoins en recherche :

- Rôle des Bactéries ubiquistes ?
- Transfert de gènes, rôle des Atbs et co-sélecteurs : (Approche laboratoire/mésocosme/ Environnement)
- Présence et Expression des gènes de résistance *GRA in situ* (métatranscriptomique)

Anticiper:

- Impact du changement climatique et nouvelles pratiques (reuse , recharge de nappe..)
- Développement d'outil de **modélisation**



Un réseau interdisciplinaire de recherche

Les microbiologistes M2C , chimistes, écotoxicologues, hydrologues -UMR METIS

Long Term Ecosystem Research in Europe



OAK Project Karst
Pandore : Urban river



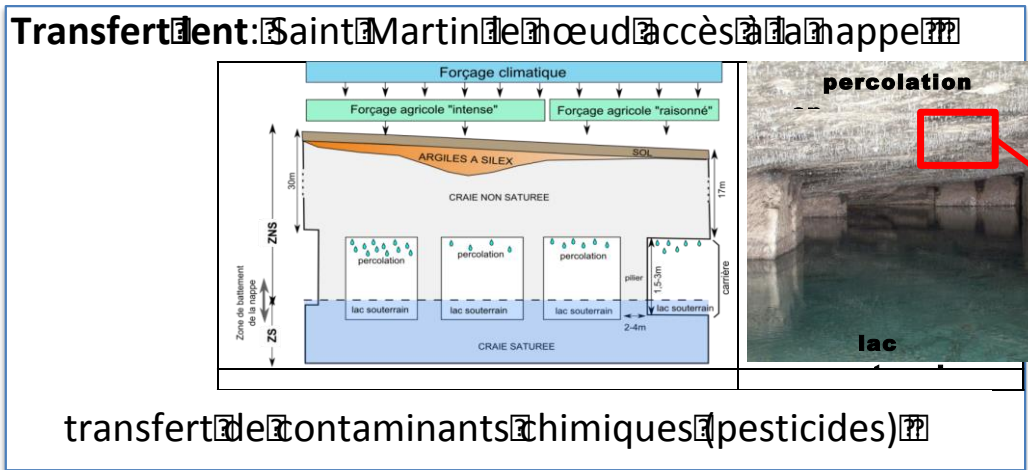
FLASH project
DYNAPAT Project
RHAPSODIS Project



Observatoire de l'antibiorésistance du SO Karst

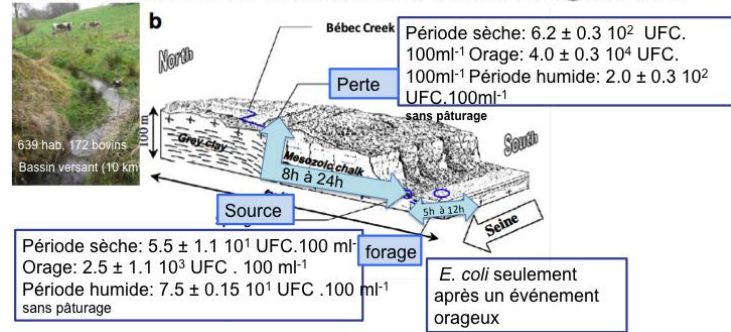


Antibiotiques et marqueur de l'antibiorésistance bactérienne (intégrons, *E.coli* ATBr) dans les sédiments et les biofilms de l'eau souterraine

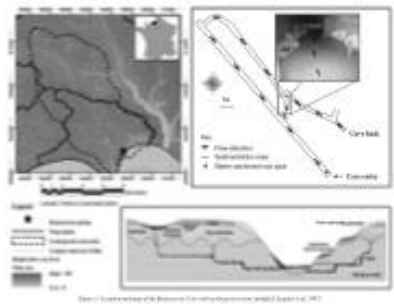


Transfert Rapide: 2 sites de typologie contrastée

Norville : Petit bassin versant agricole



Radicatel alimentation de la Ville du Havre,



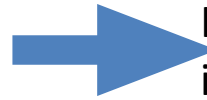
300 points d'engouffrements,
 4 sources
 8 forages



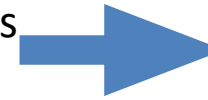
La surveillance de l'antibiorésistance : des données pour une action nationale: un défi à relever

Fabienne Petit M2C CNRS Université Rouen

Produire les données



Intégration dans des bases identifiées



Mise à disposition portail commun

- Des données qualifiées/validées
 - protocoles, échantillonnage, mesures...
- Des paramètres communs
- Données issues de la surveillance réglementaire
- Données issues de projet de recherche

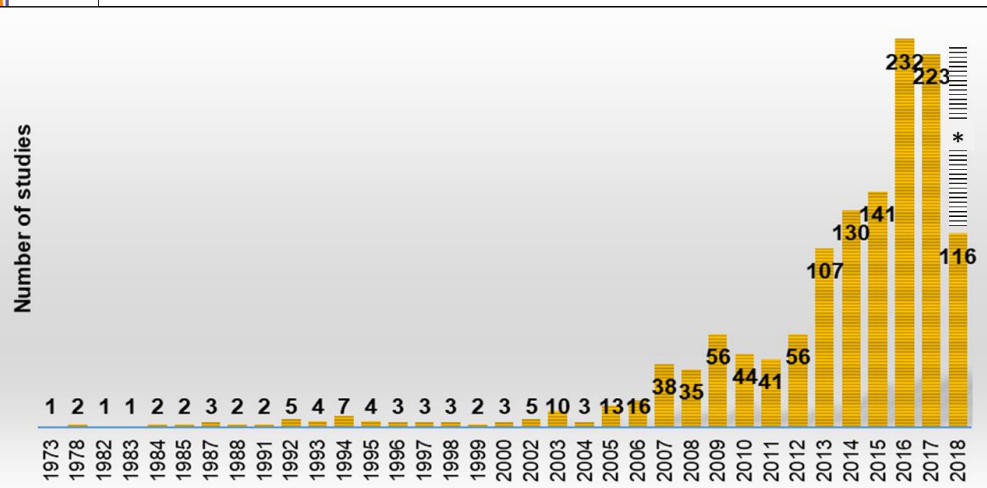
- Naiades, Agences de l'eau, ADES, Sise-eaux...
- Bases de données environnementales inter-organismes de recherche en charge de l'Observation
- Bancarisation des données (qualifiées et harmonisées) issues de la recherche?

- Inter opérable: un format commun
- Accessibilité
- Facilité d'extraction pour l'exploitation
- Ouverture des données à l'échelle européenne
« Science ouverte »

Démarche complexe déjà entamée au niveau national et européen par plusieurs organismes

Strategies to Control the Dissemination of Antibiotic Resistance in the Environment: A systematic Review

Systematic Review: Anais Goulas et al 2019, Goulas et al, 2020



Beyond the contribution of the case studies, our articles contribute to the development in scientific knowledge ?

Only 931 usable articles after the screening of 17,798 articles from eight databases

- A lower confidence level was attributed to 64% of the studies due to poor sampling strategy resulting in performance and detection biases.
- Knowledge gaps for research: , ATBR indicators, spatio temporal behaviour in the environment