



Suivi de l'émergence de résistances aux antibiotiques associées à l'emploi de streptomycine pour lutter contre le feu bactérien

Résumé

1 Introduction

En janvier 2008, l'Office fédéral de l'agriculture (OFAG) a autorisé l'utilisation contrôlée de streptomycine pour lutter contre le feu bactérien, pour autant que soit réalisé un suivi de l'émergence de résistances aux antibiotiques sur les parcelles traitées. La station de recherches Agroscope Changins-Wädenswil (ACW) a lancé un programme de suivi centré sur la flore microbiologique cultivable du sol et des plantes, en particulier sur *Erwinia amylovora*, l'agent du feu bactérien. Le 18 décembre 2008, l'OFAG a renouvelé l'autorisation pour 2009, en maintenant l'exigence du programme de suivi. L'autorisation est depuis renouvelée chaque année jusqu'à ce qu'une alternative efficace soit trouvée.

La Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique (CFSB) a fait état de la nécessité d'un programme de suivi pluridisciplinaire, couvrant non seulement les aspects liés au sol et aux plantes, mais s'intéressant également au développement de résistances, simples et multiples, aux antibiotiques. La CFSB a donc lancé un projet interdisciplinaire, en collaboration avec plusieurs offices fédéraux, des institutions de recherche et d'autres experts¹. Vu les avancées récentes en génomique et en métagénomique, le comité d'experts a proposé d'élaborer un projet sur trois ans, divisé en plusieurs modules. L'objectif premier consistait à utiliser les méthodes scientifiques les plus récentes pour arriver à évaluer objectivement les risques réels de l'utilisation de la streptomycine pour lutter contre le feu bactérien et non à chercher des arguments contre ce traitement.

Le programme a été financé par plusieurs offices fédéraux et d'autres organisations².

¹ Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique (CFSB), Office fédéral de l'environnement (OFEV), Office fédéral de l'agriculture (OFAG), Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil (ACW), Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Office vétérinaire fédéral (BVET), Secrétariat d'Etat à l'économie (SECO).

² Les institutions suivantes ont soutenu financièrement le programme: CFSB, OFAG, OFEN, BVET, ACW, AWEL (Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft - Canton de Zurich). En outre, l'ACW et l'IVB (Institut de bactériologie vétérinaire de l'Université de Berne) ont mis à disposition leurs laboratoires, fourni de l'équipement et du personnel, et couvert des frais généraux.

Le programme a été coordonné par Jean-Claude Piffaretti, Interlifescience, Massagno.

2 Modules expérimentaux et résultats

2.1 Module A: Evaluation de l'impact de l'application de streptomycine sur les bactéries du sol et des plantes et sur les gènes de résistance

Ce module a été réalisé par le Centre de compétence feu bactérien de l'ACW. Une partie de la recherche a été conduite sous l'égide de COST (European Cooperation in Science and Technology). Les expériences principales et leurs résultats sont synthétisés ci-dessous.

2.1.1 Développement des outils moléculaires nécessaires pour détecter les gènes de résistance dans l'environnement

Le suivi quantitatif des gènes de résistance dans l'environnement, dans les microorganismes cultivables et non cultivables, a nécessité l'optimisation et la validation de méthodes d'extraction de l'ADN de différentes matrices (plantes et sols), et de méthodes de détection et de quantification de ces séquences. Les gènes de résistances suivants ont été étudiés: *aph3 (strA)*, *aph6 (strB)* et *aadA* pour la streptomycine, et *tetB*, *tetM* et *tetW* pour la tétracycline. Les données obtenues ont été normalisées sur la base des séquences codant pour l'ARN ribosomique (RNS 16S).

2.1.2 Efficacité de la streptomycine pour lutter contre le feu bactérien

Une analyse comparative a été réalisée dans deux vergers. Dans le premier (Neukirch, TG), en absence de traitement à la streptomycine, 67 % des arbres et 17 % des inflorescences ont été testés positifs à *E. amylovora*. Après trois traitements antibiotiques, les taux d'infection sont redescendus à respectivement 20 % et 1 %. Les résultats se sont révélés encore meilleurs dans le deuxième verger (Lömmenschwil, SG), où le taux d'infection est descendu de 100 % à 13 % pour les arbres et de 14 % à <1 % pour les inflorescences. Ainsi, ces essais, certes de portée limitée, ont néanmoins confirmé qu'une application de l'antibiotique en temps opportun réduit notablement la virulence du feu bactérien.

2.1.3 Etablissement d'un niveau de référence avant traitement, suivi de la résistance après application de la streptomycine et évaluation de l'impact sur les communautés microbiennes

Les essais ont été réalisés sur des parcelles appartenant à plusieurs vergers commerciaux et expérimentaux traités avec de la streptomycine (comme prescrit dans l'autorisation) ou avec un moyen alternatif (avec la levure *Aureobasidium pullulans* ou avec de l'eau). Les analyses ont porté sur des échantillons de matériel végétal et de sol.

Voici les principaux résultats obtenus:

- a. Aucun clone du pathogène *E. amylovora* résistant à la streptomycine n'a été trouvé, ni avant, ni après le traitement à la streptomycine. Des clones résistants ont cependant été trouvés dans les communautés microbiennes naturelles, même en l'absence de traitement (p. ex. chez *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromicrobium*, etc.).
- b. Les applications répétées de streptomycine n'ont eu aucun impact sur les communautés microbiennes (microorganismes cultivables et non cultivables) des fleurs, des fruits, des feuilles ou du sol, et ce dans tous les sites. Même une application selon un scénario du pire (100 fois le dosage maximum autorisé) n'a pas eu d'influence sur la diversité des communautés microbiennes naturelles.

2.1.4 Evolution des gènes de résistance à la streptomycine et à la tétracycline après plusieurs applications de streptomycine

Des essais ont été menés durant trois ans (2010-2012), dans trois vergers expérimentaux des cantons de Thurgovie et de Zurich. Un suivi de gènes codant pour la résistance à la streptomycine et à la tétracycline a été réalisé sur des bactéries cultivables et non cultivables provenant des fleurs, des feuilles et du sol. Chaque année, il y a eu trois applications de streptomycine ou d'eau (parcelles

témoins). Des échantillons ont été collectés le jour précédant la première application, un jour, puis trois semaines après la troisième application, et lors de la récolte.

Voici les principaux résultats obtenus:

- a. C'est dans les premiers échantillons (sol, fleurs, feuilles) prélevés sur les trois sites, donc avant traitement, qu'a été détecté le plus grand nombre de gènes de résistance, et ce en grandes quantités.
- b. Sur les trois sites, les hausses relatives du nombre de gènes de résistance après traitement à la streptomycine, pour autant qu'elles aient été observées, étaient occasionnelles, inconstantes et non reproductibles d'une année à l'autre.
- c. Les hausses relatives du nombre de gènes de résistance après les applications de streptomycine étaient transitoires et n'ont pas été détectées dans les premiers échantillons (avant traitement) de l'année suivante.
- d. En conclusion, dans les conditions expérimentales des essais, aucun effet permanent sur la résistance à la streptomycine et à la tétracycline n'a été observé.

2.2 Module B: Evaluation de l'impact de l'application de streptomycine sur la flore commensale d'animaux vivant à proximité des parcelles traitées

Ce module a été réalisé par l'Institut de bactériologie vétérinaire de l'Université de Berne.

Deux troupeaux (test et témoin) de cinq agneaux et deux brebis ont été placés sur deux pâturages distincts, d'une superficie d'environ 2000 m² chacun. Quatre applications de streptomycine ont été réalisées sur le pâturage test, par pulvérisation directe sur l'herbe de deux surfaces adjacentes de 180 et 120 m², à des concentrations d'antibiotique respectivement de 17,5 mg/m² et 12,0 mg/m² afin de reproduire le gradient de streptomycine résultant du traitement d'un verger. Les moutons ont été confinés sur les deux surfaces traitées durant 12 heures, puis relâchés sur l'entier du pâturage. Des prélèvements anaux et nasaux ont été réalisés sur les deux troupeaux aux temps suivants: 0 et 3 jours après la première application, 6 jours après la troisième application, 2 jours après la quatrième application, puis aux jours 67 et 90. Deux bactéries indicatrices ont été isolées de ces prélèvements, *Escherichia coli* dans les échantillons anaux et *Staphylococcus* spp. dans les échantillons nasaux. Les colonies isolées ont ensuite été testées quant à leur susceptibilité à plusieurs antibiotiques. La nature génétique de la résistance à la streptomycine a été analysée en recherchant les séquences *aph3* (*strA*), *aph6* (*strB*), *aadA*-, *ant(6)-1a*, et en séquençant le gène *rpsL* codant pour la protéine ribosomique S12.

Voici les principaux résultats obtenus:

- a. au total 455 souches d'*E. coli* ont été testées. Avant l'application de la streptomycine, 16 % des souches isolées du troupeau témoin et 15 % des souches isolées du troupeau test étaient résistantes à la streptomycine;
- b. au 90^e jour, les fèces des moutons exposés à la streptomycine contenaient 44 % de souches d'*E. coli* résistantes alors que ce pourcentage était de 17 % dans le troupeau témoin. Rapporté au nombre total de souches d'*E. coli* isolées depuis le début de l'expérience, le troupeau exposé comptait 40 % de bactéries résistantes et le troupeau témoin 22 % ($p=0,0001$);
- c. le taux de résistances multiples (principalement au sulfaméthoxazole, à l'ampicilline, à la tétracycline et au chloramphénicol) était significativement plus élevé chez les moutons exposés (40 %) que dans le groupe témoin (24 %, $p=0,0002$). Quelques souches se sont révélées être résistantes aux céphalosporines de troisième génération;
- d. 184 souches de *Staphylococcus* spp. ont été testées. En tout, depuis la première application jusqu'au dernier échantillonnage, seules 8 souches résistantes ont été détectées dans les cavités nasales des moutons exposés et aucune dans le groupe témoin. Lorsque les résultats de chaque temps de prélèvement étaient analysés séparément, la différence de fréquence

d'occurrence des staphylocoques résistants entre les groupes test et témoin n'était pas significative. Pour que la différence de fréquence d'occurrence devienne significative, il fallait agréger les résultats de tous les prélèvements ($p=0,0001$). Les huit souches résistantes à la streptomycine trouvées étaient aussi résistantes à la tétracycline, à l'acide fusidique et à la tiamuline.

3 Discussion générale

Apparemment, les résultats obtenus par ces deux projets sont contradictoires. Dans les vergers, dans les conditions expérimentales appliquées, des augmentations occasionnelles et transitoires du nombre de gènes de résistance ont bien été observées, mais sans pouvoir les associer aux applications de streptomycine. En particulier, il n'y avait pas de persistance de ces hausses, qui n'étaient plus détectables six à sept mois après la fin d'un traitement annuel. Ces résultats rassurants sont à mettre au compte des directives sévères accompagnant l'autorisation d'utiliser la streptomycine contre le feu bactérien. Il apparaît donc essentiel de poursuivre sur cette voie. Néanmoins, il est impossible d'exclure tout accroissement de la résistance à long terme. C'est pourquoi le suivi des sols des vergers traités doit aussi être maintenu.

Quant à l'expérience avec les moutons, ses résultats sont difficiles à généraliser. Certes, un accroissement significatif de la résistance aux antibiotiques a bien été observé chez les souches d'*E. coli* isolées de la flore intestinale des animaux ayant pâture sur les champs traités à la streptomycine. Cependant, les parcelles ont reçu quatre applications de l'antibiotique et non trois, comme le spécifient les autorisations annuelles. En outre, les moutons ont pu pâture sur l'herbe traitée durant douze heures, ce que les directives accompagnant les autorisations interdisent expressément. Ainsi, il est fort probable que les moutons ont été exposés à des quantités de streptomycine plus importantes que ne le permettent les autorisations. Néanmoins, il importe de ne pas passer sous silence cette augmentation de la résistance, mais de l'interpréter comme un appel impératif à la prudence.

4 Conclusions

Tant les résultats obtenus par ce programme de recherche que le suivi réalisé par l'ACW depuis 2008 ont montré que, dans les conditions des expériences, le traitement à la streptomycine n'avait qu'un effet occasionnel et réversible sur le niveau de résistance aux antibiotiques des microorganismes présents dans le sol et sur les feuilles, les fleurs ou les fruits des vergers traités. Bien que transitoire, cet accroissement ne doit pas être passé sous silence, tout comme il importe de ne pas ignorer l'apparition de souches d'*E. coli* résistantes dans les fèces des moutons exposés à la streptomycine. Ces résultats, de même que les résidus de streptomycine trouvés parfois dans le miel ou les pommes, sont un appel clair à rester vigilant. En cas d'octroi d'autres autorisations d'utiliser la streptomycine pour lutter contre le feu bactérien, il est essentiel de:

- a. maintenir les mesures de contrôle sévères qui accompagnaient les autorisations jusqu'ici;
- b. continuer le suivi des niveaux de résistance dans le sol des vergers traités.

En outre, il convient d'évaluer les risques liés aux méthodes et conditions d'application, dans le but de les réduire si possible. Lors de la pulvérisation de l'antibiotique, il serait bon de couvrir les surfaces attenantes afin d'éviter toute contamination par dérive. Enfin, il faut prêter une attention particulière à la protection des travailleurs impliqués, qui doivent être informés correctement des risques encourus en cas de surexposition à ce médicament.

Le meilleur moyen de calmer les préoccupations soulevées par l'usage de streptomycine pour lutter contre le feu bactérien serait de trouver un traitement alternatif efficace. Il est donc impératif d'encourager activement la recherche dans ce domaine et de financer suffisamment les projets. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus, tant avec la bactérie *Pantoea agglomerans* à l'ACW, qu'avec certains composés inorganiques, tel l'alun $[KAl(SO_4)_2]$, introduit actuellement dans le Bade-Württemberg. Une autre voie de recherche intéressante serait la sélection de variétés moins sensibles à *E. amylovora*, que ce soit par des procédés d'hybridation classiques ou en utilisant les outils du génie génétique.

Remerciements

Nous remercions les personnes suivantes pour leur engagement dans le comité d'experts: Pascal Meylan (Université de Lausanne, président de la CFBS), Isabel Hunger-Glaser (directrice du secretariat de la CFBS), Markus Hardegger (OFAG), Eduard Holliger (ACW), Christian Pillonel (OFEV), Sabina Büttner (BVET), Kathrin Mühlemann[†] (CFBS et Université de Berne), Irene Schiller (BVET), Olivier Sanvido (SECO), Nicolas Foresti (OFAG), Mauro Tonola (CFBS et Istituto Cantonale di Microbiologia, Bellinzona), Jean-Claude Piffaretti (Interlifescience, Massagno, coordinateur du programme).

En outre, nous remercions Brion Duffy (ACW), Fiona Walsh (ACW) et Joachim Frey (Université de Berne) qui ont réalisé les expériences décrites dans le présent rapport.

[†] C'est avec une grande tristesse que nous avons appris le décès de Kathrin Mühlemann en novembre 2012.

Remarque: Une grande partie des résultats du programme ont fait l'objet d'une publication dans une revue scientifique ou sont sous presse.