

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE**

Année 2011

THESE N°

**BACTERIES MULTIRESISTANTES
DANS L'ENVIRONNEMENT :
RECHERCHE DANS LES EFFLUENTS
DE LA VILLE DE TOULOUSE**

Pour le **DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES** de PHARMACIE SPECIALISEE

Tenant lieu de

THESE

Pour le DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

le 18 Février 2011 à Toulouse

par

Pierre PARVEAU

Né le 10 Décembre 1980 à Limoges (Haute-Vienne)

JURY

Madame le Professeur Nicole MARTY

Président

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ

Juge

Monsieur le Docteur Hubert BRUGERE

Juge

Monsieur le Docteur Laurent CAVALIE

Directeur de thèse

Madame Marie-Pierre AUBRY

Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES - FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur **Jean –Luc DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN :

Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN :

Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOU Jean-Louis

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE – CRYPTOGRAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE – CHIMIE MINERALE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE – MYCOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN GIRY Karine

PHARMACIE GALENIQUE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE

CLEDAT Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE

COMBY Francis

CHIMIE THERAPEUTIQUE

COURTIOUX Bertrand

PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSEE Sylvie

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS
DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
---------------------------------	-----------------------------------

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

REMERCIEMENTS

A mon président du jury

Madame le professeur N. MARTY

Je vous remercie de l'honneur que vous m'accordez en acceptant de présider mon jury de thèse. Merci également de m'avoir accueilli dans votre service de Bactériologie-Hygiène, et de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je souhaite vous exprimer ma profonde reconnaissance.

A mon directeur de thèse

Monsieur le Docteur Laurent CAVALIE

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de diriger mon travail, et vous m'avez donné votre temps sans compter. Pour cela, je vous suis extrêmement reconnaissant. Vous m'avez accueilli avec toute votre gentillesse et votre générosité. Vous avez apporté de l'intérêt à mon travail, et vos compétences, votre savoir et votre disponibilité m'auront été précieux.

Nous avons partagé ensemble des discussions passionnantes dont je me souviendrai longtemps.

Recevez ici l'expression de mon amitié sincère.

A Madame le professeur S. ROGEZ

Membre du jury

Vous avez accepté de venir ici à Toulouse pour représenter la faculté de pharmacie de Limoges et je vous en remercie sincèrement. Je suis très sensible à l'honneur que vous m'accordez en acceptant de juger mon travail.

Je vous serai éternellement reconnaissant de m'avoir accueilli si gentiment, il y a quelques mois, lorsque je suis venu demander votre aide.

Soyez assurée de ma gratitude et de mon plus profond respect.

A Monsieur le Docteur H. BRUGERE

Membre du jury

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à mon jury. Je vous adresse ici ma profonde reconnaissance.

Vous m'avez permis, au sein de l'école nationale vétérinaire de Toulouse, de réaliser des manipulations, et pour toute votre aide logistique, je vous dois ma plus sincère considération.

Veillez trouver ici l'expression de mes meilleurs sentiments (corréziens).

A Madame M.P. AUBRY

Membre du jury

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger mon travail et je vous en suis très reconnaissant. Je dois aussi vous remercier chaleureusement pour toute l'aide que vous m'avez apporté en me permettant de réaliser des prélèvements sur le site de Ginestous.

Soyez assurée de ma profonde gratitude.

A toute l'équipe d'Hygiène

Un immense merci pour votre accueil plus que chaleureux dans l'unité d'hygiène. Je n'oublierai pas toute l'amitié que vous m'avez témoigné.

Merci à Geneviève pour toute ton aide et ton expertise de bactériologiste « à l'ancienne ».

Merci à LULU pour votre bonne humeur, votre bienveillance à mon égard, et pour votre extrême gentillesse. Je vous souhaite de trouver enfin le bon tonton...

Merci à Sylvie et à Sabine.

Je vous adresse à toutes, ma vive reconnaissance.

Un grand merci également à Monique Kerouredan, de l'école vétérinaire, pour l'aide que vous m'avez apporté, et à Sandrine Barthe, de Véolia.

Je dédie cette thèse,

A mes parents, qui m'ont soutenu durant ces longues années d'études, autant matériellement que moralement. Merci à vous d'être les meilleurs parents du monde ! Merci d'avoir toujours cru en moi, et de m'avoir incessamment encouragé. Vous m'avez ouvert les yeux sur le monde, et permis de toucher mes rêves musicaux. Que votre retraite soit longue et heureuse. Je vous aime.

A ma sœur, son Nico, et leur Théodore tout neuf, mon premier filleul. Vous me faites un grand honneur en me chargeant de cette tâche. J'espère que j'en serai digne. Je vous souhaite de vivre avec bonheur tous les grands moments à venir (baptême, mariage, peut-être un autre popard ?). Fabriquez-nous une Belle Famille !!!

A mon frère, qui est si loin sur son île, mais à qui je pense avec amour, ainsi qu'à sa mignonne petite fille. Je te souhaite de réussir dans tes projets. Et, reviens vite...

A Mamie Ja, qui de là-haut, nous observe certainement avec bienveillance. Je pense souvent à toi.

A mon ami, Axel, la plus merveilleuse découverte de mes études. Merci pour ton soutien et pour toutes ces belles années de jeunesse, qui j'en suis sûr, ne sont pas encore terminées.

A mes amis, de fac, d'internat et d'ailleurs, Greg, Manu, Tef, Xav, Flo, Cécile, Laura et bien d'autres.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : L'EAU , UNE RESSOURCE PRECIEUSE A GERER AVEC ATTENTION

I- L'EAU SUR TERRE

II- DE LA DISTRIBUTION A L'EAU POTABLE

III- L'ASSAINISSEMENT DES EAUX USEES

CHAPITRE 2 : ETAT DES LIEUX DE LA CONTAMINATION DES MILIEUX AQUATIQUES

I- SOURCES ET CHEMINEMENT DES POLLUANTS

II- LES DIFFERENTS TYPES DE POLLUTION

III- LES BACTERIES MULTIRESISTANTES DANS L'ENVIRONNEMENT

CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA PRESENCE DE BACTERIES MULTIRESISTANTES DANS LES EFFLUENTS DE LA VILLE DE TOULOUSE

I- PRESENTATION DE L'ETUDE

II- MATERIEL ET METHODE

III- RESULTATS

IV- DISCUSSION

V- SYNTHESE

CONCLUSION

LISTE DES ABBREVIATIONS

am : Ampicilline
amc : Amoxicilline/acide clavulanique
an : Amikacine
atm : Aztréonam
BLSE : Béta-lactamase à spectre étendu
BMR : Bactérie multirésistante
c : Chloramphénicol
caz : Ceftazidime
cf : Céfalotine
cip : Ciprofloxacine
cla : Ticarcilline/acide clavulanique
Cli : Clindamycine
CMI : Concentration minimale inhibitrice
cs : Colistine
ctx : Céfotaxime
DBO : Demande biologique en oxygène
DCO : Demande chimique en oxygène
e : Erythromycine
ECP : Electrophorèse en champs pulsés
EH : Equivalent-habitant
ert : Ertapénème
ERV : entérocoque résistant à la vancomycine
fa : Acide fusidique
fep : Céfépime
fos : Fosfomycine
fox : Céfoxitine
ft : Nitrofurantoïne
gm : Gentamicine
imp : Imipénème
INVS : Institut de Veille Sanitaire
isp : Isépamicine
k : Kanamycine

l : Lincomycine
lnz : Linézolide
lvx : Lévofoxacine
mer : Méropénème
MES : Matières en suspension
min : Minocycline
mox : moxifloxacine
na : Acide nalidixique
net : Nétilmicine
nor : Norfloxacine
ofx : Ofloxacine
ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques
oxa : Oxacilline
pef : Péfloxacine
pen : Benzylpénicilline
pip : Pipéracilline
PLP : Protéines de liaison aux pénicillines
pt : Pristinamycine
qda : Quinupristine/dalfopristine
rmp : Rifampicine
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
STEP : Station d'épuration
sxt : triméthoprim/sulfaméthoxazole
te : Tétracycline
tec : Teicoplanine
tic : Ticarcilline
tm : Tobramycine
tzp : Pipéracilline/tazobactam
UFC : Unité formant colonie
van : Vancomycine

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques a constitué une véritable révolution dans le domaine des maladies infectieuses. L'antibiothérapie a sauvé un très grand nombre de vies et l'on a pu croire que les maladies infectieuses seraient un jour toutes éradiquées. Cependant, l'apparition et l'extension rapide du phénomène de résistance a assombri ce brillant tableau. En effet, des maladies que l'on croyait maîtrisées, réapparaissent. La menace existe dans les pays développés, mais plus encore dans les pays en voie de développement.

La résistance aux antibiotiques est devenue un sujet de préoccupation majeur entraînant une réelle prise de conscience tant au niveau national qu'international, d'autant que ces dernières années, le développement de nouvelles molécules antibiotiques est devenu rare. On assiste même, dans des cas extrêmes, à des impasses thérapeutiques, souvent médiatisées (bactérie NDM1).

L'utilisation non raisonnée des antibiotiques, tant en médecine humaine que vétérinaire, ou encore comme facteur de croissance dans l'élevage, a entraîné l'apparition et la diffusion de bactéries multirésistantes aux antibiotiques. On observe par exemple, depuis le début des années 2000, l'émergence dans la communauté humaine, d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, qui étaient jusque-là rencontrées uniquement à l'hôpital.

Les bactéries multirésistantes ont aujourd'hui diffusé dans l'environnement, et leur mise en évidence dans les eaux usées, au niveau des stations d'épuration, dans les eaux de surface ou souterraines, ainsi que dans les sols est désormais établie. Un problème de santé publique se pose alors car l'homme, dans les différents milieux où il vit, peut être exposé à ces bactéries multirésistantes, notamment par l'intermédiaire de l'eau. D'autre part, leur présence dans l'environnement pourrait entraîner le transfert de gènes de résistance aux bactéries de l'environnement, provoquant ainsi une diffusion encore plus grande de ces résistances aux antibiotiques.

Nous avons donc décidé d'étudier la présence de bactéries multirésistantes dans les effluents hospitaliers et dans les effluents urbains à Toulouse, de manière à mettre en évidence leur présence dans ces milieux, de les caractériser, et d'observer leur rejet dans l'environnement au niveau d'une station d'épuration.

CHAPITRE 1 : L'EAU , UNE RESSOURCE PRECIEUSE

A GERER AVEC ATTENTION

A l'échelle cosmique, l'eau liquide est plus rare que l'Or (Hubert REEVES)

I- L'EAU SUR TERRE

L'eau est-elle présente dans le système solaire ailleurs que sur la Terre ? Elle existe dans tout le cosmos, sous forme de glace ou de vapeur [90]. Elle est même relativement courante à l'état de vapeur. Mais pour ce qui est de l'eau liquide, il semble qu'elle soit beaucoup moins présente et que la Terre soit une planète exceptionnelle qui (seule ?), peut jouir du charme de l'eau liquide. Omniprésente et indispensable au maintien de la vie, l'eau est l'un des corps chimiques les plus essentiels de notre planète.

I-1- L'eau sur Terre aux sources de la vie

Contrairement aux autres planètes du système solaire, la Terre a eu de la « chance ». Suffisamment massive, elle a pu retenir toute son eau par gravité, et sa position dans le système solaire, ni trop près, ni trop loin du soleil, permet à une majeure partie de l'eau présente sur Terre d'être liquide.

Aux origines de la Terre, l'eau présente lors de sa formation s'est retrouvée libérée à l'état de vapeur dans son atmosphère. Au cours du refroidissement progressif de la planète, la vapeur d'eau libérée s'est condensée, formant une épaisse couche nuageuse autour de la Terre. Des pluies torrentielles se sont alors abattues sur la Terre durant des millions d'années. Ceci a commencé à entraîner une érosion progressive de la croûte terrestre, conduisant ainsi à la formation des premiers océans.

Ces premiers océans, permettant une protection contre les rayonnements ultraviolets solaires, ont vu apparaître les premiers microorganismes vivants, les bactéries, il y a environ 3,5 milliards d'années. Il y a 3 milliards d'années, apparaissent ensuite les premières algues, des algues bleues, ou cyanobactéries, qui ont la capacité de produire de l'oxygène par photosynthèse. L'oxygène ainsi fabriqué et libéré dans l'atmosphère, a permis, au contact des rayonnements solaires de la haute atmosphère, la formation d'ozone. Progressivement, une

couche d'ozone s'est formée dans l'atmosphère, protégeant ainsi la surface de la planète mais aussi son atmosphère des rayonnements nuisibles du soleil, notamment les ultraviolets. Grâce à l'oxygène présent dans l'atmosphère et à la couche d'ozone protectrice, la vie a pu alors conquérir la terre ferme. C'était il y a environ 500 millions d'années.

I-2- Le cycle de l'eau sur terre : Histoire et réalité

I-2-1- Histoire d'un cycle

Les principes du déroulement du cycle de l'eau sont aujourd'hui bien connus. Mais il n'en était pas de même dans le passé, et il aura fallu plusieurs siècles pour en percer tous les mystères.

1-2-1-1- Les théories de l'Antiquité

L'eau est un élément hautement mythologique. Elle a fasciné de nombreux penseurs grecs et romains par le caractère mystérieux de son cycle naturel. De nombreuses questions se posent à propos de l'eau. Ainsi, Platon (428 - 348 av. J.C.) et Aristote (384 - 322 av. J.C.) s'interrogent-ils sur la capacité des seules précipitations à entretenir le cours permanent des fleuves. Ils présument par ailleurs que c'est l'eau de mer qui, en pénétrant dans le sol et en remontant à sa surface, entraîne la formation d'eau douce [9].

Une des grandes difficultés pour expliquer le cycle de l'eau était de comprendre pourquoi le niveau des océans ne s'élevait pas, malgré l'apport continu des fleuves. Il aurait fallu pouvoir estimer la forte quantité d'eau océanique évaporée par l'énergie solaire, or ceci était impossible, car les étendues marines étaient censées n'occuper qu'une surface très réduite dans un monde plat en forme de disque. Héritée de Ptolémée (90-168 après J.-C.), cette conception ne s'effaça que très progressivement chez les occidentaux, même après les travaux de Copernic (1473-1543) et de Galilée (1564-1642).

Un autre paradoxe était difficile à résoudre pour les anciens. En Égypte, la crue du Nil se place en pleine saison sèche et les riverains ne connaissaient pas les sources du fleuve, découvertes seulement au XIXe siècle par les Européens Henry Morton Stanley et David Livingstone. Les anciens Egyptiens, dans les castes basses, admettaient la remontée de la mer

dans le fleuve comme dans une ria bretonne, et le Nil n'était donc qu'un bras de la Méditerranée.

Enfin, la pluie cesse et pourtant les rivières continuent de couler. Comment sont-elles alimentées? Parmi d'autres hypothèses plus solides, Aristote (384-322 avant J.-C.), considérait de façon fantaisiste que l'écoulement des rivières trouvait pour partie sa source dans la condensation de la vapeur d'eau souterraine, elle-même produite par l'écoulement et le dessalement de l'eau de mer dans le sol.

1-2-1-2- Les découvertes des temps modernes

À la Renaissance, Léonard de Vinci (1452-1519) est sans doute le premier à remettre en cause la théorie aristotélicienne du cycle de l'eau, qu'il compare à la circulation sanguine dans le corps humain. Mais l'origine des eaux et leur cycle dans la nature ne s'éclairent pour les savants européens que vers la fin du XVII^{ème} siècle.

Pierre Perrault (1613-1688), frère du conteur, publie en 1674 le premier ouvrage de l'hydrologie scientifique « De l'origine de fontaines ». Il y réalise le bilan hydrologique d'un bassin sur le cours supérieur de la Seine en effectuant des mesures de précipitations, d'évaporation et de perméabilité. Edmé Mariotte (1620-1684) démontre ensuite que la pluie ne se contente pas de ruisseler en surface, mais qu'elle s'infiltré dans les couches poreuses du sol pour constituer les nappes souterraines. Edmond Halley (1656-1742), astronome britannique, estime les évaporations de la Méditerranée et les compare aux apports des fleuves s'y jetant. Pour connaître l'évapotranspiration des végétaux, le mathématicien français De La Hire construisit trois lysimètres en 1688, dispositif permettant d'étudier et de mesurer l'évolution de l'eau dans un sol naturel, agricole, forestier ou expérimental. En 1743, le mathématicien Alexis Clairaut (1713 - 1765) et Georges Buffon (1707 - 1788) mettent en évidence que « le cycle de l'eau ne peut être qu'atmosphérique ». Il apparaît alors que c'est bien la même eau qui circule partout, recyclée sans cesse depuis plus de trois milliards d'années.

Au XIX^e siècle, les progrès de la géologie, particulièrement l'étude des eaux souterraines, et de la météorologie donnent naissance à l'hydrologie moderne.

Mais il faut attendre le début du XX^e siècle pour mettre au point des mesures hydrologiques incontestables et établir les connexions qui s'imposent entre eau douce et eau salée, nuage et pluie, évaporation et condensation.

I-2-2- Aujourd'hui

Le cycle de l'eau correspond à l'échange permanent entre les quatre grands réservoirs de l'hydrosphère que sont les mers et océans, les eaux continentales (souterraines ou superficielles), l'atmosphère et la biosphère. Le moteur de ce cycle, le soleil, par l'énergie thermique qu'il rayonne, active et maintient en permanence les masses d'eau en mouvement.

Ce cycle se divise en deux parties intimement liées : une partie atmosphérique qui concerne la circulation de l'eau dans l'atmosphère, sous forme de vapeur d'eau essentiellement (sublimation, évaporation, évapotranspiration, condensation), et une partie terrestre qui concerne l'écoulement de l'eau sur les continents, qu'il soit superficiel ou souterrain et qui mène toujours à la mer après un temps plus ou moins long.

On peut considérer que le cycle de l'eau est stationnaire, c'est-à-dire que toute perte d'eau par l'une ou l'autre de ses parties, atmosphérique ou terrestre, est compensée par un gain d'eau par l'autre partie.

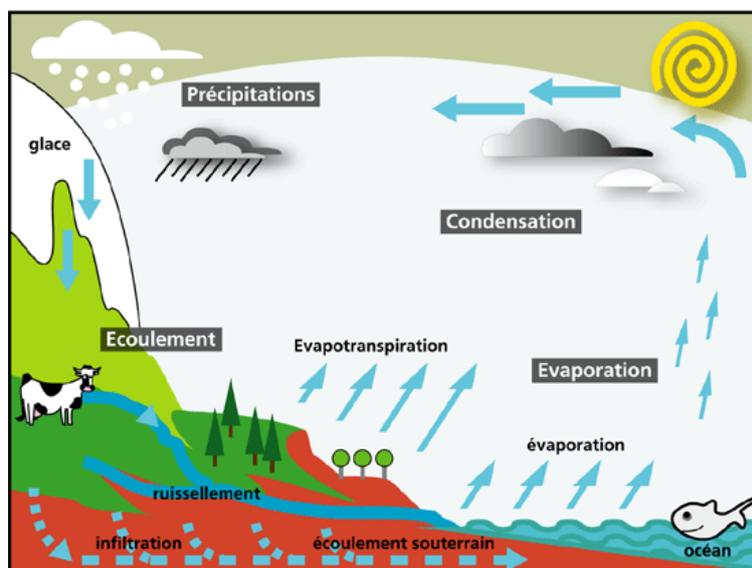


Figure 1 : Le cycle de l'eau dans ses trois phases, solide, liquide, gazeuse (d'après « La vie d'une goutte d'eau : Mieux comprendre pour mieux gérer » <http://www.terrefinance.fr/La-vie-d-une-goutte-d-eau-mieux-comprendre-pour-mi-vtpc-221.php>)

En moyenne, sur l'année et sur l'ensemble du globe terrestre, 65% des précipitations qui arrivent à terre s'évaporent, 24% ruissellent et 11% s'infiltrent.

I-3- Les ressources

Il est difficile de chiffrer le volume total des eaux terrestres. On peut malgré tout estimer les volumes d'eau contenue dans les quatre grands réservoirs de la biosphère que sont les océans, les eaux continentales, l'atmosphère et la biosphère. Mais il n'en est pas de même avec les eaux souterraines de la croûte terrestre et encore moins avec l'eau contenue dans le manteau terrestre.

Les stocks sont les volumes d'eau présents à un instant donné dans un réservoir donné. Ils donnent en quelque sorte une image instantanée des quantités d'eau disponible. Les stocks des différents réservoirs terrestres sont donnés dans le tableau ci-dessous.

LES RESERVOIRS	LES STOCKS (en km³)
Océans	1 350 000 000
Eaux continentales	35 976 700
<i>Glaciers</i>	<i>27 500 000</i>
<i>Eaux souterraines</i>	<i>8 200 000</i>
<i>Mers intérieures</i>	<i>105 000</i>
<i>Lacs d'eau douce</i>	<i>100 000</i>
<i>Humidité des sols</i>	<i>70 000</i>
<i>Rivières</i>	<i>1700</i>
Atmosphère (humidité de l'air)	13 000
Biosphère (cellules vivantes)	1 100

Tableau 1 : Les stocks d'eau dans les 4 réservoirs terrestres (d'après L'eau, Ghislain de Marsily, Dominos Flammarion, 1995)

Il y a donc au total 1 385 990 800 kilomètres cube d'eau dans l'hydrosphère, mais la majeure partie est contenue dans les océans sous forme d'eau salée. Les eaux douces de la planète, c'est-à-dire celles dont la salinité est inférieure à 3 g/L ne représentent que 3 % du total de l'hydrosphère, et la plus grande partie de ces eaux douces sont retenues aux pôles sous forme de glace.



Figure 2 : L'eau de l'hydrosphère [90]

Le volume des eaux douces directement utilisables est finalement d'environ 9 millions de kilomètres cube, dont la plus grande part consiste en des eaux souterraines.

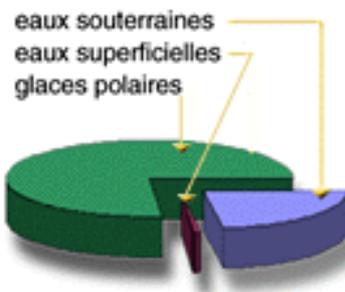


Figure 3 : Les eaux douces [90]

Au cours du cycle de l'eau, des transferts incessants d'importantes masses d'eau se produisent entre les différents réservoirs de la planète. Ceci entretient souvent l'idée que l'eau est véritablement une ressource renouvelable. Mais cela n'est pas aussi simple car tout dépend du réservoir considéré et du temps de résidence de l'eau dans ce réservoir. L'avantage de ces transferts est qu'ils permettent aux réserves de se renouveler. Plus le temps de résidence est court dans un réservoir, plus l'eau de ce réservoir est renouvelée rapidement. Le volume des eaux courantes superficielles, les plus utilisées par l'homme pour sa consommation, n'excède pas 1700 kilomètres cube, en termes de stock disponible à un moment donné, ce qui est peu. En revanche ces eaux se renouvellent très rapidement.

Lorsque l'on fait le bilan des flux hydriques, on constate qu'il s'évapore plus d'eau qu'il n'y a de précipitations au-dessus des océans. Cette vapeur d'eau océanique vient causer des précipitations sur les continents, où, à l'inverse, il tombe plus de précipitations qu'il ne s'évapore d'eau. Cette eau retourne aux océans *via* les cours d'eau. On estime à 40 000

kilomètres cube, le volume d'eau ainsi apporté chaque année aux océans par l'ensemble des cours d'eau. Cette eau provient aussi bien du ruissellement ou des infiltrations des eaux de pluie que de la fonte des neiges. Ce flux d'eau renouvelé constitue une sorte de réserve annuelle dans laquelle il est possible de puiser sans risques.

Enfin il faut noter que la répartition de ces ressources en eau douce est très inégale sur la planète.

I-4- L'eau et l'Homme

I-4-1- L'eau, vecteur de mort

L'eau, essentielle à la survie de tous les êtres vivants, véhicule nombre de microorganismes, bactéries, virus qui y vivent et s'y développent, ainsi qu'un grand nombre de parasites dont les hôtes ont besoin de l'eau pour vivre ou se reproduire. Ces organismes peuvent engendrer des maladies parfois graves lorsqu'ils pénètrent dans le corps humain.

Les bactéries et les virus abondent dans les eaux souillées par les déjections humaines et animales. Leur transmission à l'homme se fait par simple ingestion d'eau infectée et leur propagation est rapide dans les pays qui ne disposent pas de bonnes conditions d'hygiène. Citons par exemple le choléra dont l'agent, *Vibrio cholerae*, se transmet exclusivement par l'eau. Il provoque de très fortes diarrhées qui peuvent entraîner la mort par déshydratation en absence de traitement. La fièvre typhoïde, maladie causée par *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi*, se transmet par ingestion de boissons ou d'aliments souillés. Elle provoque des diarrhées intenses et également une forte fièvre. L'Europe a beaucoup souffert par le passé d'épidémies dues à la mauvaise qualité de l'eau. Aujourd'hui ces épidémies touchent les pays chauds et souvent pauvres, qui ne disposent pas de latrines septiques ni de traitement des eaux.

Les parasites pullulent dans les régions chaudes et humides, lieu de prédilection de leurs hôtes, mollusques, larves d'insectes ou insectes. Citons par exemple les vers plats du genre *Schistosoma*, responsables de la bilharziose, qui sont véhiculés dans des zones humides, des eaux stagnantes, par des mollusques du genre bulin qui sont leurs hôtes intermédiaires. Ils peuvent infecter les hommes par passage transcutané et causer des troubles graves du foie, de la vessie et des intestins. L'agent responsable du paludisme, le *Plasmodium*, n'a pas directement besoin de l'eau pour vivre, mais par contre elle est nécessaire à la reproduction de

son hôte intermédiaire, un moustique du genre *Anopheles*. Le paludisme provoque des accès intermittents de fortes fièvres. Il est responsable chaque année de la mort de 2 à 3 millions de personnes sur les 700 à 800 millions infectés. Citons également le Chikungunya, une maladie tropicale due à un arbovirus, transmise par un moustique du genre *Aedes* qui a également besoin de l'eau pour se reproduire. Cette maladie provoque de fortes douleurs articulaires. En mai 2005, un foyer de Chikungunya est apparu sur l'île de la Réunion, et dix mois après, plus de 150 000 personnes étaient infectées par le virus, soit environ 20% de la population totale de l'île.

L'eau est le vecteur de transmission privilégié de ces maladies que l'on dit hydriques. L'eau insalubre tue plus que la guerre. On estime qu'elle est responsable de la mort de 8 millions de personnes par an dans le monde.

L'eau peut également se montrer d'une violence extrême lors notamment d'épisodes climatiques exceptionnels. Évoquons ainsi les ouragans, typhons, orages violents, qui régulièrement provoquent la destruction d'infrastructures importantes et entraînent la mort de nombreuses personnes. On peut également penser aux Tsunamis qui peuvent dévaster des étendues côtières immenses et provoquer un nombre de morts considérables (Tsunami en Asie du sud-est en décembre 2004). Les avalanches représentent aussi des événements d'une violence extrême causés par l'eau. De plus l'urbanisation anarchique (installations d'habitations dans des zones inondables), l'augmentation des surfaces imperméables qui empêchent l'infiltration de l'eau dans les sols, peuvent provoquer des événements de crues exceptionnels lors d'orages violents. Des exemples tristement célèbres illustrent ces événements, notamment en France à Vaison la Romaine dans le Vaucluse.

Enfin, les grandes inondations ou les années particulièrement pluvieuses peuvent entraîner la perte des récoltes et provoquer ainsi des famines. Pensons par exemple aux huit années mouillées, au Moyen Age, de 1313 à 1320, qui touchèrent toute l'Europe et qui produisirent, en 1315-1316 l'une des pires famines du Moyen Age. Le foin ne séchait plus et pourrissait sur place, les récoltes étaient ridicules [55]. À l'inverse, l'absence d'eau, peut elle aussi entraîner des pertes de récoltes énormes et provoquer ainsi des famines.

I-4-2- L'eau, enjeu de pouvoir et enjeu économique

Dès l'Antiquité, le contrôle de l'eau signifiait le pouvoir, notamment au Moyen-Orient où elle est particulièrement rare. On a pu alors parler de civilisations hydrauliques, reposant sur la propriété et la maîtrise de la gestion de l'eau. Les civilisations Egyptiennes, Assyriennes et du Royaume de Saba en sont des exemples patents [9]. L'eau étant un bien nécessaire à tout le monde, celui qui en détient la distribution jouit d'un pouvoir considérable.

Aujourd'hui les perspectives en matière d'eau douce ne sont pas réjouissantes car la raréfaction de la ressource semble inéluctable, au vu de l'augmentation de la population mondiale et du développement à venir d'un grand nombre de pays. Or un pays qui manque d'eau est un pays qui ne peut ni nourrir sa population, ni se développer. Avoir accès à l'eau est donc un enjeu économique puissant à l'échelle planétaire, qui pourrait devenir dans les années à venir, l'une des premières causes de tensions internationales. Aujourd'hui, plus de 40% de la population mondiale vit dans les 250 bassins fluviaux transfrontaliers du monde [90]. Autrement dit, ces populations sont obligées de partager leurs ressources en eau avec les habitants des pays voisins. Une telle situation peut être à l'origine de conflits récurrents, notamment quand un cours d'eau traverse une frontière, car l'eau devient alors un véritable instrument de pouvoir aux mains du pays qui se trouve en amont. Les conflits autour de l'eau ne sont d'ailleurs pas récents. En 1503, Léonard De Vinci conspirait avec Machiavel pour détourner le cours de l'Arno en l'éloignant de Pise, cité en guerre avec Florence, sa ville natale. Dans les sociétés asiatiques, l'eau était un instrument de puissance politique. L'ordre social, les répressions et les crises politiques dépendaient des caprices de la pluie. Aujourd'hui encore, les contentieux à propos de l'eau sont nombreux à travers le monde, notamment au Nord et au Sud du continent africain, au Proche-Orient, en Amérique Centrale, au Canada, dans l'Ouest des Etats-Unis. Au Proche-Orient par exemple, de nombreux foyers de tension existent. Ainsi l'Egypte, totalement tributaire du Nil pour ses ressources en eau, doit néanmoins partager celles-ci avec dix autres états du bassin du Nil. C'est le cas avec l'Ethiopie, où le Nil Bleu prend sa source et avec le Soudan à travers lequel il serpente. La situation politique de ces deux pays étant aujourd'hui assez chaotique, les contentieux autour de l'eau pourraient éventuellement dégénérer. D'autant que l'Ethiopie, véritable château d'eau du Nil, par les retenues et les prélèvements, certainement nécessaires à son développement, qu'elle pourrait réaliser sur le Nil dans le futur, pourrait rendre caduc le barrage d'Assouan et son agriculture irriguée. Une situation un peu similaire existe également

pour l'Irak et la Syrie, qui sont tous les deux à la merci de la Turquie, car les deux fleuves qui les irriguent, le Tigre et l'Euphrate, prennent leur source en Turquie. Grâce aux nombreux barrages que la Turquie a réalisés sur le cours supérieur de l'Euphrate, lui permettant de réguler le débit en aval, l'état Turc possède là un puissant moyen de pression. Des problèmes existent également entre Israël et ses pays voisins, notamment avec la Jordanie, avec laquelle des accords ont été signés pour l'utilisation des eaux du fleuve Jourdain.

Avec l'essor démographique et l'augmentation des besoins, ces tensions pourraient se multiplier à l'avenir. Malgré tout, on peut aussi penser que la gestion commune de l'eau peut être un facteur de pacification. On peut penser aux accords passés entre Israël et la Jordanie, mais aussi à l'Inde et au Pakistan, qui au plus fort du conflit qui les opposait dans les années 1960, n'ont jamais interrompu le financement des travaux d'aménagement du fleuve Indus qu'ils menaient en commun.

II- DE LA DISTRIBUTION A L'EAU POTABLE

L'eau est une substance indispensable à la pérennité de tous les êtres vivants : hommes, animaux et plantes, tous ont besoin de leur ration quotidienne d'eau. Mais l'eau est également une ressource essentielle au développement des sociétés humaine. Les histoires de l'Homme et de l'eau sont intimement liées. La recherche de points d'eau a longtemps mobilisé les énergies, et les civilisations sont nées sur le cours de grands fleuves. Aujourd'hui encore, la majorité des grands centres urbains sont implantés au bord des cours d'eau.

Des porteurs d'eau à la distribution de l'eau potable à domicile, des aqueducs romains aux usines modernes de traitement des eaux, de la répartition empirique des usages de l'eau par les différents corps de métier à la gestion rationnelle et institutionnalisée des ressources, la conquête de l'eau par l'Homme fut longue ; elle a suivi et structuré l'évolution des sociétés humaines. Grâce à ses propriétés exceptionnelles, l'eau est en effet nécessaire à toutes les activités humaines, ou quasiment. Ses usages se sont d'ailleurs intensifiés et les volumes d'eau utilisés par l'homme ont décuplé depuis le début du XXe siècle [90].

II-1- Histoire de la distribution de l'eau

Les civilisations antiques maîtrisaient un certain nombre de techniques hydrauliques. Au Moyen Age, ce savoir est exploité et enrichi, principalement par les abbayes. Mais les villes, qui connaissent par la suite un développement important, vont être confrontées à des difficultés pour leur approvisionnement en eau.

II-1-1- Panorama des civilisations antiques

Pendant des millénaires, l'humanité a considéré l'eau comme un élément non modifiable de la planète Terre, comme l'air. Dans un monde essentiellement rural, les populations s'alimentaient en eau au niveau des sources, des rivières, des lacs, puis des citernes, pour un coût nul ou très faible.

Les civilisations Egyptiennes et Mésopotamiennes, bâties autour du Nil d'une part, du Tigre et de l'Euphrate d'autre part, expérimentent très tôt l'hydrologie, tournée principalement vers l'irrigation. On trouve la trace des premiers puits en Mésopotamie en 6000 av. J.C. A cette époque, à Jéricho en Israël, on stockait l'eau dans des puits qui étaient utilisés comme des sources. Les hommes ont alors commencé à mettre au point des systèmes de transport de l'eau potable. Le transport s'effectuait grâce à de simples canaux, des digues en sable ou en roche. Les premiers barrages apparaissent en Egypte. Le chadouf, première machine élévatrice d'eau, apparaît au début du deuxième millénaire av. J.C. en Mésopotamie [9].

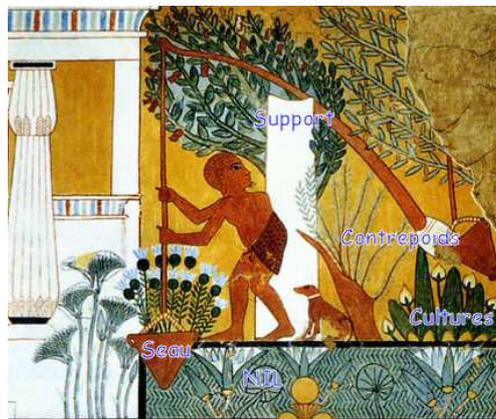


Image 1: Le chadouf Nouvel Empire (vers 1250 av JC) musée du Louvre Fresque de la tombe d'Ipouy à Deir el-Médineh (d'après http://jfbradu.free.fr/egypte/LE_NIL/L'AGRICULTURE/L'AGRICULTURE.php)

En 700 av. J.C., le roi assyrien Sennachérib se fait construire à Ninive un palais desservi par de l'eau de montagne acheminée par un canal de plus de 100 km en pierre étanchéifiée.

Des témoignages de la civilisation de l'Indus (2500-1500 av. J.C.), notamment les sites de Mohenjo-Daro et Harappa au Pakistan, révèlent l'existence de maisons équipées de salles de bain et de latrines, d'un réseau d'égouts, ainsi que de piscines. Il y existait des bains publics avec des installations de chauffage de l'eau [9].



Image 2 : bains publiques à Mohenjo-Daro, Pakistan (d'après <http://www.lenntech.fr/procedes/desinfection/histoire/desinfection/histoire-traitement-eau-potable.htm>)

En 2500 av. J.C., les Crétois mettent au point les premiers ouvrages d'adduction d'eau avec des tuyaux en terre cuite apportant l'eau dans les maisons. Le palais de Cnossos par exemple, bénéficie de l'eau courante et est équipé de fontaines, de salles de bains avec baignoire en terre cuite ainsi que de latrines [9].

Les peuples Perses ont recherché des rivières et des lacs souterrains. L'eau arrivait par des fissures dans les roches jusqu'à des puits situés en plaine.

Durant la période hellénistique, les Grecs inventent la technique du siphon inversé qui permet aux adductions de franchir les vallées. On attribue à Archimède (287-212 av. J.C.) l'invention de la vis comme élément du relevage de l'eau. L'expansion rapide de la population dans les cités grecques a entraîné de nouvelles contraintes. Les Grecs ont dû alors stocker l'eau dans des puits et mettre au point un réseau de distribution de l'eau aux populations. L'eau utilisée était emportée avec les eaux de pluie dans les égouts. Les Grecs furent enfin les premiers à se soucier de la qualité de l'eau. Ils avaient mis au point des bassins aérés pour purifier l'eau [90].

Les Romains s’approvisionnaient en eau grâce aux rivières, aux sources ou aux eaux souterraines. Ils furent les plus grands architectes et constructeurs de réseaux de distribution de l’eau. Au VI^e siècle av. J.C., Tarquin l’ancien équipe Rome de son premier égout. Ils ont construit des barrages dans les fleuves pour former des lacs. Pour le transport de l’eau, des aqueducs furent construits. Ces aqueducs permettent de transporter l’eau sur plusieurs dizaines de milles. En 312 av. J.C., l’aqueduc Aqua Appia apporte l’eau dans la ville de Rome au moyen de canaux maçonnés. Les Romains exploitent et améliorent sans cesse les inventions des peuples qu’ils conquièrent. Au milieu du premier siècle av. J.C., ils adaptent ainsi la noria, sorte de roue à godets servant à élever l’eau, dont le premier exemple connu fonctionnait chez Mithridate, roi du Pont, l’actuel Bosphore [9]. Les Romains furent de grands amateurs de fontaines, de jeux d’eau, de thermes géants. Ils avaient donc une consommation importante d’eau. L’historien Pierre Grimal appelle Rome « la ville de l’eau » car onze aqueducs importants alimentaient la cité à la fin de l’Empire. Sous Trajan (98-117 après J.C.), on estime que l’eau disponible rapportée par habitant atteignait environ 1000 litres par jour, mais ceci sans prendre en compte les pertes énormes du réseau antique.

II-1-2- Histoire de l’eau courante en France

De la période gallo-romaine, il reste de très beaux témoignages de la distribution de l’eau dans les villes. Lyon conserve des vestiges des 250 km d’aqueducs, qui au premier siècle av. J.C., acheminaient quotidiennement à la capitale des Gaules de très grandes quantités d’eau. Le pont du Gard, un des ouvrages du réseau d’alimentation de Nîmes, atteste de façon spectaculaire la maîtrise technique des gallo-romains en matière de distribution d’eau.



Image 3 : Le pont du Gard

Quant aux thermes de Cluny à Lutèce, ou ceux de Saint Bertrand de Comminges, ils signalent une recherche de confort. Nombre d'ouvrages sont détruits ou endommagés lors des invasions barbares.

Après la chute de l'empire romain, les aqueducs ne furent plus utilisés. De 500 à 1500 apr. J.C., il n'y a eu que très peu de développement dans le secteur de la distribution et du traitement de l'eau.

Au Moyen Age, les châteaux forts, les monastères, les fermes ou les villages s'installaient forcément proche d'un point d'eau. L'eau devient nécessaire à un certain développement (agriculture, industrie textile, forges). Les moines cisterciens en particulier, s'illustrent dans la maîtrise des techniques hydrauliques comme la construction de canaux, le détournement de rivière, ou l'assèchement des marais notamment dans la région poitevine [61]. Mais l'essor urbain de la seconde partie du Moyen Age engendre des difficultés d'approvisionnement nouvelles. Les bourgs attirent une population toujours plus importante, l'alimentation en eau des familles se dégrade tant en quantité qu'en qualité et les principes d'hygiène en viennent à être négligés. En fait, dans les villes, bien avant les particuliers, ce sont les activités artisanales qui commandent l'utilisation de l'eau. Les teintureries et les mégisseries par exemple, s'installent au bord des cours d'eau qu'elles souillent en effectuant toutes les opérations nécessaires à leur pratique. Parallèlement, les sources locales deviennent insuffisantes et les puits sont souvent corrompus par les infiltrations. L'absence de réseau d'égouts ne fait que renforcer ce cercle vicieux. Les personnes qui boivent cette eau tombent malades et certaines meurent. Pour résoudre ce problème, les hommes ont commencé à boire de l'eau provenant de l'extérieur de la ville, où les rivières n'étaient pas polluées. Mais l'eau ne parvient pas jusque dans les habitations. Aller à la fontaine est une corvée quotidienne pour les ménages les plus modestes. Les autres, moyennant finance, peuvent se faire livrer à domicile par des porteurs d'eau.

Cependant, bien avant l'avènement des hygiénistes, nombreux sont ceux qui s'intéressent à l'amélioration de l'état de salubrité des populations et rêvent d'une eau saine dans toutes les maisons. Mais les villes manquent de moyens financiers pour effectuer la remise à jour complète de leur système d'approvisionnement. Au début du second Empire cependant, l'arrivée d'Hausmann à la préfecture de Paris agit comme un accélérateur. La capitale se lance dans de grands travaux et à sa suite la plupart des villes réexaminent leur alimentation en eau.

II-1-3- Histoire des traitements de l'eau pour la consommation humaine

Les maladies liées à l'eau, pouvant être d'origine parasitaire, bactérienne, ou virale sont très répandues. L'homme les propage par sa mauvaise hygiène ou par des comportements erronés vis-à-vis de l'eau. On peut citer par exemple, le choléra, maladie bactérienne tristement célèbre en Europe à cause de la pandémie de 1854 qui fit près de 150 000 morts en France. Depuis le XIX^{ème} siècle, sept pandémies mondiales de choléra auront causé la mort de plusieurs millions de personnes en Europe, en Asie, en Afrique et sur le continent américain. C'est une maladie de l'eau souillée et des mains sales.

Dans la deuxième moitié du XIX^e siècle, Pasteur fonde la microbiologie. Il montre le rôle des microbes dans les maladies infectieuses et donc l'importance de l'hygiène. Son affirmation : "nous buvons 90 % de nos maladies", institue une nouvelle définition de l'eau potable et ouvre la voie aux traitements.

II-1-3-1- Louis Pasteur

Longtemps, le jugement sur la qualité d'une eau s'est fondé sur des critères organoleptiques. Des notions empiriques font préférer au Parisien du XVIII^{ème} siècle l'eau de la Seine qu'il juge bonne car « aérée » par le courant du fleuve.

Pasteur va démontrer que les phénomènes de putréfaction et de fermentation sont causés par des êtres vivants et qu'à chaque fermentation correspond une catégorie particulière de micro-organismes. D'autre part, ceux-ci ne naissent pas spontanément, mais leurs germes sont éparpillés dans l'atmosphère et se déposent avec les poussières. En matière d'hygiène publique, cela va changer radicalement la perception du propre et du sale et des mesures sanitaires rigoureuses seront prises, notamment en matière de distribution des eaux. Avec les découvertes de Pasteur, on comprend qu'une eau fraîche, limpide et sans saveur, n'est pas forcément bonne à boire. À partir de cette idée, se développent les traitements de désinfection. En 1855, est créé le premier indice de la qualité de l'eau.

II-1-3-2- A l'origine : la filtration

Dans la deuxième moitié du XVIII^{ème} siècle étaient apparus des filtres domestiques. Un inventeur, Amy, commercialisa à Paris des fontaines filtrantes individuelles sur couche de

sable et éponges. Durant tout le XIX^e siècle, différents modèles sont proposés au public. Le filtre Chamberland, inventé en 1884 lors d'une épidémie de typhoïde à Paris par un assistant de Louis Pasteur, va rencontrer un grand succès. Il est conçu à partir d'une bougie de porcelaine poreuse de son invention, permettant d'éliminer les microbes de l'eau de boisson. Malgré tout, à la fin du XIX^e siècle, l'ébullition apparaît encore comme le moyen le plus sûr d'éliminer les microbes. Mais tous ces procédés ne peuvent s'appliquer qu'à de petites quantités, et supposent du moins pour les filtres, un entretien rigoureux. L'apparition des réseaux de distribution et l'augmentation de la consommation amènent les élus à réfléchir à des systèmes de filtration centralisés. À partir de la seconde moitié du XVIII^e siècle, Paris avait équipé ses fontaines publiques de systèmes de filtration [61]. Des projets d'installation de bateaux filtrants sur la Seine avaient même été présentés à la cette époque. Mais à partir de la fin du XIX^e siècle, l'augmentation des besoins, consécutive de l'arrivée de l'eau dans les habitations, conjuguée avec un afflux de population vers la capitale, nécessite de compléter encore le volume des ressources et de réintroduire régulièrement de l'eau de Seine dans le réseau domestique. Les procédés jusque-là utilisés ne sont plus adaptés. Le principe de grands bassins filtrants sur sable ou charbon, connu depuis l'Antiquité, fut alors remis au goût du jour. Les Anglais vont redécouvrir la filtration sur sable au milieu du XIX^e siècle, et généralisent cette filtration lente pour les eaux de la Tamise. Ce n'est qu'en 1896, après l'épidémie de choléra de 1892 et l'adaptation efficace du procédé par la Générale des Eaux, que la ville de Paris entreprend la construction de bassins filtrants dans son usine de Saint Maur qu'elle convertit en usine d'eau potable, alors qu'elle produisait jusque là de l'eau réservée au service du nettoyage des rues. En 1900, l'installation d'Ivry subit la même transformation en prévision de l'Exposition Universelle [90].

La situation sanitaire de Paris s'améliore, mais les années 1898, 1899 et 1900 subissent chacune une épidémie de fièvre typhoïde. Pourtant les procédés de filtration progressent. En 1898, on fait précéder la filtration par une étape de décantation. En 1900, ces décanteurs sont remplacés par des préfiltres. Le procédé Anderson, éprouvé dès 1890 par la Générale des Eaux en banlieue de Paris, améliore encore très sensiblement la qualité des eaux traitées. Il s'appuie sur la coagulation des particules en suspension, par ajout de sels de fer. Les réactions annexes provoquées par le métal dépassent le simple procédé physique. Cependant, sa mise en œuvre s'avère trop délicate et il n'est pas retenu par d'autres exploitations. Cette méthode oubliée préfigure pourtant les procédés contemporains de traitements.

II-1-3-3- L'avènement des techniques de désinfection

Au cours du XIX^e siècle, l'idée de l'emploi de produits chimiques pour purifier l'eau se développe. L'acide citrique, ou des oxydants comme l'iode et les permanganates, sont efficaces pour éliminer les microbes et les bactéries, mais sont le plus souvent cantonnés à des utilisations médicales. Cela est dû à leur prix élevé, mais aussi à la répugnance du grand public vis-à-vis de l'emploi de produits chimiques dans l'eau. L'hypochlorite de sodium, oxydant connu depuis le XVIII^e siècle est également utilisé comme désinfectant en médecine ou pour blanchir le linge. Koch démontre en 1881 qu'il détruit le germe responsable du choléra. Or son utilisation est facile, on peut le produire sur place et à bas prix. De surcroît on découvre qu'il a un effet rémanent dans les canalisations. La première chloration des eaux de Paris a lieu en 1911 [61]. Le spectre des épidémies est désormais écarté. L'emploi de chlore gazeux ou verdunisation, mis au point pendant la première guerre mondiale, permet de réduire les doses utilisées et ainsi d'améliorer le goût.

La ville de Nice, quant à elle, fait à partir de 1907 un autre choix pour désinfecter son eau, avec l'ozonation [90]. Le gaz ozone, puissant oxydant, est produit à partir d'ozoneurs, selon une technique mise au point par Maurice Paul Otto. Ce procédé connaît un succès certain. En 1909, Paris décide d'en équiper l'usine de Saint Maur. Mais après guerre, l'augmentation du prix de l'électricité et la relative complexité de mise en place de ce procédé font que l'ozonation perd du terrain sur le plan industriel. Il réapparaîtra dans les années 1950. Le chlore, quant à lui, s'impose définitivement. Aujourd'hui encore, 99% des usines de production d'eau potable l'utilisent.

II-1-3-4- Les traitements du XX^e siècle

Dans les années 1950, lors de la reconstruction, les grandes agglomérations qui prévoient une augmentation de leur population adoptent la filtration rapide sur sable. Elle permet de répondre à l'augmentation de la demande de l'eau potable et nécessite une emprise au sol bien inférieure à la filtration lente. Le dioxyde de chlore commence à être utilisé. Plus cher que le chlore, il est également plus performant en termes de goût. L'ozone également, est réintroduite dans les filières de traitement d'eau potable.

Une nouvelle étape est franchie dans les années 1970 avec la mise au point des filières de traitement biologique. Ces dernières utilisent des bactéries cultivées pour se nourrir des

substances indésirables. Elles peuvent s'attaquer aux nouvelles pollutions des ressources en eau. Les charbons actifs trouvent également de nouvelles applications dans la chaîne de traitement.

Enfin, au cours des années 1990, apparaît la filtration membranaire. Il s'agit d'un tamisage extrêmement fin : l'eau passe au travers de membranes criblées de trous d'un diamètre allant du micromètre au nanomètre.

III- L'ASSAINISSEMENT DES EAUX USEES

III-1- Histoire de l'assainissement des eaux usées

Au fur et à mesure de la croissance des grandes villes, l'évacuation des eaux usées pose des difficultés techniques et surtout matérielles de plus en plus aigües. Il faut attendre la fin du XIX^e siècle pour qu'une politique volontariste de construction d'infrastructures s'impose. L'idée des traitements des eaux usées est encore plus longue à se mettre en place.

III-1-1- Le temps du cloaque

L'évacuation des eaux usées est un problème qui préoccupe les villes depuis leur origine. Les grandes civilisations de l'Antiquité connaissent déjà des systèmes d'évacuation très perfectionnés. On citera le modèle romain de la *Cloaca maxima*, dont la construction fut entreprise par Tarquin l'Ancien (VII^e – VI^e siècle av. J.-C.), qui déverse dans le Tibre les eaux usées de la métropole. Le but de cet égout était à l'origine de drainer la plaine marécageuse sur laquelle se fonde la ville de Rome [91]. Ce grand cloaque, à l'air libre à l'origine, fut probablement l'un des premiers égouts de l'histoire. Il fut complété sous la République par la *Cloaca* du Circus Maximus et la *Cloaca* du Champs de Mars. Les Romains couvrirent leur réseau d'égouts pour des raisons d'odeurs et de salubrité, Rome étant la proie de fréquentes épidémies. Il faut néanmoins garder à l'esprit que la totalité d'une ville n'était pas forcément desservie par un système d'égouts complet. Ceux-ci pouvaient exister dans un quartier mais pas dans un autre [9].

L'idée qui prévaudra jusqu'au XIX^e siècle est d'éloigner les effluents le plus rapidement possible des cités pour éviter les inondations et les épidémies. On ne parle pas encore de traitement pour les eaux usées.

Le Moyen Age n'ignore pas ces principes. L'abbaye de Royaumont par exemple, présente un ingénieux système d'évacuation de ses eaux usées : le bâtiment des latrines des moines était un élément utilitaire situé en marge des principaux bâtiments de la vie monastique. Il est composé de deux vastes pièces situées de part et d'autre d'un canal. Des latrines étaient aménagées au premier étage, communiquant avec le dortoir, et s'évacuaient dans le canal. Les Hospices de Beaune utilisent également le courant du ruisseau sur lequel ils sont édifiés pour évacuer leurs effluents. Certaines abbayes comme Fontenay sont équipées du tout-à-l'égout. Beaucoup d'abbayes se trouvant au fond de vallées, il faut évacuer efficacement les eaux de pluie : un collecteur, nettoyé en permanence par l'eau d'une digue barrant la vallée, passe sous la cuisine et les latrines, et reçoit toutes les eaux usées provenant de canalisations secondaires issues des différents bâtiments. Dans les abbayes de Cleeve ou Tintern au Royaume-Uni, les égouts très larges contiennent des vannes qui permettent de lâcher un grand volume d'un coup et de les purger à la manière d'une chasse d'eau [91].

Mais dans les grandes villes au développement plus anarchique, ces notions de salubrité sont souvent négligées, et certainement bien plus difficiles à mettre en œuvre vu la population très nombreuse s'y rassemblant. D'autant que les déjections ont une valeur économique. Elles sont vendues comme engrais. D'autre part, l'urine en s'infiltrant dans la terre, vient se déposer sur le mur des caves sous forme de salpêtre qui est utilisé pour fabriquer la poudre à canon. Les maisons en ville disposent au mieux de latrines reliées à une fosse qui doit être vidangée régulièrement. Dans les quartiers bas, plus pauvres, elles font souvent défaut. De plus, à cette époque, tous les déchets domestiques solides et liquides sont jetés dans la rue et dispersés au hasard. S'ajoutant à cela l'absence générale d'égouts, les rues offrent le plus souvent un spectacle répugnant. Pour se protéger des chutes d'immondices divers, les plus riches utilisent un carrosse. Les gens aisés utilisent la chaise à porteur pour ne pas salir leurs chaussures ou le bas de leur vêtement dans le cloaque que sont alors les rues. Cette situation dure globalement jusqu'au XVIII^e siècle. Les épidémies en ville sont fréquentes : peste, choléra et typhus tuent des milliers de personnes chaque année en Europe [61].

III-1-2- Des égouts pour assainir les villes

Pourtant, nombreux sont les observateurs qui établissent une relation entre les maladies et la mauvaise évacuation des eaux usées. Il faut cependant attendre 1843 pour voir apparaître en Allemagne, le premier réseau d'assainissement moderne. Il est créé à Hambourg à l'occasion de la reconstruction de la ville à la suite d'un incendie. C'est lors de la seconde moitié du XIXe siècle que s'élabore la conception moderne de l'assainissement. John Snow découvrit la véritable origine hydrique du choléra lors de l'épidémie de 1854 à Londres [90]. Le mouvement hygiéniste, né en Angleterre, préconise alors de collecter les eaux urbaines et de les mener, par des canalisations enterrées, jusqu'à des sites de rejets en milieu naturel. C'est l'importante contamination de Londres, en 1858, qui amène ensuite le gouvernement à décider de la construction du réseau des égouts de la capitale anglaise. En France, l'impulsion est donnée par Haussmann qui sous le Second Empire, entreprend d'équiper Paris d'un réseau complet d'égouts. Mais cette évolution pour le reste de la France est lente. En 1907, sur 616 villes de plus de 5 000 habitants, 294 n'ont pas de réseau d'égouts. En 1960, 12 % seulement des Français sont reliés au tout-à-l'égout [90].

III-1-3- De l'assainissement des villes à l'assainissement de l'eau

Les villes ont été assainies par la réalisation de réseaux d'égouts destinés à recevoir et à transporter l'ensemble des eaux, y compris les eaux pluviales. Le tout-à-l'égout est donc un réseau unitaire aux larges dimensions qui a amélioré les conditions de vie des villes et qui les a protégées des inondations. La croissance continue de l'urbanisation (accroissement démographique et développement industriel) a engendré une dégradation importante des milieux naturels qui se trouvaient en aval des sites de rejet de ces réseaux. La nécessité d'assainir les eaux usées des villes avant leur restitution au milieu a donc fini par s'imposer. On est alors passé d'une logique de l'éloignement de l'eau usée à une logique de collecte et de traitement de cette eau.

Le traitement des eaux usées connaît d'importants progrès. A l'origine, les effluents sont souvent rejetés sans traitement dans la nature. Puis plus tard, ils sont épandus pour servir d'engrais. En 1940, la mise en service de la première tranche de la station d'Archères en région parisienne, utilisant les techniques des boues activées et du lit bactérien inaugure l'ère de la station d'épuration et des traitements plus rigoureux [90]. Il faut néanmoins attendre les

années 1960, pour que le programme d'installation des stations d'épuration prenne son essor. Entre temps les eaux superficielles se sont beaucoup dégradées. La loi sur l'eau du 16 décembre 1964, en instituant les six agences de l'eau accélère l'action en faveur de la préservation des ressources, qui depuis n'a cessé de s'amplifier.

III-1-4- L'exemple de Paris

III-1-4-1- Jusqu'au second Empire

Très tôt, les rois essayent d'imposer des règles d'hygiène à la capitale. Philippe Auguste ordonne le pavement des rues et fait creuser une rigole en leur milieu afin d'éviter que les eaux ne stagnent. Celles-ci sont entraînées vers la Seine, la Bièvre ou encore dans les fossés qui entourent les fortifications. Une ordonnance de 1350 enjoint la population de faire ôter les boues de devant sa maison. En 1539, un édit de François Premier sur l'entretien des rues de Paris, oblige entre autres les propriétaires à faire installer des fosses d'aisance pour chaque habitation et à faire procéder à leur vidange régulière sous peine d'amende. Les rigoles creusées dans la chaussée ne doivent recueillir que les eaux de pluies et les eaux ménagères [61]. Sous l'ancien régime également, plusieurs égouts sont construits. Le premier, en 1374, va de la colline de Montmartre à Ménilmontant. En 1740, un ouvrage de plus de six Km de long recueille les eaux usées du quartier du Marais [61]. La situation n'est cependant guère satisfaisante puisqu'ils sont souvent engorgés. Dans les rues où la pente est insuffisante, les habitants vivent dans un état d'insalubrité permanente, d'autant que les rigoles creusées dans la chaussée, censées ne recueillir que les eaux de pluie et les eaux ménagères, drainent souvent les déjections alvines de riverains peu scrupuleux.

III-1-4-2- Sous le second Empire

Sous Louis-Philippe, on adopte la chaussée bombée dotée de caniveaux latéraux et on multiplie la construction d'égouts. Mais la situation sanitaire est probablement pire qu'avant la Révolution, puisqu'en 1853, à l'arrivée d'Hausmann à la préfecture de la Seine, Paris a doublé sa population depuis 1789 et abrite plus d'un million d'habitants. La capitale française est bien en retard par rapport à sa rivale anglaise, que l'empereur considère à plusieurs égards comme le modèle de la cité moderne [61].

Sous Haussmann, l'eau et l'assainissement n'échapperont pas à la grande entreprise de réorganisation de Paris. En 1853, l'ingénieur Belgrand est chargé du programme de construction d'un réseau complet d'égouts, selon des principes qui perdurent encore aujourd'hui. A sa mort en 1878, le réseau atteint déjà 600 km. Il ne sera achevé qu'après la seconde guerre mondiale et atteindra alors plus de 2000 km de long. C'est à ce moment que cessera définitivement l'activité des vidangeurs à Paris. Parallèlement, un décret de loi de 1852, stipule que dans un délai de 10 ans « toute construction nouvelle dans une rue pourvue d'égouts devra être disposée de manière à y conduire ses eaux pluviales et ménagères », les matières de vidange sont encore exclues de ces dispositions. Leur évacuation vers les égouts sera autorisée deux ans plus tard. Enfin la loi du 10 juillet 1894 impose dans un délai de trois ans, le système du tout-à-l'égout à tous les propriétaires.

Les effluents parisiens sont alors acheminés par d'immenses collecteurs et déversés dans la Seine en aval. Mais ce flux nauséabond, en constante augmentation, entraîne les protestations des riverains. D'autres voix s'élèvent, mais pour protester contre la perte d'un excellent fertilisant. En 1869, les ingénieurs Mille et Durand-Claye entreprennent des essais d'épandage dans la plaine de Gennevilliers qui s'avèrent concluants. Des terrains plus vastes, situés à Archères sont choisis pour pérenniser l'expérience. Le principe de traitement des eaux usées fait son chemin, mais il faut attendre 1935 pour que soit entreprise la construction d'une station d'épuration sur ce site.

III-2- L'assainissement des eaux usées aujourd'hui

Il ne faut pas confondre le traitement des eaux, qui a pour fonction de les transformer en eau potable, et l'assainissement des eaux usées rejetées par le consommateur après utilisation. L'assainissement des eaux usées a pour objectif de collecter puis d'épurer les eaux usées avant de les rejeter dans le milieu naturel, afin de les débarrasser de la pollution dont elles sont chargées.

III-2-1- A quoi sert l'assainissement

L'assainissement des eaux usées est devenu un impératif pour nos sociétés modernes. En effet, le développement des activités humaines s'accompagne forcément d'une augmentation de la production de rejets polluants. Les ressources en eau ne sont pas

inépuisables. Leur dégradation, sous l'effet des rejets d'eaux polluées, peut non seulement détériorer gravement l'environnement, mais aussi entraîner des risques de pénurie. La France dispose de ressources en eau suffisantes pour satisfaire nos besoins en quantité. C'est dans la détérioration de leur qualité que réside le risque. Trop polluées, nos réserves d'eau pourraient ne plus être utilisables pour produire de l'eau potable, sinon à des coûts très élevés, du fait de la sophistication et la complexité des techniques à mettre en œuvre pour en restaurer la qualité. C'est pourquoi il faut « nettoyer » les eaux usées pour limiter le plus possible la pollution de nos réserves en eau (lacs, rivières et nappes souterraines). Le grand chantier de l'après-guerre a consisté à mettre l'eau potable à disposition de tous. Le grand défi contemporain est celui de l'assainissement.

III-2-1-1- Préserver la ressource

Aujourd'hui on prend conscience que les ressources en eau ne sont pas inépuisables. Il est vrai qu'en France, du point de vue quantitatif, l'approvisionnement en eau (précipitations notamment) écarte tout risque majeur de pénurie. Mais la qualité de la ressource doit faire l'objet d'une surveillance constante. Les ressources en eau sont classées en catégories de qualité, et celles qui ne répondent pas à certaines normes sont exclues de la production d'eau potable. La pollution peut par ailleurs perturber la production d'eau potable et en augmenter considérablement le prix de revient.

III-2-1-2- Préserver le patrimoine naturel

Les cours d'eau ont une capacité naturelle d'épuration. Mais cette capacité a pour effet de consommer l'oxygène de la rivière et n'est pas sans conséquences sur la flore et la faune aquatiques. Lorsque l'importance du rejet dépasse les capacités d'autoépuration de la rivière, la détérioration de l'environnement peut être durable. Les zones privées d'oxygène par la pollution voient leur faune et leur flore périr. La présence excessive de phosphates, en particulier, favorise le phénomène d'eutrophisation, c'est-à-dire la prolifération de végétaux aquatiques tels que certaines algues qui nuisent à la faune aquatique, pouvant rendre la baignade dangereuse et perturber la production d'eau potable.

L'assainissement a pour fonction de préserver la qualité de la vie sur les lieux mêmes où nous vivons parce qu'il joue un rôle important dans la protection sanitaire de la population.

Grâce au traitement des eaux usées, les rivières ne se transforment pas en égouts. Des traitements encore plus complets limitent la contamination des eaux de baignade par des virus ou des bactéries qui peuvent propager des maladies. De plus, il contribue d'une façon décisive à maintenir la qualité de l'environnement et des activités liées à l'eau, qu'il s'agisse de tourisme (rivières, lacs, sites de pêche...) ou de pisciculture, sans oublier que l'agriculture et l'industrie ont aussi besoin d'eau pour assurer leur développement. Un assainissement des eaux efficace contribue à la qualité de notre vie dans tous ses aspects.

III-2-2- Que sont les eaux usées

On distingue trois grandes catégories d'eaux usées : les eaux domestiques, les eaux industrielles et les eaux pluviales.

III-2-2-1- Les eaux usées domestiques

Elles proviennent des différents usages domestiques de l'eau. Elles sont essentiellement porteuses de pollution organique. On distingue les eaux ménagères, qui ont pour origine l'eau de cuisine et des salles de bain, et sont généralement chargées de détergents, de graisses, de solvants et de débris organiques, et les eaux-vannes [90]. Les eaux-vannes font référence aux sous-produits de la digestion comme les matières fécales et l'urine. Il s'agit alors des rejets des toilettes, chargées de diverses matières organiques azotées et de germes fécaux.

III-2-2-2- Les eaux industrielles

Elles sont très différentes des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques, des hydrocarbures. Certaines d'entre elles doivent faire l'objet d'un prétraitement par les industries qui les ont générées, avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte. Elles ne sont mêlées aux eaux domestiques que lorsqu'elles ne représentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des usines de dépollution [90].

III-2-2-3- Les eaux pluviales

Elles peuvent, elles aussi, constituer une cause de pollution importante des cours d'eau, notamment pendant les périodes orageuses. L'eau de pluie se charge d'impuretés au contact de l'air (fumées industrielles responsables des pluies acides), puis en ruisselant, de résidus déposés sur les toits et les chaussées des villes (huile de vidange, carburants, résidus de pneus et métaux lourds...). En outre, lorsque le réseau est dit unitaire, les eaux pluviales sont mêlées aux eaux usées domestiques. En cas de fortes précipitations, les contraintes de préservation des installations d'épuration peuvent imposer un déversement (délestage) de ce mélange très pollué dans le milieu naturel. Enfin dans les zones urbaines, les surfaces construites rendent les sols imperméables, et ajoutent le risque d'inondation à celui de pollution.

III-2-3- La collecte des eaux usées

Le réseau d'assainissement des eaux usées d'une agglomération a pour fonction de collecter ces eaux pour les conduire à une station d'épuration. La collecte s'effectue par l'évacuation des eaux usées domestiques (et éventuellement industrielles ou pluviales) dans les canalisations d'un réseau d'assainissement appelées aussi collecteurs. Le transport des eaux s'y déroule généralement par gravité. Il peut parfois s'effectuer par refoulement, sous pression ou sous dépression. Divers ouvrages, en amont, le protègent contre l'intrusion de matières indésirables : citons les « boîtes à graisses » sur les branchements des restaurants ou les séparateurs à hydrocarbures dans les stations-service ou dans les aéroports.

III-2-3-1- Réseaux séparatifs ou unitaires

Il existe deux types de réseau de collecte. Les réseaux unitaires qui évacuent dans les mêmes canalisations les eaux usées domestiques et les eaux pluviales. Ils cumulent les avantages de l'économie (un seul réseau à construire et à gérer) et de la simplicité (toute erreur de branchement est exclue par définition). Mais ils nécessitent de tenir compte des brutales variations de débit des eaux pluviales dans la conception et le dimensionnement des collecteurs et des ouvrages de traitement. La régulation du flux, lorsque les eaux usées et les eaux pluviales sont mélangées, est assurée par des équipements destinés à retenir

temporairement des arrivées d'eau importantes et soudaines. Elle permet de ne pas perturber le bon fonctionnement des stations d'épuration et de limiter les risques d'inondation.

Les réseaux séparatifs, plus modernes, collectent les eaux usées domestiques dans un réseau, et les eaux pluviales dans un autre. Ce système a l'avantage d'éviter le risque de débordement d'eaux usées dans le milieu naturel en cas de fortes pluies. Il permet de mieux maîtriser le flux et sa concentration en polluants et de mieux adapter la capacité des stations d'épuration.

III-2-3-2- Les réseaux de collecte en France

La France possède plus de 180 000 km de canalisations et 21 500 communes sur 36 000 ont un réseau de collecte des eaux usées [90]. Ce dispositif permet aujourd'hui de raccorder à l'égout 79% de la population française. 19 % des Français sont parallèlement munis de dispositifs d'assainissement autonomes, 2% des Français n'étant ni raccordés ni équipés d'installations autonomes.

Cependant, notre « taux de collecte » (proportion de la pollution brute effectivement amenée à une station d'épuration) ne s'élève qu'à 68%. Ce constat peut s'expliquer par la vétusté de certains réseaux qui entraîne des fuites, ou encore par des erreurs de branchements en zone de collecte séparative. Ce constat met en évidence les efforts qu'il est nécessaire de faire en matière de collecte.

III-2-3-3- L'entretien du réseau

Les canalisations transportant en permanence des eaux chargées, il est inévitable qu'elles s'encrassent. Elles sont également menacées par l'érosion et la corrosion. Elles font donc l'objet de visites et de curages périodiques. L'entretien des ouvrages annexes comprend notamment le curage des bouches d'égout, l'entretien des bassins de retenue, des déversoirs d'orage, des postes de relèvement des eaux usées et des branchements. Une exploitation efficace du réseau suppose un travail d'entretien rigoureux et permanent du personnel qualifié du service d'assainissement.

III-2-4- Les traitements des eaux usées

Les eaux usées d'une agglomération sont d'abord collectées par le réseau d'assainissement et sont acheminées vers une station d'épuration où elles subissent plusieurs phases de traitement. Le but de ces différents traitements est de diminuer suffisamment la quantité de substances polluantes contenues dans les eaux usées pour que l'eau finalement rejetée dans le milieu naturel ne dégrade pas ce dernier. Le nettoyage des eaux usées obéit donc à une logique de préservation des ressources en eau et de protection de l'environnement.

III-2-4-1- Les objectifs d'épuration des eaux usées

Les objectifs épuratoires sont fixés par la directive européenne 91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux résiduaires urbaines, et le décret 94-469 du 3 juin 1994.

On définit trois critères pour mesurer les matières polluantes contenues dans les eaux usées :

- Les matières en suspension (MES) exprimées en mg/L. Ce sont les matières non dissoutes contenues dans l'eau. Elles comportent à la fois des éléments minéraux et organiques.

- La demande biologique en oxygène (DBO), exprimée en mg d'oxygène par litre. Ce paramètre mesure la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction des matières organiques grâce aux phénomènes d'oxydation par voie aérobie. Pour mesurer ce paramètre, on prend comme référence la quantité d'oxygène consommée au bout de 5 jours. C'est la DBO₅, demande biochimique en oxygène sur 5 jours.

- La demande chimique en oxygène (DCO), exprimée en mg d'oxygène par litre. Elle représente la teneur totale de l'eau en matières oxydables. Ce paramètre correspond à la quantité d'oxygène qu'il faut fournir pour oxyder par voie chimique ces matières [94].

Il est important également de surveiller les rejets d'azote et de phosphore. En effet, lorsqu'ils sont présents en trop forte concentration, ils contribuent largement au phénomène d'eutrophisation des rivières et des lacs. Cette fragilité du milieu naturel a été prise en compte par la réglementation avec la notion de zones sensibles. Les zones sensibles comprennent tous les milieux aquatiques concernés par les phénomènes d'eutrophisation, mais aussi les eaux

douces superficielles qui doivent être spécialement protégées pour demeurer aptes à la production d'eau potable, et les zones pour lesquelles un traitement est nécessaire pour des raisons sanitaires (élevage de coquillages, lieux de baignade).

Pour quantifier globalement les matières polluantes contenues dans les eaux usées, on utilise comme unité de mesure l'équivalent habitant (EH). Il permet de quantifier la pollution émise par une agglomération à partir de la population qui y réside et des autres activités non domestiques. Un équivalent habitant représente une DBO5 de 60g d'oxygène par jour [94].

La réglementation fixe des exigences épuratoires et demande un rendement d'épuration minimum qui varie selon la taille de l'agglomération. Le rendement d'épuration correspond à la proportion de matière polluante éliminée par la station d'épuration. Les performances épuratoires demandées sont présentées dans le tableau suivant.

Taille de la commune ou de l'agglomération	Charge correspondante (en DBO5/j)	Concentrations maximales (en mg/L)			Rendement minimal (en %)		
		DCO	DBO5	MES	DCO	DBO5	MES
<2000 EH (arrêté du 21 juin 1996)	< 120 kg		35		60	60	
2000-10000 EH (arrêté du 22 décembre 1994)	120-600 kg	125	25	35	75	70	90
>10000 EH (arrêté du 22 décembre 1994)	> 600 kg	125	25	35	75	80	90

Tableau 2 : Performances épuratoires [94]

Lorsque les rejets ont lieu dans des zones sensibles à l'eutrophisation, les valeurs indiquées ci-dessus sont complétées par des exigences épuratoires sur l'azote et le phosphore. Elles sont présentées dans le tableau suivant.

Zone sensible	Charge correspondante (en DBO5/j)	Concentrations maximales (en mg/L)	Rendement minimal (en %)
Azote	> 600 kg	15	70
	> 6000 kg	10	
Phosphore	> 600 kg	2	80
	> 6000 kg	1	

Tableau 3: Performances épuratoires en zone sensible [94]

III-2-4-2- Les étapes et procédés de traitement des eaux usées

Le transport des eaux usées dans les collecteurs se fait généralement par gravité. Une station de relèvement permet d'acheminer les eaux usées dans la station d'épuration lorsque ces dernières arrivent à un niveau plus bas que les installations de dépollution. Cette opération de relevage s'effectue grâce à des pompes ou à des vis d'Archimède.

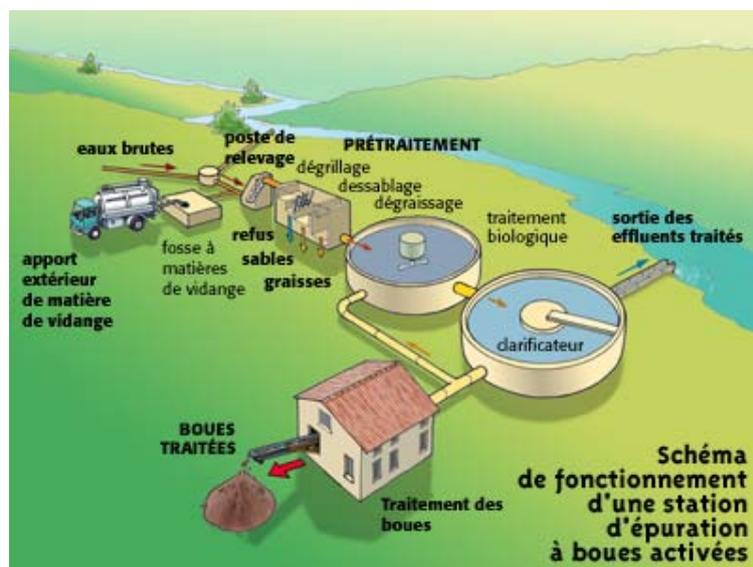


Figure 4 : Schéma de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées (d'après <http://www.ademe.fr/partenaires/boues/pages/f14.htm>)

III-2-4-2-1- Les prétraitements

Les prétraitements ont pour objectif d'éliminer les éléments les plus grossiers, qui sont susceptibles de gêner les traitements ultérieurs et d'endommager les équipements. Il s'agit des déchets volumineux (dégrillage), des sables et graviers (dessablage) et des graisses (dégraissage-déshuilage).

Au cours du dégrillage, les eaux usées passent au travers d'une grille dont les barreaux retiennent les matières en suspension les plus volumineuses (de 1 à 10 cm). Le tamisage, analogue d'un dégrillage, permet de compléter cette phase de prétraitement en utilisant des grilles dont l'espacement est plus réduit.

Le dessablage, par sédimentation, va permettre de débarrasser les eaux usées des sables, graviers et autres particules minérales plus ou moins fines, qu'elles contiennent et qui pourraient endommager les installations en aval. L'écoulement de l'eau à vitesse réduite dans un bassin appelé dessableur entraîne leur dépôt au fond de l'ouvrage. Ces particules sont ensuite aspirées par une pompe. Les sables récupérés sont essorés, puis lavés avant d'être soit envoyés en décharge, soit réutilisés, selon la qualité du lavage.

Le dégraissage vise à éliminer la présence de graisses dans les eaux usées, graisses qui peuvent gêner l'efficacité des traitements biologiques qui interviennent par la suite. Le dégraissage s'effectue par flottation, les graisses ayant une densité inférieure à l'eau. L'injection d'air au fond de l'ouvrage facilite la remontée des corps gras en surface. Les graisses sont raclées à la surface, puis stockées, avant d'être éliminées (mise en décharge ou incinération). Elles peuvent aussi faire l'objet d'un traitement biologique spécifique au sein de la station d'épuration.

III-2-4-2-2- Le traitement primaire

Le traitement primaire fait appel à des procédés physiques, avec décantation plus ou moins aboutie, éventuellement assortie de procédés physico-chimiques, tels que la coagulation-floculation. Ce traitement permet de retirer des eaux usées les matières décantables qu'elles contiennent encore. Dans ce cas, la séparation qui s'effectue par gravité ne concerne que les particules de diamètre supérieur à 100 microns. Celles d'un diamètre inférieur ne décantent pas et seront entraînées vers les unités ultérieures de traitement.

La décantation primaire classique consiste à séparer les éléments solides et liquides sous l'effet de la pesanteur. Les matières solides se déposent au fond d'un ouvrage appelé décanteur pour former les boues primaires. Ce traitement élimine 50 à 55% des matières en suspension et réduit d'environ 30% la DBO et la DCO.

L'utilisation d'un décanteur lamellaire permet d'accroître le rendement de la décantation. Ce type d'ouvrage comporte des lamelles parallèles inclinées, ce qui augmente la surface de décantation, et accélère le processus de dépôt des particules. Une décantation lamellaire permet d'éliminer plus de 70% des matières en suspension et diminue de 40% la DBO et la DCO.

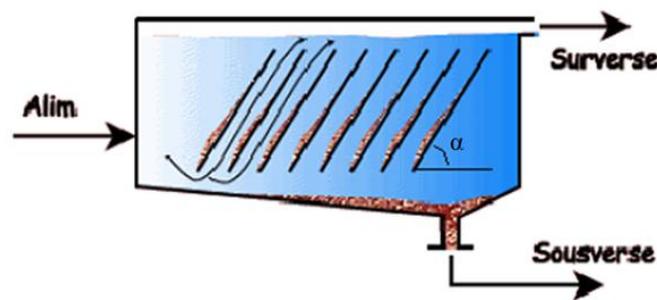


Figure 5 : Schéma d'un décanteur lamellaire (d'après <http://hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0910/bei/beiere/groupe3/node/118>)

La décantation est encore plus efficace quand elle s'accompagne d'une floculation préalable. La coagulation-floculation permet d'éliminer 90% des matières en suspension et de diminuer de 75% la DBO. Cette technique comporte une première phase d'ajout d'un réactif, qui provoque l'agglomération des particules en suspension, puis une accélération de leur chute au fond de l'ouvrage.

Les matières décantables ainsi obtenues, les boues primaires, sont récupérées et orientées vers le traitement des boues. Au terme de ce prétraitement essentiellement mécanique, les eaux usées sont dépourvues de la quasi totalité des particules en suspension qu'elles contenaient et peuvent subir le traitement biologique.

III-2-4-2-3- Les traitements secondaires : l'élimination biologique des matières polluantes

Les traitements biologiques reproduisent, artificiellement ou non, les phénomènes d'auto-épuration existant dans la nature. L'auto-épuration regroupe l'ensemble des processus par lesquels un milieu aquatique parvient à retrouver ses qualités d'origine après une pollution. Les techniques d'épuration biologique utilisent l'activité des bactéries présentes dans l'eau qui dégradent les matières organiques. Ces techniques sont soit anaérobies, soit aérobies.

Les procédés biologiques extensifs :

On parle aussi de lagunage. Il utilise la capacité épuratrice de plans d'eau peu profonds. Les eaux usées sont envoyées dans des bassins. L'oxygène est apporté par les échanges avec l'atmosphère au niveau du plan d'eau, et par l'activité de photosynthèse des microalgues de surface. La pollution organique se dégrade sous l'action des bactéries présentes dans le plan d'eau. Le rayonnement solaire détruit en outre certains germes. L'effluent prétraité séjourne dans ces bassins pendant une durée de plusieurs semaines à plusieurs mois (60 jours en moyenne). Ce mode d'épuration permet d'éliminer 80 à 90% de la DBO, 20 à 30 % de l'azote, et contribue à une réduction très importante des germes. Il a cependant l'inconvénient d'utiliser de très grandes surfaces et de ne pas offrir des rendements constants durant l'année. Il est surtout bien adapté aux communes rurales [94].

Les procédés biologiques intensifs :

Ils regroupent toute une série de techniques qui ont en commun le recours à des cultures bactériennes qui consomment les matières polluantes.

Les installations à boues activées fonctionnent selon le principe des cultures libres, c'est-à-dire que la culture bactérienne est maintenue en suspension dans le courant des eaux usées à traiter. Il s'agit d'un système d'épuration aérobie. La culture bactérienne est maintenue dans un bassin aéré et brassé. Un système d'aération permet à la fois d'apporter l'oxygène nécessaire à l'épuration et de brasser les eaux usées. Ce brassage est indispensable pour homogénéiser le mélange et éviter les dépôts. Les matières organiques contenues dans l'eau se transforment en carbone (sous forme de CO₂) sous l'action des bactéries. Les résidus ainsi formés, contenant ce stock de bactéries, sont appelés boues. Après un temps de séjour

dans ce bassin d'aération, l'effluent est envoyé dans un clarificateur, appelé aussi décanteur secondaire. L'eau épurée est ainsi séparée des boues par décantation. Ensuite les boues sont envoyées dans une unité de traitement spécifique, en vue de leur épandage agricole ou de leur élimination, soit réinjectées pour partie dans le bassin d'aération. On qualifie cette opération de « recirculation des boues ». Ce recyclage d'une partie des boues produites par le système d'épuration permet de maintenir la masse de bactéries contenues dans le bassin d'aération à un niveau compatible avec les performances épuratoires attendues. Les traitements par boues activées éliminent de 85 à 95 % de la DBO5.

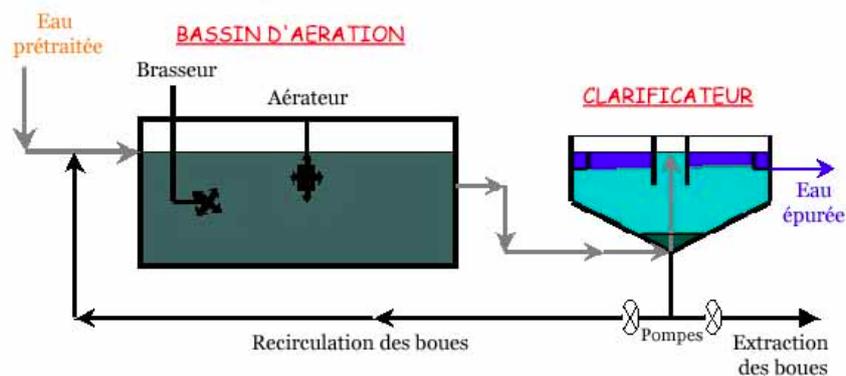


Figure 6 : Schéma d'une installation à boues activées en culture libre (d'après <http://www.univ-lehavre.fr/cybernat/pages/bouactiv.htm>)

Pour les installations à cultures fixes, la culture bactérienne (appelée aussi biofilm, film biologique ou biomasse) repose sur un support (caillou, plastique, milieu granulaire fin). La technique des lits bactériens consiste à faire ruisseler les eaux usées sur un support solide où se développe une culture de micro-organismes épurateurs. Les eaux usées traversent le réacteur et, au contact du film biologique, la matière organique se dégrade. Un clarificateur doit être placé en aval du lit bactérien pour éliminer les boues résultant des matières organiques dégradées. Le rendement maximum de cette technique est de 80 % d'élimination de la DBO.

La biofiltration utilise une culture bactérienne fixée sur un support granulaire fin, immergé dans un bassin. Le milieu granulaire sert à la fois de filtre et de support aux cultures bactériennes. Cette installation offre donc la possibilité de réaliser conjointement la dégradation des matières polluantes et la clarification des eaux usées. Quel qu'il soit, le matériau retenu doit se caractériser par son action filtrante et permettre une fixation maximale des cultures biologiques. Un système d'aération apporte l'oxygène nécessaire à l'intérieur du

filtre. Cette technique élimine environ 90 % de la DBO et peut également éliminer l'azote. Elle présente l'avantage d'utiliser des installations plus compactes qui permettent une intégration facile des usines d'épuration en milieu urbain.

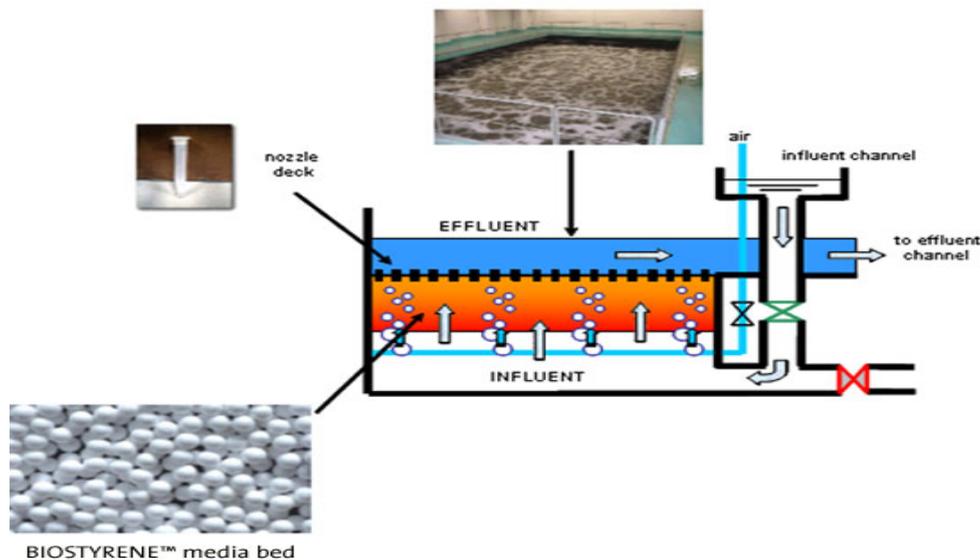


Figure 7: Schéma d'un biofiltre (d'après <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/24963/ch03.html>)

Les procédés membranaires :

Les procédés membranaires combinent des procédés physiques et biologiques. Un traitement par boues activées est suivi d'une filtration au travers des membranes organiques ou céramiques. Ces membranes très fines constituent une barrière physique qui retient les microorganismes et les particules. Les bactéries ne franchissent pas la membrane, mais restent dans le réacteur, c'est-à-dire le bassin à boues activées où se déroule la réaction biologique de dégradation des matières organiques. Ce type de traitement a l'avantage de nécessiter des installations de dimension réduite (suppression du clarificateur) et d'offrir un très haut niveau d'épuration. Mais il reste peu utilisé car les coûts de fonctionnement sont très élevés.

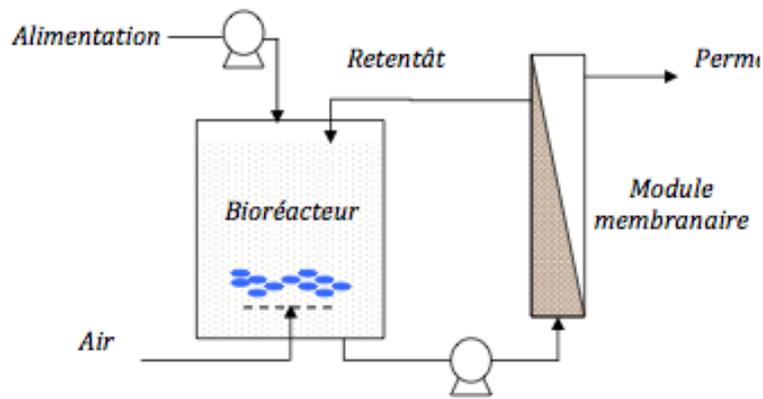


Figure 8 : Schéma d'un bioréacteur à membrane externe [28]

III-2-4-2-4- Clarification et rejet des effluents

A l'issue des traitements, une ultime décantation permet de séparer l'eau épurée et les boues, ou résidus secondaires, issus de la dégradation des matières organiques. Cette décantation est opérée dans des bassins spéciaux, les clarificateurs. L'eau épurée peut alors être rejetée dans le milieu naturel. La masse biologique ainsi récupérée constitue les boues secondaires. Ces boues récupérées en fond d'ouvrage sont pour partie, renvoyées vers le bassin d'aération pour y maintenir la concentration voulue en microorganismes épuratoires, et, pour partie, extraites et envoyées sur la ligne de traitement des boues.

III-2-4-2-5- La désinfection

Les traitements primaires et secondaires ne détruisent pas complètement les germes présents dans les rejets domestiques. Des procédés d'élimination supplémentaires sont donc employés lorsque les eaux traitées sont rejetées en zone de baignade, de pisciculture ou d'élevage de coquillages.

L'éventail des techniques de désinfection est assez large. Un réactif désinfectant peut être ajouté aux eaux traitées, avant leur rejet dans le milieu naturel. Le chlore est le désinfectant le plus courant. Mais la désinfection peut également s'effectuer avec l'ozone ou le brome, voire du dioxyde de chlore. Le lagunage naturel tertiaire assure l'exposition des microorganismes pathogènes au rayonnement solaire. Ce rayonnement provoque une destruction des germes d'autant plus efficace que le temps de séjour des eaux traitées dans la lagune est élevé (50 à 60 jours).

Les Ultraviolets sont de plus en plus utilisés, depuis quelques années, pour désinfecter les eaux usées urbaines. Assurant un bon rendement de désinfection, les UV nécessitent un investissement important, mais présentent l'avantage de ne pas entraîner l'apparition de sous produits de désinfection.

III-2-4-2-6- Les traitements complémentaires

Des traitements plus poussés sont effectués lorsque la nature des milieux recevant l'eau dépolluée l'exige (zone sensible).

L'élimination de l'azote :

Les stations d'épuration prévues pour éliminer les matières carbonées n'éliminent qu'environ 20% de l'azote présent dans les eaux usées. Pour satisfaire aux normes de rejet en zones sensibles, des traitements complémentaires doivent être mis en place. L'azote organique se transforme dans les eaux usées en azote ammoniacal (NH_4^+). L'élimination de l'azote ammoniacal, est, le plus souvent, obtenue grâce à des traitements biologiques, de « nitrification-dénitrification ». La nitrification consiste en une transformation, par des cultures bactériennes, de l'azote ammoniacal en nitrates (NO_3^-). Une seconde phase, la dénitrification, complète le processus. Les nitrates, sous l'action de bactéries dénitrifiantes, sont transformés en azote gazeux. Ce gaz s'échappe alors dans l'atmosphère, comme le CO_2 produit de l'élimination des matières carbonées.

Ces procédés sont aujourd'hui les plus compétitifs et les mieux adaptés, puisqu'ils peuvent notamment être combinés à l'élimination de la pollution carbonée. Il suffit pour cela que les volumes des bassins et les dispositifs d'aération soient suffisants.

L'élimination du phosphore :

L'élimination du phosphore ou déphosphatation, peut être réalisée par des voies physico-chimiques ou biologiques. En ce qui concerne les traitements physico-chimiques, l'adjonction de réactifs, comme les sels de fer ou d'aluminium, permet d'obtenir une précipitation des phosphates insolubles et leur élimination par décantation. Ces techniques, les plus utilisées actuellement, éliminent entre 80% et 90% du phosphore, mais engendrent une importante production de boues.

La déphosphatation biologique consiste à provoquer l'accumulation du phosphore dans les cultures bactériennes des boues. Les mécanismes de la déphosphatation biologique sont relativement complexes et leur rendement variable (en fonction notamment de la pollution carbonée et des nitrates présents dans les eaux usées). Le rendement moyen est d'environ 60%. Dans les grosses installations d'épuration, ce procédé est souvent couplé à une déphosphatation physico-chimique, pour atteindre les niveaux de rejet requis.

III-2-4-3- Les traitements des eaux pluviales

Dans certains cas, il est nécessaire de traiter les eaux pluviales. Le type de traitement qui leur est appliqué dépend du mode de collecte de ces eaux.

En réseau séparatif, les matières véhiculées dans les eaux par temps de pluie se déposent facilement. De ce fait, il est intéressant de les traiter par décantation avant de les rejeter. Ces traitements, qui interviennent à la sortie des principaux collecteurs d'eaux pluviales, peuvent voir leur efficacité améliorée par l'ajout de réactifs chimiques.

En réseau unitaire, les eaux usées et eaux pluviales étant ici regroupées, le principal problème se pose lors de fortes chutes de pluie : éviter que ce mélange, ne se répande dans le milieu naturel, du fait de la saturation du système d'assainissement. Pour limiter ces phénomènes de déversement dans le milieu naturel, des bassins d'orage sont aménagés pour stocker une partie des eaux durant les précipitations. On peut ensuite, par temps sec, progressivement déstocker ces eaux et les acheminer vers la station d'épuration pour les traiter.

III-2-5- les boues des stations d'épuration

L'épuration des eaux usées urbaines s'inscrit dans une démarche de protection de notre environnement et de préservation de nos ressources en eau. Elle est concrètement mise en œuvre par les collectivités locales, selon une réglementation abondante et en fonction de critères tenant compte du milieu naturel local. Le processus de dépollution des eaux usées urbaines produit d'un côté de l'eau épurée, de l'autre des sous-produits en grande quantité : les boues. Elles représentent un volume considérable. Ces boues doivent trouver une destination en continu, au même titre que les eaux débarrassées de leur pollution retournent en permanence dans le milieu naturel. Un blocage même momentané du processus, qu'il

intervienne au niveau de la filière de traitement des boues ou au niveau de leur évacuation, peut rapidement avoir des conséquences néfastes sur la dépollution elle-même, et donc sur l'environnement.

III-2-5-1- Les différents types de boues

Les boues urbaines sont produites à plusieurs stades du processus d'assainissement des eaux usées. Selon les étapes du traitement au cours desquelles elles sont recueillies, on distingue :

- Les boues primaires dites fraîches, obtenues au niveau du décanteur primaire après séparation physique des matières en suspension par décantation.

- Les boues physico-chimiques : agrégats formés après des traitements physico-chimiques. Dans ce cas, la décantation est rendue plus efficace par l'agglomération des particules solides en suspension obtenue grâce à l'adjonction préalable de réactifs chimiques.

- Les boues biologiques : proviennent des traitements biologiques des eaux usées dont le principe est de faire dégrader les substances organiques présentes dans l'eau par les microorganismes qu'elles contiennent et que l'on cultive à cet effet. A la différence des deux types de boues précédentes, qui sont des matières brutes décantées, les boues biologiques résultent de la transformation des matières organiques contenues dans les eaux usées. Elles représentent la majorité des boues produites en France [94].

Ces boues brutes, n'ayant pas encore reçu de traitements spécifiques, sont caractérisées par un certain nombre de critères définissant leur composition physique et chimique. On peut citer parmi ces critères la siccité (taux de matière sèche), la teneur en matières volatiles, la teneur en matières minérales, le pouvoir calorifique, la teneur en éléments fertilisants, la viscosité, l'aptitude à l'épaississement. Ces critères permettent notamment d'apprécier le niveau de déshydratation qui pourra être obtenu, et leur capacité à tenir en tas pour leur stockage. Bien entendu, les caractéristiques physiques et chimiques des boues brutes sont directement liées à celles des eaux usées reçues par la station d'épuration et au type de traitement des eaux pratiqué dans ladite station [94].

III-2-5-2- Les traitements des boues

Les traitements appliqués aux boues brutes ont plusieurs objectifs. Ils visent à réduire leur volume, leur pouvoir de fermentation lié à leur teneur en matière organique, ou éventuellement, à les hygiéniser, c'est-à-dire en éliminer les bactéries et les parasites présents. Ces traitements permettent de limiter les nuisances olfactives, les risques sanitaires, mais aussi faciliter leur stockage, avant leur élimination ou leur valorisation.

III-2-5-2-1- La réduction des volumes

Quelle que soit la destination finale des boues, il est impératif de réduire leur volume, c'est-à-dire leur teneur en eau. Cette diminution diminue les coûts de stockage et de transport en cas de valorisation et donne de l'homogénéité. La diminution de volume facilite les manutentions et augmente le pouvoir calorifique en cas d'incinération.

L'épaississement est la première étape du traitement. Il permet de réduire leur volume en évacuant l'eau interstitielle qu'elles contiennent. Il est opéré par décantation (séchage par pesanteur), par flottation (la flottation consiste à dissoudre de l'air dans la boue entrante à l'intérieur d'un réservoir. Au cours de leur ascension, les bulles entraînent les matières en suspension à la surface), par égouttage (filtration gravitaire avec un apport de polymères). L'épaississement facilite en particulier les traitements ultérieurs.

La déshydratation permet de pousser plus loin la réduction du volume des boues par un effet de concentration. Elle est effectuée sur des boues épaissies, stabilisées ou non, et vise à éliminer de façon plus ou moins poussée leur humidité. La déshydratation recourt à trois grandes familles de techniques : la filtration naturelle ou mécanique, la centrifugation et le lit de séchage. Ces procédés nécessitent un conditionnement préalable des boues, généralement par un réactif flocculant permettant d'agglomérer les matières solides et de favoriser ainsi la séparation solide/ liquide.

Le séchage permet l'évacuation de l'eau interstitielle par évaporation. Il est plus ou moins poussé (séchage partiel à 30 ou 45 % de siccité ou séchage poussé de 60 à 90 % de siccité) selon les usages ultérieurs. Le séchage poussé permet une meilleure valorisation agricole et, en cas d'incinération, garantit un pouvoir calorifique comparable à celui des ordures ménagères.

III-2-5-2-2- La stabilisation et l'hygiénisation

La stabilisation permet d'éliminer 20 à 50% de la matière organique. Les boues restent très chargées en matières volatiles, en matières organiques qui ont tendance à fermenter spontanément. Elles peuvent aussi comporter des agents pathogènes indésirables.

La stabilisation permet de diminuer le pouvoir de fermentation des boues, c'est-à-dire soit de dégrader les matières organiques qu'elles contiennent, soit de bloquer leurs réactions biologiques. Elle permet, puisqu'elle évite la fermentation des boues, de limiter les nuisances olfactives. La stabilisation peut être obtenue par des moyens biologiques, chimiques ou thermiques.

L'hygiénisation consiste à éliminer les agents pathogènes. Elle requiert des conditions de températures pendant un temps donné et/ou un pH soit très élevé (l'augmentation de pH est assurée par chaulage, qui permet de monter le pH jusqu'à 12) soit très bas (apport de nitrites qui permet de réduire le pH jusqu'à 2).

La stabilisation et l'hygiénisation peuvent être opérées par voie biologique (compostage), par voie chimique (chaulage), par voie thermique (séchage). Les différences entre les deux traitements proviennent des durées de traitement et des températures.

III-2-5-2-3- Le compostage et la méthanisation

Il peut être effectué afin de modifier la valeur agronomique des boues. Il consiste à mélanger les boues à un autre produit (sciure, écorce, copeaux, fumier, papier, carton...) puis à maîtriser l'évolution du mélange avec l'aération afin d'obtenir un amendement organique. Outre la modification de la valeur agronomique du produit, il est ainsi stabilisé et hygiénisé par la montée en température qui se produit. Suivant la technique utilisée, le compostage réduit le volume par deux ou trois.

La méthanisation se différencie du compostage en ce sens qu'elle consiste en une fermentation anaérobie, contrairement à ce dernier. De plus la méthanisation s'accompagne de la production de gaz Méthane, dont le pouvoir calorifique peut être récupéré. Tandis que le compostage produit un compost, la méthanisation produit un digestat, qui peut, selon sa qualité, être mis en décharge, épandu en agriculture, séché ou composté [94].

III-2-5-3- La destinée des boues

À l'issue du traitement, les boues sont liquides, pâteuses, solides, séchées ou compostées. Le mode de traitement des boues, notamment le choix des différentes étapes à appliquer, dépend en grande partie des exigences liées à la destination finale choisie. Pour la valorisation agricole, par exemple, il est préférable d'utiliser des boues stabilisées, voire hygiénisées, afin d'éviter les nuisances olfactives liées aux fermentations ainsi que de limiter les risques sanitaires lors de la réalisation des opérations d'épandage. Pour l'incinération, le degré de siccité et le pouvoir calorifique sont des critères décisifs, puisqu'une humidité excessive peut altérer la combustion. Aussi, les boues doivent avoir été préalablement épaissies et déshydratées, pré-séchées voire séchées.

Pour la valorisation thermique, les boues sont utilisées comme combustibles. Elles doivent être séchées au préalable afin d'augmenter leur pouvoir calorifique.

Les boues traitées avaient traditionnellement, en France, trois destinations finales principales : la valorisation en agriculture, l'incinération, la mise en décharge. Cette dernière qui concerne encore 25% des boues produites en 2000, est devenue très restrictive depuis le premier juillet 2002, conformément au code de l'environnement anciennement loi sur les déchets. La mise en décharge est ainsi réservée aux boues non conformes aux seuils imposés dans les filières de valorisation (agricole ou énergétique), ainsi qu'aux boues pour lesquelles l'épandage ou l'incinération sont localement impossibles dans des conditions économiques acceptables [94].

La valorisation en agriculture ou épandage agricole consiste à épandre des boues traitées ou du compost sur des terres agricoles pour tirer parti de leur pouvoir fertilisant. Réalisé en accord avec l'agriculteur, l'épandage doit être organisé par le producteur des boues. L'épandage est encadré par une réglementation stricte, qui en fixe les modalités techniques et administratives, ainsi que la traçabilité.

L'incinération peut être réalisée dans des fours spécifiquement conçus pour les boues, mais aussi dans des usines d'incinération dédiées à la fois aux ordures ménagères et aux boues. L'incinération produit des fumées et des résidus (cendres et autres résidus solides de l'incinération appelés mâchefers, uniquement dans les cas de co-incinération avec les ordures ménagères). Ces sous-produits sont valorisés ou éliminés en centres d'enfouissement techniques suivant leur nature.

La mise en décharge ne peut être réservée qu'aux boues non conformes aux seuils de recyclage ou aux boues dont l'épandage est localement impossible. Les boues peuvent être stockées dans des décharges réservées aux ordures ménagères, avec un seuil minimal de siccité de 30%.

La problématique de gestion des boues de stations d'épuration amène les professionnels du secteur à imaginer et à développer d'autres voies d'élimination des boues. On citera par exemple l'oxydation par voie humide, l'incinération en cimenterie, la revégétalisation, la gazéification, les procédés de réduction de la quantité de boues produites lors de l'épuration.

CHAPITRE 2 : ETAT DES LIEUX DE LA CONTAMINATION DES MILIEUX AQUATIQUES

La pollution des milieux aquatiques est un problème majeur tant pour la population humaine, utilisatrice des ressources en eau, que pour les populations végétales et animales pour lesquelles l'eau représente le milieu de vie. Un milieu aquatique est dit pollué lorsque son équilibre a été modifié de façon durable par l'apport en quantités trop importantes soit de substances plus ou moins toxiques, d'origine naturelle ou issues d'activités humaines, soit encore d'eaux trop chaudes. Ces pollutions peuvent entraîner divers types de nuisances : augmenter la mortalité de certaines espèces animales ou végétales jusqu'à parfois les faire disparaître, altérer leurs capacités physiologiques, détériorer la qualité de l'eau au point de la rendre impropre à certains usages, comme l'alimentation humaine. La totalité de la ressource devra être envisagée en raison des connexions permanentes entre les différents compartiments de l'hydrosphère, la contamination de l'un ayant des conséquences sur l'autre.

Nous allons voir que les types de pollution de l'environnement aquatique sont multiples. D'origine physique, organique, ou chimique, elles peuvent également résulter d'une contamination microbiologique. Un des aspects préoccupants de cette contamination microbiologique est la dissémination de bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans l'environnement.

I- SOURCES ET CHEMINEMENT DES POLLUANTS

L'activité humaine, qu'elle soit industrielle, urbaine ou agricole, est à l'origine d'un grand nombre de substances polluantes de natures très variées, qui pour la plupart, finiront par rejoindre les milieux aquatiques. Ceci est notamment dû à la polarité importante de la molécule d'eau qui lui permet de solubiliser un grand nombre de substances.

I-1- Sources des principaux polluants des milieux aquatiques

On peut tout d'abord faire une distinction entre deux grands types de pollutions.

Les pollutions ponctuelles : elles sont relativement immédiates et proviennent de sources clairement identifiées (rejets domestiques ou industriels, effluents d'élevage). Elles peuvent le plus souvent être traitées par les stations d'épuration.

Les pollutions diffuses : dans ce cas, les pollutions sont issues d'une multitude de petites sources ou de la dispersion à grande échelle de certaines substances. Un exemple illustrant bien ce type de pollution est le rejet dans les eaux usées, par l'intermédiaire des déjections humaines, des médicaments utilisés par la population générale.

Des voies diverses peuvent être empruntées pour transporter les polluants dans le milieu aquatique. Cela peut être par déversement direct d'effluents industriels et d'eaux d'égouts dans les cours d'eau (surtout dans les pays n'ayant pas de réseau d'assainissement des eaux), ou alors par retombées sur les sols de polluants atmosphériques entraînés par la pluie à plus ou moins longue distance. Le lessivage par ruissellement sur les sols pollués (hydrocarbures, poussières urbaines sur les toits, épandage agricole) et l'infiltration de l'eau de pluie dans les nappes souterraines, sont également des sources non négligeables de pollution de l'environnement aquatique.

I-2- Cheminement des polluants dans les milieux aquatiques

Dans les milieux aquatiques, les polluants peuvent suivre différents trajets, plus ou moins longs. Certains polluants sont très vite dégradés par des réactions chimiques, sous l'effet de la lumière ou encore grâce à l'intervention de microorganismes (biodégradation). D'autres polluants, dits persistants, contaminent durablement les milieux aquatiques, soit en restant dans l'eau et surtout dans les sédiments, soit en passant dans les organismes vivants, et dans certains cas, en s'accumulant dans les chaînes alimentaires. La capacité d'auto-épuration d'un écosystème dépend de sa structure physique, de sa composition biologique (nombre d'espèces présentes) et de son fonctionnement.

II- LES DIFFERENTS TYPES DE POLLUTION

La pollution de l'eau est une dégradation physique, chimique ou biologique de ses qualités naturelles, provoquée par l'homme et par ses activités. Elle perturbe les conditions de vie et l'équilibre du milieu aquatique et compromet les utilisations de l'eau.

II-1- Les pollutions physiques

Le milieu peut être perturbé par des apports aux effets divers.

Pollution thermique : ce type de pollution est lié à l'utilisation de l'eau comme liquide de refroidissement par les industries. L'eau est notamment utilisée comme refroidisseur dans les centrales thermiques et nucléaires. Elle est pompée à partir des cours d'eau, et ensuite restituée au sortir de la centrale à une température plus élevée de 4 à 5 degrés Celsius. Elle va alors réchauffer le milieu où elle a été déversée, ce qui peut perturber la vie aquatique, animale ou végétale, notamment en modifiant les rythmes physiologiques des espèces (reproduction, survie hivernale, etc.). *Naegleria fowleri*, une amibe libre, peut proliférer dans ces milieux réchauffés, et elle peut provoquer des méningoencéphalites. Elle ne devrait être présente à une concentration supérieure à 100/L. Elle a été retrouvée à des concentrations supérieures aux limites acceptables dans des eaux d'une centrale EDF [88].

Pollution radioactive : elle est due à la présence de radio-isotopes dans l'eau, essentiellement originaires des installations nucléaires. Elle est invisible mais n'en est que plus insidieuse. Les risques de pollution radioactive sont surtout liés aux accidents potentiels (centrale de Tchernobyl) et également à l'enfouissement de déchets radioactifs dans des fosses sous-marines. L'utilisation de radio-isotopes en médecine humaine est également une source de pollution potentielle, mais les établissements de santé sont censés maîtriser ce type de pollution.

II-2- Les pollutions par les matières organiques

Les matières organiques ont longtemps été les principaux polluants des milieux aquatiques. Elles proviennent des déchets domestiques (ordures ménagères, excréments),

agricoles (lisiers) ou industriels (papeterie, industrie du bois, abattoirs) et concernent essentiellement des matières fermentescibles (glucides, lipides, protides).

Certaines substances organiques sont biodégradables et peuvent facilement être décomposées et éliminées grâce aux capacités naturelles d'auto-épuration des milieux aquatiques. Mais, lorsqu'elles sont en excès, leur décomposition, par utilisation de l'oxygène dissous dans l'eau, peut entraîner l'asphyxie de la faune aquatique. Ce sont les poissons qui vont le plus souffrir du manque d'oxygène, mais en cas de fortes pollutions, les autres organismes vivant dans ces milieux peuvent être touchés (bactéries, invertébrés, flore).

II-3- La pollution chimique

Les polluants chimiques peuvent, pour certains, être naturellement présents dans les sous-sols. C'est le cas de l'arsenic, qui, dans certaines régions du monde, contamine des réserves d'eau naturelles. Malgré tout, l'essentiel de la pollution chimique du milieu aquatique provient des activités humaines. A partir des années cinquante, le développement de l'industrie et l'intensification de l'agriculture s'accompagnent d'une utilisation massive de produits chimiques causant une pollution croissante de l'environnement.

Il faut citer par exemple les agents fertilisants que sont les nitrates et les phosphates, responsables de pollutions importantes des ressources en eau. La présence de nitrates dans les eaux provient en grande partie de l'agriculture, suite à l'épandage de doses massives d'engrais azotés et de lisier. Les phosphates qui ont des origines plus diverses, sont les principaux responsables du phénomène d'eutrophisation. Lorsqu'ils sont en trop fortes concentrations dans l'environnement aquatique, ils deviennent de véritables engrais pour les milieux aquatiques qu'ils contribuent à enrichir exagérément en matières organiques.

La pollution métallique est un des aspects de la pollution chimique. Elle peut être due à différents métaux comme l'aluminium, le chrome, le cuivre et le cobalt, ou encore à des métaux lourds tels que le mercure, le cadmium ou le plomb. Cette pollution provient des rejets d'usines, papeteries, tanneries, industrie métallurgique, mais aussi de l'épandage agricole d'oligoéléments, des retombées de poussières atmosphériques générées par l'incinération de déchets (mercure), ou de la combustion d'essence automobile (plomb) [90]. L'exploitation minière peut être aussi une source importante de métaux dans les eaux par ruissellement sur les sols. Cette pollution métallique n'est pas biodégradable et, tout au long

de la chaîne alimentaire, certains de ces polluants peuvent s'accumuler dans les organismes vivants. Cette bioaccumulation explique en partie leur très forte toxicité. Il faut aussi signaler que la pollution par les métaux lourds peut sélectionner des résistances antibiotiques chez les bactéries. En effet, des conditions de stress, comme des environnements pollués, ont le potentiel d'augmenter la recombinaison génétique et le transfert horizontal de gènes chez les bactéries ce qui favorise la dissémination de gènes de résistance [63]. L'association d'antibiorésistance et de résistance aux métaux lourds est très fréquente chez le même organisme car souvent les déterminants génétiques correspondants sont localisés sur le même plasmide, le même transposon ou le même intégron [2].

D'autres composés, comme les différents pesticides, se retrouvent dans les milieux aquatiques. Les pesticides sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques, utilisés pour lutter contre les animaux (insectes, rongeurs) ou les plantes, jugés nuisibles aux cultures. L'utilisation massive de ce type de composés, leur dispersion dans l'atmosphère lors de leur application ou par évaporation à partir des plantes traitées, ou leur mauvaise utilisation, sont responsables de leur présence dans l'environnement. Les pesticides sont rapidement apparus comme des agents nocifs pour l'homme et les écosystèmes. Si leur toxicité aiguë est bien connue, leur toxicité chronique par exposition à de très faibles doses à long terme est difficile à étudier aussi bien chez l'homme que dans les écosystèmes. En effet, il existe de très nombreuses familles de pesticides, chimiquement très différentes. Ils ont des demi-vies d'élimination parfois très longues (plusieurs années), et certains de leurs métabolites sont parfois plus toxiques et plus persistants que les produits parents. Leurs effets sur le vivant sont encore très mal connus, et de nombreuses études sont menées sur ce sujet. On soupçonne notamment certains pesticides d'avoir, à faibles doses, des effets de perturbateurs endocriniens chez l'homme et l'animal (hormones sexuelles, thyroïdiennes). Les grandes familles de pesticides sont les organochlorés, les organophosphorés, les pyréthroïdes, les carbamates et les phytosanitaires.

Citons aussi les agents tensioactifs contenus dans de nombreux détergents que l'on retrouve également en quantité importante dans le milieu aquatique. Bien que les désinfectants soient largement présents dans l'environnement, il y a eu encore peu de recherches sur une corrélation entre résistance aux désinfectants et résistance aux antibiotiques. Il a été récemment démontré une association entre la résistance à la chlorhexidine parmi des *Escherichia coli* β -hémolytiques isolées à partir de porcs nouveau-nés et la résistance aux antibiotiques gentamicine et streptomycine [3].

Enfin, il ne faut pas oublier un des aspects de la pollution chimique qui a été négligé jusqu'à maintenant, qui est la pollution des milieux aquatiques par les médicaments et les métabolites de ces médicaments rejetés par les hommes et les animaux qui les ont consommés.

II-4- La contamination des milieux aquatiques par les médicaments

Grâce aux progrès de l'analyse physico-chimique, la présence de traces de substances médicamenteuses et de leurs dérivés ou métabolites a été largement établie à l'échelle mondiale en particulier dans les eaux superficielles et souterraines, dans les eaux résiduaires, dans les boues des stations d'épuration utilisées en épandage agricole et dans les sols.

II-4-1- Mécanismes aboutissant à la présence de médicaments dans l'environnement

La présence de résidus de substances médicamenteuses dans les eaux est liée à des rejets émis tout au long de leur cycle de vie. Tout d'abord des rejets existent au niveau des industries pharmaceutiques lors de la fabrication des principes actifs. Par la suite, leur utilisation en médecine humaine à l'hôpital et en ambulatoire, et en médecine animale, entraîne leur rejet dans l'environnement. Après absorption par l'organisme, les médicaments peuvent être excrétés inchangés ou métabolisés par les enzymes de phase I et de phase II, dans les fèces et/ou dans les urines. Ils se retrouvent alors dans les réseaux d'eaux usées en ce qui concerne les médicaments utilisés en médecine humaine, mais pour ce qui est des médicaments utilisés en médecine vétérinaire, ils vont être rejetés à même le sol, voire directement dans l'eau dans le cas de la pisciculture. Les médicaments présentent des propriétés de franchissement des membranes, de bioaccumulation et finalement peuvent induire des effets biologiques sur des cibles qui n'étaient pas prévues au sein des écosystèmes aquatiques et terrestres. Déversés dans l'environnement, ils peuvent entraîner des effets indésirables, sans que n'en soient encore suffisamment évaluées les conséquences. Les connaissances actuelles sont limitées, mais il importe de prendre en compte la problématique des résidus médicamenteux détectés dans les ressources en eau à des concentrations du même ordre de grandeur que de nombreux produits phytosanitaires.

Les médicaments délivrés mais non utilisés sont également une source de leur présence dans l'environnement. En cas de non observance par les patients, ou si la taille du conditionnement n'est pas adaptée au traitement, les médicaments restants vont être rejetés avec les ordures ménagères ou directement jetés dans l'eau. Certaines études ont mis en évidence la présence de 17 alpha-éthynylestradiol contenu dans les patchs transdermiques contraceptifs dans l'environnement aquatique [39]. Après une semaine de traitement, le patch est retiré de la peau, mais il contient encore des quantités non négligeables de principe actif. Il est ensuite rejeté dans l'eau des toilettes.

Une fois dans l'environnement, la transformation des médicaments va continuer. Les molécules seront plus ou moins vite dégradées, en fonction de leur structure chimique propre, mais aussi en fonction de l'environnement dans lequel elles sont présentes (présence de lumière, pH). Mais les données relatives à la transformation de ces molécules dans l'environnement sont très peu nombreuses car elles nécessitent de prendre en compte un grand nombre de paramètres.

II-4-2- Constat de la contamination

La première mise en évidence de médicaments dans les eaux remonte à 1976 avec des concentrations de 28,79 µg/L d'acide salicylique et 7,09 µg/L d'acide clofibrique dans les eaux de la station d'épuration de « Big Blue Rivers » à Kansas City dans le Missouri, ce qui représentait respectivement 8,64 kg et 2,13 kg déversés chaque jour [86]. Depuis, de nombreux travaux ont mis en évidence la présence de très nombreux médicaments dans toute sorte d'environnement aquatique. Deux types de substances médicamenteuses sont susceptibles de contaminer l'environnement : les substances à visée thérapeutique humaine d'une part, et vétérinaires d'autre part. Ces substances se concentrent dans les STEP dont les procédés conventionnels n'apparaissent pas toujours suffisants à leur dégradation. Les taux d'abattement y sont très variables. Proches de 0% pour le bêtabloquant aténolol, ils peuvent atteindre des valeurs supérieures à 90% pour la plupart des anti-inflammatoires et des analgésiques [6]. Rien d'ailleurs, dans leurs cahiers des charges, ne spécifie aux STEP de devoir garantir l'élimination spécifique de molécules ciblées [86]. Le rejet en continu de médicaments et de leurs métabolites dans le milieu aquatique confère à ces molécules un caractère de pseudo-persistance [27].

II-4-2-1- Quels médicaments ?

On retrouve aujourd'hui dans l'environnement aquatique la majorité des grandes classes thérapeutiques. LARSSON *et al.*, dans une étude de 2007, rapportent la présence de propranolol, de diclofénac, de gemfibrozil, d'ibuprofène et de fluoxétine dans les eaux issues d'une station d'épuration en Inde. On peut détecter également des estrogènes issus des médicaments contraceptifs dans de nombreux compartiments aquatiques [20]. On soupçonne d'ailleurs ces estrogènes d'être, au moins en partie, responsables du phénomène de féminisation des rivières que l'on peut observer dans de nombreuses régions du globe. On peut aussi retrouver des résidus médicamenteux dans les sédiments des rivières comme le paracétamol, l'ivermectine ou l'acide clofibrique [58]. Le rapport « médicaments et environnement » de l'académie nationale de pharmacie en 2008 met en évidence par une revue de la littérature les molécules retrouvées dans les eaux, qu'elles soient résiduaire, de surface, sous-terraines ou marines. On peut ainsi observer que les grandes classes thérapeutiques sont toutes représentées. Citons les antalgiques et analgésiques comme l'aspirine, le paracétamol ou la codéine, les médicaments de cardiologie tels que le valsartan, de nombreux bêta-bloquants ou des antiarythmiques comme l'amiodarone, ou encore les médicaments du système nerveux central comme la carbamazépine, le diazépam ou le phénobarbital. Des anticancéreux comme l'ifosfamide ou le cis-platine ou des produits de contraste sont également mesurés dans les eaux. Enfin, il ne faut pas oublier les antibiotiques, que nous allons traiter séparément. Il faut également avoir à l'esprit que ces médicaments sont présents dans l'eau à des doses très faibles, et on pourrait se poser des questions quant à leurs éventuels effets néfastes pour l'environnement et pour l'homme. Il faut malgré tout prendre en compte que ces médicaments sont présents en permanence dans les milieux et que les espèces animales et végétales vivant dans ces milieux y sont exposées à long terme. On sait que certaines substances médicamenteuses peuvent avoir un impact significatif sur la flore et la faune, notamment en matière d'antibiorésistance ou de modulation endocrinienne qui peuvent survenir à doses faibles. Mais il manque aujourd'hui beaucoup de données pour pouvoir évaluer la toxicité de ces molécules à très faibles doses sur l'environnement.

II-4-2-2- Les antibiotiques

Les antibiotiques sont généralement administrés en grande quantité aux humains et aux

animaux pour traiter un grand nombre de maladies et d'infections. Un pourcentage important de ces antibiotiques est excrété, soit sous forme inchangée, soit métabolisés, les métabolites pouvant eux-mêmes être actifs. On retrouve des antibiotiques dans l'eau, conséquence de la consommation accrue de la population, mais aussi conséquence de l'élevage intensif, des déchets industriels pharmaceutiques et du manque de recyclage des déchets à proximité des hôpitaux [56]. La contamination des milieux par les antibiotiques peut perturber l'écologie microbienne, augmenter la prolifération de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, et donc poser des problèmes en termes de santé humaine [68].

II-4-2-2-1- De nombreuses molécules dans de nombreux compartiments

La présence de traces de résidus d'antibiotiques dans les eaux est une réalité. Les mesures réalisées montrent leur présence dans les eaux usées hospitalières, dans les eaux usées urbaines, dans les STEP aussi bien au niveau des affluents que des effluents, dans les eaux de surface et du sous-sol, dans les sols, et même dans les eaux pour consommation humaine.

Effluents hospitaliers :

Au niveau des effluents hospitaliers, la ciprofloxacine, par exemple, a été mesurée à des concentrations de 0,7 à 124,5 µg/L, ainsi que l'ampicilline à des concentrations de 20 à 80 µg/L dans les effluents d'un grand hôpital allemand [46]. La ciprofloxacine a également été retrouvée dans des effluents hospitaliers en association avec la norfloxacine et l'ofloxacine [23]. Des molécules comme la clarithromycine, la gentamicine, l'amikacine, la tétracycline ou le sulfaméthoxazole ont aussi été détectés dans des effluents hospitaliers. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'hôpital n'est pas la principale source d'antibiotiques dans les effluents municipaux, exception faite pour les céphalosporines, qui sont des molécules essentiellement hospitalières. En effet il ne représente, selon les pays, que 5 à 20 % de la consommation d'antibiotiques [47]. En revanche les concentrations observées peuvent être élevées et peuvent parfois atteindre le même ordre de grandeur que les CMI pour des bactéries sensibles [46].

Eaux usées et stations d'épuration :

Les eaux usées municipales qui sont conduites vers les STEP *via* le réseau d'assainissement contiennent elles aussi des résidus d'antibiotiques. Les concentrations en antibiotiques dans les eaux usées municipales et dans les STEP sont plus basses d'un facteur 100 comparé aux effluents hospitaliers [48]. L'érythromycine et la roxithromycine, ont été retrouvées dans les effluents d'une STEP [86]. Certains de ces antibiotiques sont faiblement dégradés par les STEP, en particulier les quinolones (ciprofloxacine, norfloxacine...), les nitro-imidazoles et les sulfonamides. Pour le sulfaméthoxazole, le taux d'élimination dépend du procédé de traitement. Pour les macrolides, les taux de destruction ne dépassent pas 33% [86]. GIGER (2000) donne des taux de dégradation de la ciprofloxacine de l'ordre de 55 à 75% suite au traitement aérobie des effluents municipaux. Une adsorption sur les boues joue un rôle épurateur important pour les quinolones qui sont éliminées autour de 90% dans les STEP. Une étude de WATKINSON *et al.* (2007) a évalué la dégradation de 28 antibiotiques dans les STEP conventionnelles à charbon activé ainsi que des stations utilisant la microfiltration et l'osmose inverse. Si globalement les teneurs en antibiotiques sont réduites de 92%, ils trouvent systématiquement dans les premières la ciprofloxacine, le sulfaméthoxazole, la lincomycine et le triméthoprime à des teneurs de 0,05 à 0,6 µg/L. Dans les secondes, les teneurs en acide nalidixique, enrofloxacine, roxithromycine, norfloxacine, oléandomycine, triméthoprime, tylosine et lincomycine sont extrêmement basses (de 0,01 ng/L à 0,001 ng/L), ce qui n'empêche pas qu'ils soient systématiquement retrouvés.

Eaux de surface :

Les résidus de médicaments non retenus ou non éliminés dans les stations d'épuration sont rejetés dans les eaux de surface par leurs effluents. Leurs concentrations sont abaissées soit par dilution soit par photodégradation, mais celle-ci est également très variable d'une molécule à l'autre. Une étude de KOLPIN *et al.* (2002) mettait en évidence la présence d'antibiotiques dans 50% des eaux de 139 sites étudiés aux Etats-Unis. Dans les eaux de surface, il est difficile de trouver un endroit où les antibiotiques ne peuvent pas être détectés, excepté dans les sites primitifs des rivières dans les montagnes [85]. Les concentrations en antibiotiques retrouvées dans les eaux de surface (rivières, lacs) sont de l'ordre du µg/L [46]. De nombreuses classes d'antibiotiques y sont assez souvent présentes. On va retrouver des macrolides comme la lincomycine, la clarythromycine, l'érythromycine, la roxithromycine ou la tylosine, des fluoroquinolones (ciprofloxacine et norfloxacine), des tétracyclines

(chlortétracycline) et des sulfonamides (sulfadiazine et sulfaméthoxazole). Les concentrations d'antibiotiques retrouvées dans les eaux de surface et dans les eaux usées dans différents pays, comme pour les autres résidus médicamenteux, sont du même ordre de grandeur [47].

Eaux du sous-sol :

Les antibiotiques sont rarement retrouvés dans les eaux du sous-sol et s'ils le sont, c'est à des concentrations en dessous du $\mu\text{g/L}$ [46]. Des sulfonamides comme la sulfaméthazine et le sulfaméthoxazole ont été détectés dans les eaux souterraines à des concentrations pouvant aller respectivement jusqu'à 240 et 410 ng/L . La présence de tétracycline a été observée dans les eaux souterraines ce qui est surprenant car celle-ci a la propriété de s'adsorber très fortement dans la matière organique des sols et des sédiments. Les bêta-lactamines ne sont pratiquement jamais rencontrées du fait d'une forte capacité d'hydrolyse par les bêta-lactamases des bactéries environnementales [86].

Les Sédiments :

Dans les sédiments, de nombreux antibiotiques ont été mesurés à des concentrations parfois élevées. La tylosine par exemple, un macrolide, a été retrouvée à des concentrations de 578 ng/kg et même 2 640 ng/kg en Italie. Citons encore la présence d'érythromycine à des concentrations de 400 à 600 ng/kg dans les sédiments du fleuve Italien, le Pô [86]. De grandes quantités d'antibiotiques ont été retrouvées dans les sédiments en concentration suffisamment puissante pour inhiber la croissance bactérienne dans l'aquaculture. Les substances utilisées dans les piscicultures, étant déversées directement dans l'eau, peuvent se déposer dans les sédiments à partir de l'eau sans avoir subi aucun processus de purification. On a démontré la présence et la persistance d'antibiotiques utilisés intensivement dans les sédiments des fermes aquacoles [46]. Les concentrations varient du ng/L au $\mu\text{g/L}$ avec des teneurs parfois excessives dans les fermes piscicoles car environ 70 à 80% des antibiotiques donnés dans la nourriture finissent dans l'environnement. Par exemple, dans une étude portant sur 13 centres d'élevage intensif de poissons aux Etats-Unis, des teneurs de 0,17 à 10 $\mu\text{g/L}$ d'oxytétracycline, de 0,10 à plus de 15 $\mu\text{g/L}$ de sulfaméthoxine et de 0,10 à 0,61 $\mu\text{g/L}$ de tétracycline ont été retrouvées [86]. Mais on ne sait pas très bien à quel degré et dans quelles circonstances les composés sont actifs après adsorption par les sédiments, ou s'ils sont relargués et peuvent contribuer à la résistance aux antibiotiques. Ce compartiment de l'environnement des rivières est loin d'être inerte et comporte des micro-organismes capables

de métaboliser ces molécules.

Les sols :

Les sols peuvent être contaminés par les aliments, par les déjections des animaux traités par des médicaments vétérinaires directement dans les prairies mais aussi par l'épandage sur les champs des boues des stations d'épuration ou des fumiers et purins produits dans les étables. Comme les urines et fèces des animaux sont déposés directement sur la terre, de fortes concentrations locales peuvent y être observées. On détecte des concentrations de tétracycline dans le sol au-delà de 0,3 mg/kg [46]. Selon la nature hydrophile ou hydrophobe des substances éliminées par les animaux, les pluies peuvent en entraîner et en disperser une partie vers les eaux souterraines ou les eaux de surface. Enfin, les résidus de médicaments peuvent agir sur les composants écologiques des sols, notamment sur la microflore.

Les eaux de boisson :

Au niveau des eaux de boisson, on retrouve aussi des antibiotiques mais en très faible concentration. La tylosine est par exemple retrouvée dans l'eau de consommation à des concentrations de 0,6 à 1,7 ng/L. Selon l'INVS, une consommation de deux litres d'eau du robinet par jour pendant une vie entière équivaudrait à une seule prise d'antibiotique [78]

II-4-2-2-2- Risques pour l'environnement

La très large et même la trop large utilisation des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire est à l'origine de leur introduction dans l'environnement. Or de nombreux antibiotiques sont excrétés de l'organisme sous forme inchangée et peuvent donc rester actifs et présenter des risques pour l'environnement. Ils peuvent se concentrer dans les chaînes environnementales. Leur capacité à s'accumuler dans les organismes est variable, mais elle peut être importante pour certains antibiotiques comme par exemple l'érythromycine [86]. Les antibiotiques peuvent induire des effets liés à leurs cibles spécifiques, c'est-à-dire influencer les biomasses bactériennes de l'environnement que ce soit dans les sols, les eaux superficielles, les stations d'épuration ou les réseaux de distribution d'eau potable. Un problème majeur concerne par exemple, les effets des antibiotiques relargués dans l'environnement sur les cyanobactéries, largement sensibles aux antibiotiques, qui constituent 70% de la masse totale de phytoplancton, et qui sont responsables de plus du tiers de la

production de l'Oxygène libre total, ou de la fixation du CO₂ [2].

Un autre problème, qui doit faire l'objet d'une évaluation, est celui de la relation avec la présence de bactéries antibiorésistantes. Il faut rappeler tout d'abord que l'antibiorésistance est un phénomène naturel et que des bactéries antibiorésistantes se retrouvent dans les environnements non contaminés par les usages d'antibiotiques. En effet, la grande majorité des antibiotiques couramment utilisés pour le traitement des infections ainsi que les gènes de résistance acquis par les pathogènes humains ont une origine environnementale [63]. D'ailleurs, le fait d'avoir retrouvé des microorganismes producteurs d'antibiotiques dans le sol a suggéré que le rôle primaire des antibiotiques est probablement d'être un inhibiteur de la croissance des micro-organismes en compétition [63]. Il est aujourd'hui très difficile de dire si oui ou non, les faibles concentrations d'antibiotiques retrouvées dans l'environnement aquatique sont responsables de l'apparition de résistances aux antibiotiques chez les bactéries de l'environnement. En effet, les résultats issus de la littérature à ce sujet sont très discordants.

Dans une étude de KÜMMERER (2004), il est rapporté que l'exposition de bactéries à des concentrations subthérapeutiques d'antibiotiques accélère la vitesse à laquelle les souches bactériennes résistantes sont sélectionnées. Dans une autre publication en 2009, KÜMMERER rapporte qu'il est connu que les antibiotiques à concentration sub-inhibitrice peuvent avoir un impact sur les fonctions cellulaires et changer l'expression génétique des facteurs de virulence ou le transfert de résistances antibiotiques. On sait que le transfert horizontal de gènes aussi bien que les bactéries elles mêmes déjà résistantes est causée par l'utilisation d'antibiotiques et particulièrement favorisée par la présence d'antibiotiques sur une longue période et à une concentration sub-thérapeutique, c'est-à-dire à des concentrations qui n'inhibent pas ou ne tuent pas toutes les bactéries sensibles à l'antibiotique. MARTINEZ (2008), rapporte que de faibles concentrations d'antibiotiques dans l'environnement peuvent déclencher des changements transcriptionnels spécifiques chez les bactéries qui peuvent avoir des conséquences bénéfiques pour la bactérie qui va moduler ses interactions avec la communauté microbienne. Cette capacité de signal à faible concentration a des implications cliniques car des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques pourraient favoriser la virulence bactérienne sous certaines conditions. Enfin, LÖFFLER (2003), signale que des macrolides et des sulfamides antibiotiques ont été retrouvés dans les eaux de l'environnement, et qu'ils sont appropriés pour la formation de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes.

En revanche, le lien entre la présence d'antibiotiques et le fait que cela favoriserait la sélection de bactéries résistantes aussi bien que le transfert de résistances à des concentrations aussi faibles que celles trouvées dans l'environnement n'est pas encore établi. Des résultats préliminaires indiquent que le transfert de résistances et la sélection de bactéries résistantes ne sont pas favorisés avec les concentrations d'antibiotiques retrouvées dans l'environnement [46]. Pour la ciprofloxacine et la ceftazidime, il a été conclu que les concentrations moyennes de ces composés retrouvées dans les eaux de surface sont à des niveaux de concentration trop bas pour entraîner des changements dans les populations bactériennes [46]. D'autres résultats publiés par KÜMMERER en 2009, indiquent que le transfert de résistances et la sélection de bactéries résistantes ne sont pas favorisés par les hautes concentrations en antibiotiques retrouvées dans les effluents hospitaliers, ni par les faibles concentrations que l'on retrouve dans l'environnement aquatique. Il précise également que les données utilisées pour évaluer l'effet des antibiotiques dans l'environnement ne permettent pas d'établir combien de temps les bactéries maintiennent leur résistance aux antibiotiques en l'absence d'une pression de sélection continue par ces antibiotiques. MUNIOZ-AGUAYO *et al.*, en 2007, indiquent qu'il est actuellement impossible de faire un lien direct entre la présence de bactéries antibiorésistantes et la présence de résidus d'antibiotiques dans les eaux. Ils n'ont d'ailleurs pas pu mettre en évidence que de faibles doses de chlortétracycline pouvaient sélectionner des souches de bactéries aérobies résistantes dans les écosystèmes de rivière *in vitro*. Ils émettent quand même l'hypothèse que de faibles concentrations d'antibiotiques dans l'environnement puissent sélectionner des populations bactériennes résistantes lorsqu'elles se concentrent dans les sédiments.

La présence d'antibiotiques peut aussi affecter la qualité des sols. Ils pourraient agir en perturbant la communauté bactérienne par leurs activités antibiotiques, et en créant des résistances parmi les bactéries environnementales ou en apportant des bactéries résistantes transmises par les fumiers et purins, c'est-à-dire créées dans le tube digestif des animaux traités [43]. Après épandage de ces purins et fumiers sur les sols, les bactéries résistantes à la tétracycline augmentent dans les sols mais aussi dans les eaux souterraines mais cette augmentation est réversible après cessation de la fertilisation.

Enfin l'environnement naturel représente un réservoir de gènes d'antibiorésistance tel, que des changements dans ces écosystèmes pourraient entraîner l'émergence de résistance inconnue chez les pathogènes. Les gènes de résistance inconnus aujourd'hui et qui peuvent émerger dans le futur, existent déjà dans des microorganismes de l'environnement que l'on ne

connait pas encore bien [63].

II-4-2-2-3 Risques pour l'homme

Les risques pour l'Homme liés à l'absorption éventuelle de petites doses de résidus de médicaments pendant la vie entière sont totalement inconnus. La présence de mélanges de ces résidus dans l'eau du robinet, certes à des concentrations extrêmement faibles, montre qu'il y a des voies directes d'absorption et des effets, peut-être synergiques, qu'il faudrait surveiller, notamment pour les populations les plus sensibles comme les enfants ou les femmes enceintes. En l'état actuel des connaissances, il semble que, même en absorbant deux litres d'eau du robinet par jour pendant toute la vie, la dose cumulée, suite à une contamination, ne dépasse pas la quantité d'une prise unique thérapeutique, à l'exception de cinq principes actifs pour lesquels le rapport entre la dose cumulée sur 70 ans et la dose thérapeutique est supérieure à 1, alors que pour la plupart des médicaments retrouvés dans les eaux, ce rapport est compris entre 10^{-4} et 10^{-9} . Mais nous ignorons les apports liés aux éventuels transferts alimentaires [86].

En ce qui concerne les antibiotiques, ce sont les personnes qui travaillent dans les élevages qui courent les plus grands risques d'antibiorésistance. En effet, les fréquences de ces antibiorésistances, notamment aux quinolones et aux glycopeptides, sont plus grandes parmi les éleveurs que parmi les populations vivant en zone urbaine. Il a été rapporté qu'une semaine de supplémentation chez des poulets par la tétracycline à faibles doses, utilisée comme facteur de croissance, avait suffi pour faire apparaître la résistance de tous les *Escherichia coli* isolés des fécès, mais il a été aussi observé que 31% des fermiers présentaient des souches d'*E. coli* résistantes à la tétracycline quatre à six mois après introduction de cette pratique [86]

Un des risques pour l'Homme est l'ingestion de résidus d'antibiotiques par les poissons et les coquillages commercialisés avec le risque d'altérer la flore intestinale normale, ce qui augmenterait la sensibilité aux infections bactériennes et le risque de sélection de bactéries antibiorésistantes [86]. On observe que le traitement médicamenteux par ATB a une influence importante sur la fréquence du transfert de gènes au sein de la microflore intestinale [87]. Cette ingestion, qui concerne aussi les viandes, peut également générer des problèmes d'allergie et de toxicité qui sont difficiles à diagnostiquer en l'absence d'information préventive.

D'autre part, les antibiotiques vont posséder vis à vis de l'homme une nocivité indirecte. Ce n'est pas seulement l'usage direct des antibiotiques, mais aussi le contact indirect avec eux qui peut augmenter la résistance des bactéries, ne prenant pas en compte leur origine. On retrouve des gènes de résistance sur des bactéries d'origine humaine, animale et environnementale. Des bactéries à Gram négatif, porteuses de bêta-lactamases à spectre étendu sont isolées dans des hôpitaux partout à travers le monde, ce qui pose un sérieux problème thérapeutique en médecine humaine [43]. Un des problèmes posés est celui de la sécurité alimentaire car il peut se produire une colonisation du tube digestif humain par des bactéries résistantes à certains antibiotiques [66]. Mais le risque le plus important, voire le danger principal, de l'utilisation d'antibiotiques dans l'alimentation des animaux ne provient pas des résidus ingérés par le consommateur mais bien de la sélection de bactéries résistantes susceptibles de se transmettre à l'homme par l'alimentation ou du transfert de gènes de résistance à l'homme. MOUBAREK *et al.* (2003) rappellent qu'au Danemark, deux patients sont morts d'une infection à *Salmonella Typhimurium* DT104, cette souche bactérienne provenant d'une viande de porc contaminée. Des observations similaires ont été faites pour *Campylobacter*. En effet, aux Etats-Unis, l'utilisation de fluoroquinolones a sélectionné un réservoir de *Campylobacter jejuni* résistants et une augmentation parallèle des infections acquises à *Campylobacter* résistants aux quinolones s'est développée [86].

La mise en évidence du fait que les bactéries résistantes aux antibiotiques et que les déterminants de cette résistance passent de l'environnement aquatique à l'environnement terrestre, a déjà eu pour résultante une restriction drastique de l'usage des antibiotiques en aquaculture dans de nombreux pays. Ces restrictions ont inclus une augmentation des contrôles de prescriptions d'antibiotiques et une presque totale disparition de leur usage à titre prophylactique. Les quinolones qui sont des antibiotiques efficaces dans les affections humaines, ont été totalement bannies en aquaculture du fait de leur capacité à engendrer des résistances croisées, mais aussi en raison de leur durée de vie prolongée dans les sédiments liée à leur faible biodégradabilité [86]. L'appel pour un usage thérapeutique rationnel des antibiotiques, aussi bien en médecine humaine que animale, est basé sur l'observation de l'augmentation des résistances antibiotiques. C'est depuis 1969 que le Swann Committee a conclu que les antibiotiques utilisés en médecine humaine ainsi que ceux qui provoquent des résistances croisées ne devraient pas être utilisés comme facteurs de croissance chez les animaux [43].

II-5- La pollution microbiologique

II-5-1- Généralités

La pollution microbiologique est une autre forme de pollution organique. De nombreux microorganismes, virus, bactéries et protozoaires, voire des champignons et des algues sont présents dans l'eau. Ces germes peuvent provoquer des maladies aussi graves que le choléra, la typhoïde, la dysenterie... Ils ont été jadis responsables d'épidémies dramatiques dans nos pays.

Les micro-organismes susceptibles de contaminer les sources d'eaux proviennent en majorité des excréments humains ou animaux qui peuvent contenir des agents pathogènes. Ils peuvent provenir notamment de mauvais raccordements d'habitations au réseau d'assainissement, de débordements des réseaux d'eaux usées et de rejets de station d'épuration d'eaux résiduaires. Le ruissellement sur les sols lors de pluies importantes, notamment dans les zones où l'épandage de boues d'épuration est réalisé, est aussi une source importante de la contamination microbiologique des milieux aquatiques. Enfin, ces contaminations peuvent également provenir de fosses septiques défectueuses, de fuites de canalisations d'égouts, des décharges et des cimetières. Aujourd'hui, cette pollution des eaux continentales a fortement diminué dans les pays industrialisés grâce à la mise en service de stations d'épuration qui assurent l'assainissement des eaux usées avant leur rejet dans la nature. Mais cela n'est pas le cas des pays en développement où elle provoque encore des morts innombrables.

Ces contaminations, quand elles existent, vont se retrouver dans les eaux environnementales. C'est le cas par exemple de *cryptosporidium*, un parasite protozoaire, qui colonise l'intestin de l'homme, du veau et de nombreux autres mammifères. Les parasites excrétés se retrouvent alors dans l'eau, et peuvent, en l'absence de filtration efficace se retrouver dans le réseau d'eau de distribution. D'autres agents pathogènes, comme certaines bactéries de l'environnement peuvent coloniser les réseaux d'eau et causer des maladies, notamment chez les sujets fragilisés. Dans ces cas, l'infection n'est pas liée à l'ingestion mais se fait par contact au niveau des muqueuses ou des plaies (*Pseudomonas aeruginosa*) ou par inhalation (*Legionella pneumophilla*). Citons également certains microorganismes capables de survivre dans l'eau : *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* ou *paratyphi* et *Escherichia coli*. Enfin citons quelques germes qui se développent dans l'eau : les *Pseudomonas*, les *Aeromonas* et les *Legionella* [94]

II-5-2- Caractérisation microbiologique des différentes eaux

Les effluents hospitaliers ont une qualité proche de celle des effluents domestiques [41 ;17]. La flore hospitalière est composée de la flore des malades, du personnel soignant, des visiteurs, et des germes de l'environnement présents sur les sols, les surfaces, le matériel, dans l'eau et dans l'air. On va retrouver dans cette flore des agents strictement pathogènes, qui sont responsables d'infections transmissibles (tuberculose, infections à méningocoques, salmonelloses...) et également des agents saprophytes ou commensaux comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et autres entérobactéries, *Enterococcus faecalis* ou encore *Pseudomonas aeruginosa*. Ces différents agents vont souvent développer des résistances aux antibiotiques et peuvent provoquer des infections opportunistes.

En ce qui concerne la flore totale, les valeurs retrouvées dans les effluents liquides hospitaliers révèlent des concentrations assez faibles, de l'ordre de $3 \cdot 10^8$ UFC/L [4]. En comparaison, les valeurs pour la flore totale généralement présente dans les rejets liquides communaux est de 10^{11} UFC/L, [4 ;62]. Cette observation est probablement due à la présence en concentrations élevées de substances chlorées et autres substances désinfectants dans les effluents hospitaliers [62]. Il faut signaler que l'hôpital est aussi un grand consommateur d'eau. La consommation par lit et par jour varie de 400 à 1200 litres, alors que la consommation domestique représente 150 à 200 litres par habitant et par jour. Ces volumes plus importants à l'hôpital, entraînent une dilution des effluents hospitaliers et permettent d'expliquer également les plus faibles concentrations en microorganismes comparés aux effluents urbains [41]. D'autres données donnent une concentration en germes témoins de 10^7 à 10^9 germes par litre dans les effluents hospitaliers [17]. Pour les coliformes totaux dans les effluents hospitaliers ces valeurs se situent autour de $1 \cdot 10^8$ UFC/L alors que le taux de coliformes dans les eaux usées au niveau d'une station d'épuration est de $2,6 \cdot 10^7$ UFC/L [84]. BOILLOT (2008) rapporte des concentrations de $2 \cdot 10^4$ et $2 \cdot 10^7$ UFC/L de coliformes fécaux dans les effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France, alors que la concentration moyenne est de 10^9 UFC/L dans les effluents urbains. Enfin LOPEZ *et al.* (2009) donnent des valeurs pour les coliformes totaux de 10^7 à $3 \cdot 10^9$ UFC/L dans les effluents hospitaliers et des valeurs de 10^{11} à 10^{13} UFC/L dans les effluents urbains. JEHANNIN (1999) indique que les eaux usées hospitalières ne seraient pas davantage polluées bactériologiquement que les eaux usées urbaines, exception faite pour *Pseudomonas aeruginosa* (concentrations plus de 10 fois supérieures) et les Staphylocoques pathogènes.

D'autres auteurs montrent que 95% des échantillons d'eaux usées hospitalières sont positifs pour *P. aeruginosa* alors que 70% sont positifs dans les eaux usées urbaines [80]

En utilisant des entérocoques, des staphylocoques, des *Enterobactériaceae* et des bactéries hétérotrophes en tant qu'indicateurs de présence des bactéries multirésistantes dans les biofilms formés dans le réseau d'assainissement hospitalier, SCHWARTZ *et al.* (2003) ont relevé une importante présence de germes multirésistants aux antibiotiques. Les effluents hospitaliers, même s'ils ne présentent pas des concentrations élevées en germes, peuvent contenir des germes plus résistants rendant les traitements antibiotiques inefficaces. Certains germes hospitaliers peuvent se retrouver en concentration plus forte dans un effluent d'hôpital. Le danger que représentent alors ces germes spécifiques est à relier avec leur caractère éventuellement antibiorésistant [41].

Les eaux brutes représentent des eaux que l'on va utiliser pour produire de l'eau pour consommation humaine. Elles vont devoir subir des traitements pour être rendues potables, mais elles doivent répondre à certains critères microbiologiques avant de pouvoir être potabilisées. Ces eaux brutes peuvent être des eaux de surface ou des eaux souterraines. Des valeurs guides en termes de bactériologie sont fixées par la réglementation [94]. Pour les eaux de surface, les coliformes totaux ne doivent pas dépasser 500 000 UFC/L, les *Escherichia coli* 200 000 UFC/L et les entérocoques 100 000 UFC/L. Pour les eaux souterraines les limites sont fixées à 200 000 UFC/L pour *Escherichia coli* et 100 000 UFC/L pour les entérocoques. Enfin pour les eaux de consommation, les normes correspondent à 0 *Escherichia coli* par litre et 0 entérocoques par litre [94].

III- LES BACTERIES MULTIRESISTANTES DANS L'ENVIRONNEMENT

Comme nous l'avons vu précédemment, certaines bactéries multirésistantes aux antibiotiques, issues notamment de l'hôpital, se retrouvent dans l'environnement. Nous allons tout d'abord décrire quelques-unes des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Nous mettrons par ailleurs en évidence la contamination des milieux par des BMR. Nous verrons ensuite quelles sont les origines de ces contaminations environnementales par des bactéries multirésistantes, et enfin nous évaluerons les conséquences de leur présence dans

l'environnement.

III-1- Le point sur quelques bactéries multirésistantes

III-1-1- Les Entérobactéries à bêta-lactamases à spectre étendu

Les entérobactéries regroupent 40 genres différents et près de 200 espèces. Les genres les plus représentatifs sont *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, ou encore *Yersinia*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, qui peuvent être mobiles, pouvant se développer aussi bien en aérobie qu'en anaérobie. Elles sont catalase-positives et oxydase-négatives. Elles sont largement retrouvées sur les plantes, dans le sol, dans l'eau et le tube digestif des hommes et des animaux, d'où leur nom. Les entérobactéries sont largement impliquées dans les infections gastro-intestinales, urinaires et nosocomiales. La multirésistance de ces souches est un critère de gravité supplémentaire pour ces infections. Chez les bacilles Gram négatif, il existe 3 types de mécanismes de résistance aux bêta-lactamines : la faible affinité pour les protéines de liaison aux pénicillines, les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux, et surtout l'inactivation enzymatique par les bêta-lactamases [14]. L'émergence et l'augmentation exponentielle de souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, en particulier chez *Klebsiella pneumoniae* constitue un phénomène inquiétant [32].

III-1-1-1- les bêta-lactamases

Les bêta-lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des infections par les entérobactéries. Il existe un grand nombre de molécules différentes, de faible toxicité, d'activité bactéricide et avec un large spectre d'action. Les cibles des bêta-lactamines sont des protéines membranaires des bactéries appelées protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Elles présentent une analogie de structure avec le substrat naturel des PLP. L'antibiotique se lie alors au site actif des PLP pour former un complexe pré-covalent, puis le cycle bêta-lactame des bêta-lactamines s'ouvre pour former une liaison covalente irréversible avec la sérine active de la poche catalytique des PLP. Cette liaison induit un arrêt de la synthèse du peptidoglycane et de la croissance bactérienne. L'effet bactéricide des bêta-lactamines résulte de phénomènes secondaires qui sont mal compris .

Les bêta-lactamases sont des enzymes produites par les entérobactéries et qui constituent leur principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines. L'inactivation des bêta-lactamines est due à l'ouverture du cycle bêta-lactame au niveau de la liaison amide, selon une réaction d'hydrolyse suite à l'activation d'une molécule d'eau. Les bêta-lactamases sont réparties en 4 classes selon la classification d'Ambler qui les désigne de A à D. Les protéines de la classe A, C et D sont des enzymes à sérine active et les enzymes de la classe B correspondent à des métalloenzymes à zinc

Bêta-lactamases de classe A : Ce sont des enzymes actives sur les pénicillines et à un moindre degré sur les céphalosporines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique. Ce sont des enzymes à médiation chromosomique ou plasmidique. Elles comprennent les bêta-lactamases de type TEM, SHV et CTX-M.

Bêta-lactamases de classe B : Elles sont actives sur les carbapénèmes et les céphalosporines. Elles sont insensibles à l'acide clavulanique et leur médiation est chromosomique ou plasmidique. Elles sont inhibées par l'EDTA et généralement sensibles à l'aztreonam.

Bêta-lactamases de classe C : Ce sont des céphalosporinases. Elles sont actives sur les céphalosporines de première génération et plus ou moins actives sur les céphalosporines de deuxième et troisième génération. Elles sont insensibles à l'acide clavulanique et leur médiation est le plus souvent chromosomique.

Bêta-lactamases de classe D : Ce sont des enzymes qui sont actives sur les pénicillines et plus particulièrement sur les pénicillines M. Elles sont plus ou moins sensibles à l'acide clavulanique. Elles comprennent les enzymes de type OXA.

III-1-1-2- les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les premières bêta-lactamases (pénicillinases à spectre étroit) plasmidiques (TEM-1/2, SHV-1) ont été initialement décrites dans les années 60 chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et ont très vite diffusé parmi d'autres espèces (entérobactéries, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*). L'émergence de ces enzymes a conduit à développer de nouvelles bêta-lactamines stables (notamment céphalosporines à spectre élargi) dans les

années 70-80. Cependant, leur utilisation intensive en clinique s'est accompagnée de l'apparition précoce de résistances. Ainsi, la première béta-lactamase capable d'hydrolyser les céphalosporines à spectre élargi (SHV-2, mutant ponctuel de SHV-1) a été décrite en 1985 dans une souche de *K. pneumoniae* en Allemagne [14]. Du fait de leur élargissement de spectre d'activité, ces enzymes ont été appelées «béta-lactamases à spectre étendu» (BLSE), et à ce jour de nombreuses BLSE (plus de 230) ont été décrites à travers le monde représentant un problème majeur de santé publique [14].

À l'exception des BLSE de type OXA (classe D), les BLSE sont des béta-lactamases de classe A (comme TEM1/2 et SHV-1). Elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième et troisième génération (céfotaxime, ceftazidime) et de quatrième génération (céfépime) et les monobactames (aztréonam). Par contre, les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines (céfoxitine, céfotétam) et aux carbapénèmes (imipénème). Enfin, les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de béta-lactamases comme l'acide clavulanique ou le tazobactam.

Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSE détectées étaient des dérivés de TEM-1/2 et de SHV-1 après évolution de ces enzymes «anciennes» par mutations ponctuelles. Les souches productrices de BLSE étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales, notamment en unités de soins intensifs. La prévalence des BLSE était plus forte chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli* [8].

À partir de 1995, de «nouvelles» BLSE (notamment CTX-M) ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a complètement changé au niveau mondial. En effet, la plupart des souches productrices de BLSE sont maintenant des souches de *E. coli* exprimant des BLSE de type CTX-M, et responsables d'infections communautaires, notamment urinaires. De plus, le nombre de souches productrices de BLSE augmente aussi dans les services hospitaliers. Contrairement aux BLSE de type TEM/SHV, les mécanismes de diffusion de CTX-M semblent plus complexes, mettant en jeu plutôt la diffusion de plasmides (épidémies de plasmides) et/ou d'autres éléments génétiques mobiles que la diffusion unique d'un clone bactérien. Les autres BLSE (PER, VEB, GES, SFO, BEL, TLA) restent plus rares et sont principalement détectées chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* [14].

En France, la première épidémie à entérobactérie productrice de BLSE a été décrite en 1985 : il s'agissait d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* résistante aux amino, carboxy, et uréido-pénicilline et à l'ensemble des céphalosporines à l'exception des céphamycines [89].

Les BLSE de type TEM : Elles dérivent toutes, à l'origine, de TEM-1, bêta-lactamase la plus fréquemment rencontrée chez les bacilles à Gram négatif. Elles sont habituellement corésistantes aux aminosides, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones. Elles sont retrouvées surtout chez *Klebsiella spp.* et *E.coli*.

Les BLSE de type SHV : Elles proviennent toutes à l'origine de SHV-1, retrouvée chez *K. pneumoniae*. Elles sont habituellement corésistantes aux aminosides, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones. On les retrouve surtout chez *Klebsiella spp* et *E. coli*.

Les BLSE de type CTX-M : Ce sont des BLSE de type non TEM, non SHV. Elles ont émergé plus récemment et ce sont les plus répandues actuellement, après une diffusion mondiale rapide à partir du milieu des années 90. En France, leur prévalence est croissante, notamment chez *E. coli*. Elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime plutôt que la ceftazidime, d'où leur nom de céfotaximases. En effet, les bactéries productrices de CTX-M sont résistantes au céfotaxime (CMI > 64 µg/mL) et plus ou moins sensibles à la ceftazidime (CMI de 2 à 8 µg/mL), tandis que les CMI de l'aztréonam sont variables. Les gènes de ces enzymes proviendraient du chromosome de souches environnementales, notamment de *Kluyvera sp.*, germe non pathogène [7, 14]. Depuis leurs progéniteurs, les gènes ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles type séquence d'insertion, ou à des phages, et transférés sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes. Les premières souches productrices de CTX-M ont été décrites dans les années 80 de façon sporadique, et à partir des années 90, en une quinzaine d'années, elles ont diffusé partout à travers le monde. La situation est endémique dans la plupart des pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud, avec une prévalence des CTX-M parmi les souches productrices de BLSE de 30 à 90% pour *E. coli* et 10 à 60% pour *K. pneumoniae*. La large diffusion des CTX-M a changé considérablement l'épidémiologie des BLSE à l'hôpital mais aussi dans la communauté. De plus, le portage digestif de souches productrices de BLSE est devenu non négligeable avec un réservoir de BLSE animal important. Les plasmides CTX-M portent souvent d'autres gènes de résistance (notamment aux aminosides, aux tétracyclines, aux sulfamides et au triméthoprime) d'où la notion de co-résistance, co-expression et co-sélection. De plus, la plupart des souches productrices de CTX-M sont résistantes aux fluoroquinolones.

La sensibilité des BLSE aux bêta-lactamines inhibitrices reste généralement suffisante pour être à la base de la détection de ce phénotype qui repose sur la mise en évidence d'une

image de synergie dite « en bouchon de champagne » entre les inhibiteurs et les C3G et/ou les C4G et/ou l'aztréonam.

Les BLSE de type OXA (Oxacillinase) : Elles appartiennent à la classe D, et elles confèrent la résistance à l'ampicilline et à la céfalotine, et sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline, cloxacilline). De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des bêta-lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G mais l'évolution par mutations ponctuelles vers un élargissement du spectre a dû avoir lieu comme pour les dérivés de TEM/SHV.

III-1-1-3- Quelques espèces d'importance

Escherichia coli : Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et à la classe des *γ-proteobacteria*. *Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia*. C'est un bacille à Gram négatif, non sporulé, parfois capsulé, assez grand (1-1,5 x 2-6 μm), non exigeant, catalase positif, oxydase négatif, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche. Il réduit les nitrates en nitrites et fermente le glucose, avec production de gaz en général [57]. Il existe des souches atypiques représentées par *Escherichia coli* formant des colonies naines, *E. coli* ayant perdu des caractères, des variétés muqueuses, et enfin *E. coli* ayant acquis des caractères métaboliques.

Escherichia coli, hôte commensal de l'intestin, est associé à de nombreuses pathologies intestinales et extra-intestinales, tant chez l'homme que chez les animaux domestiques [73 ;60 ;57]. L'appellation commune « collibacile » est une contraction de « bacille du côlon » qui rappelle son caractère de bactérie commensale du tube digestif. Chez l'Homme, il représente l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie (10^6 à 10^8 bactéries par gramme de selle chez l'adulte). À ce titre, sa présence dans l'eau, les aliments ou le sol, est recherchée comme indicatrice d'une contamination fécale du milieu.

L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'homme et les animaux sur la base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques qui sont responsables de leur pouvoir pathogène. Ces souches sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal et en souches à tropisme extra-intestinal [60].

Parmi les souches à tropisme intestinal, on va distinguer les *E. coli* entéropathogènes

(EPEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroinvasif (ECEI), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéroagrégatifs (ECEAg) et les *E. coli* à adhésion diffuse (ECAD) [72]. Elles sont responsables d'infections intestinales provoquant des diarrhées importantes. Ces souches vont posséder des facteurs de virulence (facteurs de colonisation, toxines...) qui peuvent être identifiés. C'est le cas par exemple de l'intimine, codée par le gène *eae*, qui est impliquée dans l'adhésion intime des bactéries à la cellule hôte. On peut citer également la production de Shiga toxines (Stx1 et/ou Stx2) qui sont responsables en grande partie des troubles cliniques observés pour les EHEC, nommées alors STEC, ou encore les entérotoxines LT impliquées dans les ETEC. Les souches qui n'ont pas un tropisme intestinal peuvent alors causer des infections urinaires (90% des infections communautaires du tractus urinaire survenant sur un arbre urinaire anatomiquement normal), des méningites-septicémies ou parfois des pneumonies, et des infections intra-abdominales.

Escherichia coli est naturellement sensible aux antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif. Cependant, les souches résistantes sont également fréquentes, et on voit apparaître notamment des résistances aux céphalosporines de troisième génération (C3G) par production de BLSE. Les BLSE, initialement hospitalières, sont apparues par la suite en ville (souches communautaires). Les animaux de rente et les animaux de compagnie, sont reconnus de plus en plus comme des réservoirs de *E.coli* producteurs de BLSE [74]. La résistance aux carbapénèmes est à ce jour exceptionnelle aussi bien en ville qu'à l'hôpital, et ne sévit que sous forme de bouffées épidémiques. Les traitements des infections à *E. coli* ont été de plus en plus compliqués par l'émergence de résistance à la plupart des antibiotiques utilisés en première ligne, comme les fluoroquinolones. Ce problème est particulièrement sérieux dans certains pays. La résistance à la Ciprofloxacine en 2003 chez des isolats de *E.coli* invasifs était de 26% au Portugal, 25% en Italie et 21% en Espagne [74]. Le réseau REUSSIR, de l'ONERBA, retrouve en 2007, 12,8% d'*E. coli* résistants aux fluoroquinolones.

Klebsiella : Le genre *Klebsiella* fait partie de la famille de *Enterobacteriaceae*. Il regroupe des espèces immobiles, Gram-négatives, oxydase-négatives, indole et uréase variables. Le genre *Klebsiella* comporte actuellement deux espèces : *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca*. *Klebsiella pneumoniae* est une espèce isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux et de muqueuses de mammifères, en particulier de la flore fécale. Chez l'homme, cette espèce est isolée des selles chez 30% des individus et dans certaines circonstances pathologiques communautaires et

nosocomiales. Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections bronchopulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosantes, les abcès pulmonaires et les pleurésies purulentes, ainsi que des infections intra-abdominales. Elle est surtout un agent d'infections nosocomiales, responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies, de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales. *Klebsiella oxytoca* est isolée à partir de prélèvements alimentaires, et à partir de la flore commensale du tube digestif ainsi que dans des prélèvements cliniques urinaires, bronchopulmonaires et de plaies [21]. Les facteurs de pathogénicité ont été étudiés essentiellement chez *K. pneumoniae* et comportent les adhésines, la résistance au pouvoir bactéricide du sérum, les antigènes capsulaires, le lipopolysaccharide et les sidérophores [21].

Les *Klebsiellae* sont naturellement résistantes aux pénicillines des groupes G et A et à la carbénicilline, et sensibles aux antibiotiques actifs sur les bactéries Gram-négatives. Les souches hospitalières ont acquis une BLSE de type SHV-5 ou TEM-10 et TEM-12, codée par un plasmide, et conférant une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines, à l'exception des céphamycines et de l'imipénème. La fréquence de ce mécanisme de résistance varie entre 5 et 40% en fonction des centres hospitaliers. Récemment des souches productrices de BLSE résistantes à l'imipénème par sécrétion d'une bêta-lactamase de type AmpC ont été décrites [21].

Enterobacter: Le genre *Enterobacter* comprend 15 espèces. *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes* sont les espèces les plus fréquemment isolées en clinique en France. Ce genre a pris ces dernières années une importance croissante du fait de son implication dans les infections nosocomiales et de sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques actuellement utilisés en milieu hospitalier. Les patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs sont particulièrement exposés à des infections dues à des souches multirésistantes [18].

Enterobacter cloacae est l'espèce type du genre *Enterobacter*. Présent dans la flore normale du tractus gastro-intestinal, il est très souvent isolé dans les prélèvements d'origine clinique. Il est impliqué dans 10% des péritonites post-chirurgicales, 5% des septicémies et des pneumonies nosocomiales et 4% des infections urinaires [18]. Il a été isolé à partir d'aliments, de crudités mais aussi dans de l'eau de boisson. Il est naturellement résistant à l'ampicilline, à la céfalotine et à la céfoxitine par production à bas niveau d'une céphalosporinase. *E. cloacae* possède une céphalosporinase chromosomique inductible dont

la dérégulation par mutation peut entraîner la résistance à un grand nombre de bêta-lactamines y compris la ceftazidime. En 1989, sont apparus les premiers cas d'infections nosocomiales dues à des souches possédant une BLSE. Ces BLSE entraînent une résistance aux C3G. Diverses BLSE de type TEM, SHV et CTX-M ont été mises en évidence chez *E. cloacae*. L'imipénème reste la molécule la plus efficace. Pour les aminosides, les pourcentages de souches résistantes sont variables. En ce qui concerne les quinolones, *E. cloacae* est l'une des Entérobactéries avec *E.coli* et *K. pneumoniae* chez lesquelles la résistance d'origine plasmidique a été initialement observée. *E. aerogenes* peut également posséder une BLSE. Les premiers cas d'infections nosocomiales à *E. aerogenes* possédant une BLSE remontent à 1993. La diffusion épidémique d'un clone producteur d'une BLSE de type TEM-24 a alors été observée dans toute la France. Reconnu pendant longtemps comme la principale entérobactérie productrice d'enzymes hydrolytiques, il a été rattrapé à ce jour par *E. coli*.

Serratia : Les *Serratia* sont très répandues dans la nature. On les retrouve dans l'eau, le sol et les plantes. Les mammifères, dont l'homme, mais également les reptiles et les insectes sont colonisés et quelquefois infectés par contact avec ces environnements. L'eau constitue la principale niche écologique pour nombre de *Serratia* dont *Serratia marcescens*. Les espèces de *Serratia* sont rarement responsables d'infections chez les sujets sains. Elles sont en effet surtout impliquées dans des complications infectieuses chez les sujets immunodéprimés [31].

Serratia marcescens est l'espèce type et la plus fréquente des espèces de *Serratia*. Elle a été fréquemment impliquée dans des épidémies nosocomiales en milieu hospitalier. Elle représente 1 à 3% des infections acquises à l'hôpital. Elle est impliquée dans 4% des pneumonies, 2% des bactériémies et infections ORL, 1% des infections urinaires et cardiovasculaires et 3,5% des infections sur brûlures [31]. Deux types d'infections à *S. marcescens* sont rapportés en dehors du milieu hospitalier : des infections de la conjonctive à la suite du port de lentilles de contact et des endocardites secondaires à l'injection de drogues par voie intraveineuse. *Serratia marcescens* est parmi les plus résistantes aux antibiotiques rencontrées à l'hôpital. Les souches sont toujours résistantes à l'ampicilline, à la céfalotine et aussi à la colistine. Des résistances plasmidiques de type BLSE (TEM et SHV) ont été décrites. La plupart des souches en Europe et aux Etats-Unis sont sensibles à la gentamicine et à l'amikacine. La résistance aux fluoroquinolones est malheureusement en augmentation.

Pantoea : *Pantoea agglomerans* est présente dans l'environnement (eau, plantes, graines). Au début des années 1970, *P agglomerans* a été mise en cause dans une vaste épidémie de septicémies dans 25 hôpitaux aux Etats-Unis et causée par l'injection de liquides de perfusion contaminés. Le genre *Pantoea* rassemble des souches généralement pigmentées en jaune, gélatinase-positives et LDC-négatives. *Pantoea agglomerans* est résistante à l'ampicilline, à la carbénicilline et à la céfalotine et variablement sensible aux autres antibiotiques habituellement testés sur les bacilles Gram négatifs.

III-1-2- *Aeromonas*

Les *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies, mobiles par ciliature polaire, habituellement monotriches, dotés d'une oxydase. Leur identification repose d'ailleurs sur la positivité du test de l'oxydase. Le réservoir naturel des *Aeromonas*, bactéries ubiquistes dulçaquicoles, est l'environnement hydrique, stagnant et souillé de préférence. Les eaux d'égouts sont fréquemment contaminées, mais aussi les eaux de mer et de lagunes recevant de l'eau douce polluée par des rejets d'eaux usées. Les eaux de surfaces sont plus contaminées (10^4 UFC/L) que les eaux souterraines. Des concentrations parfois élevées (10^3 UFC/L) ont été relevées dans des eaux potables même après chloration. Les *Aeromonas* peuvent persister plusieurs mois, voire plusieurs années dans l'eau et dans le sol, qui constitue un réservoir [35]. L'existence d'un portage intestinal transitoire chez l'homme a été démontrée. De nombreux animaux sont porteurs d'*Aeromonas* : les sangsues médicinales, les grenouilles, des poissons, des oiseaux, des cafards. Ils peuvent alors contaminer l'eau et les aliments.

Le syndrome clinique le plus fréquent est une gastro-entérite infectieuse. On les constate surtout en zone tropicale. Ils sont à l'origine de toxi-infections alimentaires. Des manifestations extra-digestives existent. Ce sont des infections de plaies, de brûlures, de gelures ou de fractures ouvertes. Elles sont consécutives à un contact avec l'eau, le sol, des végétaux, ou des produits de pêche. Les affections en résultant ressemblent, pour la plupart, à des abcès sous-cutanés avec écoulement de pus couleur brun chocolat et des dermo-hypodermes avec une réaction inflammatoire localisée du tissu sous-cutané, pouvant dans les formes fulminantes évoluer en gangrène. La complication la plus grave des infections à *Aeromonas* est la bactériémie.

En dehors des enzymes favorisant l'infection (protéases, élastase, Dnase,

Phospholipase, lipase) les *Aeromonas* produisent diverses toxines. L'aérolysine, encore appelée entérotoxine cytolytique ou bêta-hémolysine, thermolabile, est le principal facteur de virulence impliqué dans les diarrhées. Elle va former des pores dans les membranes cellulaires, ayant un effet hémolytique, cytotoxique, et provoquant une accumulation hydrique dans l'anse iléale. Le gène de l'aérolysine est présent dans toutes les souches d'*Aeromonas* hémolytiques d'origine clinique ou environnementale. Ils peuvent produire également des cytotonines et des sidérophores phénoliques.

Les *Aeromonas* sont sensibles en général aux fluoroquinolones, à l'acide nalidixique, aux aminosides, au chloramphénicol, aux cyclines et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. On observe l'apparition de souches résistantes à la ciprofloxacine et la norfloxacine. Des souches d'*Aeromonas spp.* environnementales isolées d'eaux fluviales montraient des résistances à la tobramycine, à la tétracycline, à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et à l'acide nalidixique. La résistance naturelle des *Aeromonas* est associée à la production d'une à trois bêta-lactamases appartenant aux classes B, C ou D d'Ambler. On observe une carbapénémase (classe B), une céphalosporinase de classe C ou encore une oxacillinase de classe D. On peut également retrouver une enzyme plasmidique de type TEM. Enfin, des *Aeromonas spp.* producteurs de BLSE ont été retrouvés dans les eaux de la Seine, indiquant ainsi qu'ils peuvent participer à la dissémination des BLSE [34].

III-1-3- *Pseudomonas aeruginosa*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* et des genres apparentés (*Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*...) sont caractérisées par leur caractère ubiquiste : eaux (eaux douces polluées ou non, stagnantes ou courantes, eaux de mer), sol, végétaux, poussières en suspension dans l'air... Leurs exigences nutritives modestes leur permettent de survivre et de se multiplier sur des surfaces humides. De ce fait elles seront fréquemment rencontrées en milieu hospitalier aussi bien dans l'environnement humide proche du malade (évier, siphons, vases, cantines, objets et linge de toilette), que dans de nombreux produits liquides parmi lesquels les solutions antiseptiques.

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif de 1 à 3 µm de long et de 0,5 à 1µm de large. Il peut être cultivé facilement sur tous les milieux en aérobiose. Il dégage une forte odeur aromatique de seringat. Une des caractéristiques de cette espèce est la production de

pigments qui vont servir à son identification. Ils sont fluorescents comme la pyoverdine ou non fluorescents comme la pyocyanine [40].

P. aeruginosa, ou bacille pyocyanique, est l'espèce du genre la plus fréquemment isolée en pathologie infectieuse. Elle va être rencontrée au niveau du tube digestif, de la gorge, du nez ou de la peau. Ce portage augmente de façon significative avec le temps d'hospitalisation. Peu virulent pour un individu normal, la bactérie exerce son pouvoir pathogène en général à la faveur d'un état d'immunodépression et peut alors être un agent infectieux redoutable. Le plus souvent on voit avec *P. aeruginosa* des infections nosocomiales acquises lors de l'hospitalisation, qui vont entraîner le plus fréquemment une colonisation du tube digestif, du tractus respiratoire, de zones cutanées humides et le tractus urinaire. C'est l'exemple type de la bactérie pathogène opportuniste. Il va infecter préférentiellement des sujets immunodéficients ou affaiblis comme les brûlés, les cancéreux, les malades d'unités de soins intensifs, les transplantés, les dialysés...

Le pouvoir pathogène du bacille pyocyanique est attribué à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires. Parmi les facteurs membranaires, on peut distinguer les pili, les adhésines non piliées, le flagelle et l'alginate, qui interviennent principalement dans l'adhérence de la bactérie aux muqueuses et dans la formation des biofilms [64]. Les facteurs extracellulaires sont les exotoxines, les protéases, les hémolysines, la phospholipase et les toxines protéiques dont le rôle principal est l'altération des cellules épithéliales et leucocytaires et la dégradation des tissus.

P. aeruginosa exprime des résistances naturelles à de nombreux antibiotiques et possède la capacité d'acquérir de nombreux mécanismes de résistance. La résistance aux fluoroquinolones par exemple, est principalement acquise par mutation et sélection en résultat d'une exposition aux fluoroquinolones. Pour les isolats cliniques, l'exposition aux antibiotiques est reconnue comme étant le principal facteur de risque pour l'acquisition de résistances aux fluoroquinolones et aux bêta-lactamines. D'un autre côté, les désinfectants, intensément utilisés dans les hôpitaux, sont les cibles des systèmes d'efflux de *P. aeruginosa*. En conséquence de l'usage intensif de désinfectants à l'hôpital, ces produits se retrouvent à haute concentration dans les eaux usées hospitalières et peuvent exercer une pression de sélection sur les souches de *P. aeruginosa* [80].

Des fluides biologiques variés, de patients colonisés ou infectés par *P. aeruginosa* sont rejetés dans le réseau des eaux usées de l'hôpital et pourraient contaminer l'environnement. La dissémination de souches résistantes aux antibiotiques pourrait alors représenter un risque

de santé publique, cette espèce étant bien adaptée pour survivre et se multiplier dans cet environnement.

III-1-4- Entérocoques résistants aux glycopeptides

Le genre *Enterococcus* rassemble les espèces de streptocoques fécaux du groupe D. Il inclut aujourd'hui 27 espèces dont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. Les entérocoques font partie de la flore normale du tube digestif de l'homme et des animaux. Ils peuvent également coloniser la bouche, les voies respiratoires supérieures, le vagin ou la région périnéale. Ils sont définis par une coloration de Gram positive, un aspect ovoïde de cocci disposées par paires ou en courtes chaînettes.

Ce sont des bactéries opportunistes fréquemment responsables d'infections nosocomiales. Les infections communautaires à entérocoques sont essentiellement dues à *E. faecalis* (80 à 90% des cas) et *E. faecium* (5 à 10% des cas). Il s'agit principalement d'infections urinaires basses, de pyélonéphrites, de bactériémies et d'endocardites [10]. Ils comptent parmi les premiers micro-organismes responsables d'infections nosocomiales. L'incidence croissante de ces infections a été notée dans les années 70-80 aux Etats-Unis et corrélée à l'augmentation de l'utilisation des céphalosporines qui sont inactives chez ces espèces.

Le traitement des infections à entérocoques repose sur l'association d'une pénicilline et d'un aminoside. Si ces antibiotiques sont inefficaces séparément, leur association résulte en une synergie qui entraîne la bactéricidie. Ils ont une sensibilité naturelle médiocre aux bêta-lactamines et sont naturellement résistants aux céphalosporines. Ils ont une résistance de bas niveau aux aminosides, qui peut devenir par l'acquisition d'un plasmide, une résistance de haut niveau. Ils sont généralement résistants au chloramphénicol, aux tétracyclines, à la rifampicine et aux quinolones. Les glycopeptides, généralement actifs sur les entérocoques, sont habituellement utilisés en cas d'allergie aux bêta-lactamines ou pour les souches présentant des hauts niveaux de résistance à la pénicilline et aux aminosides. Mais des résistances à ces antibiotiques ont émergé, et chez *E. faecalis* et *E. faecium*, deux phénotypes de résistance de haut niveau aux glycopeptides ont été décrits : VanA (résistance à la vancomycine et à la teicoplanine) et VanB (résistance à la vancomycine et sensibilité conservée à la teicoplanine). Cette résistance de haut niveau aux glycopeptides est inductible, et transférable par conjugaison bactérienne. La résistance à la vancomycine et à la

teicoplanine des entérocoques est rare en France (moins de 1% des souches) [30].

La diffusion sur un mode épidémique de souches d'entérocoques résistants à haut niveau aux bêta-lactamines, aux aminosides ou aux glycopeptides est un risque majeur. Les premiers entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) ont été isolés en France en 1986. Actuellement leur isolement est sporadique, mais leur fréquence augmente progressivement. La fréquence de cette résistance augmente avec la pression de sélection résultant de la prescription des glycopeptides, notamment chez les patients neutropéniques. Les ERV entraînent des infections humaines significatives et sont largement disséminés dans les institutions (hôpitaux), où aussi bien les antibiotiques que les désinfectants sont utilisés intensivement. On retrouve également ces phénotypes de résistance chez les animaux. En effet, de l'utilisation très répandue de l'antibiotique avoparcine (similaire à la vancomycine) dans l'agriculture industrielle européenne, a résulté une colonisation endémique par les ERV des animaux de ferme ainsi que de patients en bonne santé [3].

III-1-5- *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Les staphylocoques sont des bactéries de la flore commensale cutanée et muqueuse des mammifères et des oiseaux. Adaptée à l'écosystème cutané, la flore résidente de l'homme joue un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constitue une barrière contre les bactéries de la flore transitaire. L'habitat préférentiel de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale, où il est présent chez 10 à 40% des individus en dehors de tout contact hospitalier [11]. Le portage nasal de *S. aureus* est à l'origine d'infections notamment en chirurgie cardiaque, en hémodialyse et en dialyse péritonéale. Ce sont des cocci à Gram positif, sous forme d'amas ou de grappes. Elles sont immobiles, habituellement non capsulées, non sporulées et sont capables de se développer en milieu aérobie ou anaérobie. Ce sont des bactéries oxydase négatives et Dnase positive. Elles sont potentiellement pathogènes pour l'homme à la faveur de la rupture de la barrière cutané-muqueuse. Elles sont alors responsables d'infections suppuratives au niveau de la peau, des tissus mous, des muscles, des os, du tractus respiratoire, des valves cardiaques, du tractus urinaire... Les préoccupations cliniques actuelles concernent la prévention des infections à *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM).

S. aureus exprime de nombreux facteurs de virulence. Ils comprennent des protéines de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte, des facteurs inhibant la

phagocytose et des toxines qui lèsent les cellules. Les facteurs qui initialisent la colonisation comprennent la protéine A (Spa), la protéine de liaison au collagène (Cna), la protéine de liaison à la fibronectine (FnBP), la protéine de liaison au fibrinogène ou Clumping factor (Clfa), des sidérophores, la coagulase, la staphylokinase et les lipases. La résistance à la phagocytose est due à des polysaccharides capsulaires. Enfin de nombreuses toxines à activité membranaire existent. On a alors l' α -toxine qui est cytotoxique au niveau des cellules endothéliales. La β -toxine, elle, est une sphingomyélinase qui altère les membranes riches en lipides. La δ -toxine est moins connue. La leucocidine de Panton-Valentine (LPV), l'hémolysine γ , la leucocidine ED sont des toxines synergohyménotropes. La LPV par exemple, est leucotoxique et dermonécrotique, mais non hémolytique. C'est un facteur de virulence important des infections nécrosantes. Les exfoliatines (A et B), la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST) et les entérotoxines (A, B, C, D, E), ont un rôle important en pathologie humaine. Elles sont impliquées dans les syndromes de peau ébouillantée, dans les syndromes de choc toxique, d'éruption scarlatiniforme, et dans les toxi-infections alimentaires, entérocolites nécrosantes, ou diarrhées. La TSST et les entérotoxines ont une activité superantigénique [81]. Signalons que les SARM sont capables de former un biofilm et ainsi de survivre sur différents supports [11].

L'introduction en 1961, des pénicillines semi-synthétiques résistantes aux pénicillinases fut suivie de l'émergence de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline. Cette résistance s'étend aux autres pénicillines résistantes aux pénicillinases (oxacilline, dicloxacilline...) et à toutes les autres bêta-lactamines. La proportion de SARM en milieu hospitalier en France atteignait en 1990, 30 à 40%, l'un des taux les plus élevés d'Europe. Ces souches étaient multirésistantes aux antibiotiques (aminosides, macrolides, fluoroquinolones). Grâce à des mesures de prévention, la proportion de SARM a diminué et se stabilise entre 17 et 30% en France et aux Etats-Unis. Les SARM hébergent le gène *mecA*, codant la PLP2a additionnelle, PLP de faible affinité, responsable de la résistance intrinsèque à toutes les bêta-lactamines.

III-2- Constat de la contamination environnementale

Des bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes, d'origine humaine ou animale, sont constamment « déversées » dans l'environnement *via* les eaux. Certaines de ces bactéries ont des gènes de résistance aux antibiotiques, éventuellement localisés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, intégrons, transposons) qui ont la capacité de se répandre à

travers les communautés microbiennes du sol et de l'eau [2]. Certaines données montrent que les taux de résistance de haut niveau à plusieurs ATB sont aussi observés chez les bactéries commensales et environnementales [84]. Les ERV ont été isolés dans tous les environnements à l'exception des eaux de consommation [87]. De plus, plusieurs études ont montré la présence d'entérobactéries BLSE dans les effluents liquides d'hôpitaux (Brésil, Portugal), même en aval des stations d'épuration, dans les effluents de communautés urbaines (Espagne) et même dans l'eau du réseau de consommation (Népal). Ces faits suggèrent à la fois une conséquence de l'excrétion humaine de BLSE et le risque environnemental pour l'homme [89].

III-2-1- Effluents hospitaliers

Les effluents hospitaliers vont constituer une source importante de bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans l'environnement. SCHWARTZ *et al.* (2003) ont trouvé des bactéries portant le gène *vanA* dans des effluents hospitaliers ainsi que le gène *mecA* qui code pour la résistance à la pénicilline chez les staphylocoques. Des gènes de résistance à la gentamicine ont été retrouvés chez *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et Entérobactéries dans les eaux usées hospitalières. Une étude en Inde montre que les effluents hospitaliers y contiennent une grande quantité d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques [15]. Plusieurs études ont montré la présence d'entérobactéries BLSE dans les effluents liquides d'hôpitaux notamment au Brésil et au Portugal [89]. Il est alors recommandé de diminuer la dissémination des entérobactéries BLSE et de leurs gènes de résistance dans l'environnement en contrôlant les effluents hospitaliers. Dans une étude de SERVAIS (2009), dans les eaux usées hospitalières, on trouvait 72% de bactéries résistantes à au moins un antibiotique et 65% de bactéries multirésistantes. Enfin, on retrouve régulièrement des *P. aeruginosa* multirésistants dans les effluents hospitaliers [80]. Des données montrent que l'usage répandu de biocides comme le triclosan ou des ammoniums quaternaires à domicile et à l'hôpital, pourrait sélectionner des bactéries résistantes aux ATB. On a montré que le triclosan par exemple sélectionne des souches d'*E.coli* à bas niveau de résistance antibiotique [46].

III-2-2- Eaux usées urbaines – STEP- boues d'épuration

Les bactéries résistantes ou multirésistantes comme *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, et des bactéries phylogénétiquement distantes, sont présentes dans les eaux usées municipales aussi bien que dans les bassins d'aération et dans les processus de digestion anaérobie dans les STEP. Certaines études les ont mises en évidence. YANG *et al.* (2009) ont observé que 32% des coliformes dans les isolats issus des eaux usées à Taïwan étaient multirésistants (résistants à au moins 5 antibiotiques sur 8 testés). En ce qui concerne *E. coli*, ils ont montré que 80% des *E. coli* isolées d'eaux usées municipales résistent à l'ampicilline, alors que seulement 2 à 18% le sont au niveau de la station d'épuration. TUMEO (2007) a retrouvé des *P. aeruginosa* multirésistants aux antibiotiques dans les eaux usées urbaines. KÜMMERER (2009b) rapporte que des résistances contre des bêta-lactamines, quinolones, tétracycline, et triméthoprim/sulfaméthoxazole et autres sulphonamides ont été retrouvées dans les eaux usées et dans les boues d'épuration partout à travers le monde, en utilisant des moyens classiques tels la mise en culture et des tests de résistances, aussi bien que la détection de gènes codant pour des résistances. SERVAIS (2009) rapportait une prévalence de multirésistants pour *E. coli* dans les eaux usées municipales de 34%. BEIER (2008) rapporte la présence d'entérocoques résistants à la vancomycine dans les effluents urbains au Texas. Les STEP peuvent représenter un important réservoir de bactéries commensales humaines et animales dans lesquelles les déterminants de résistance ATB persistent dans l'effluent final et sont rejetés dans l'environnement [29]. Des études montrent une forte proportion de bactéries fécales résistantes (*E.coli* et entérocoques fécaux) dans les affluents et effluents des STEP [76], ainsi que la présence de nombreux gènes de résistance différents [85].

III-2-3- Eaux de surface et eaux souterraines

Des résistances aux antibiotiques ont été retrouvées chez des bactéries marines et chez des bactéries vivant dans les estuaires ou des eaux côtières polluées par les eaux usées. Même dans les endroits reculés comme l'océan Arctique, des isolats de *E. coli* originaires d'oiseaux de l'arctique portent des résistances aux antibiotiques. Ces résultats montrent que les gènes de résistance peuvent être retrouvés dans des régions où la pression de sélection par les antibiotiques n'existe pas [48]. ZHANG (2009), rapporte la présence de nombreux gènes de

résistance dans les eaux de surface, notamment en aval d'un élevage de porcs. SERVAIS et PASSERAT, dans une étude de 2009, indiquent que parmi 214 *E. coli* isolés d'échantillons de rivières, 42% étaient résistants à au moins un antibiotique parmi les 16 testés. En ce qui concerne les entérocoques intestinaux, sur 148 souches isolées à partir d'eaux de rivière, 83% étaient résistants avec une prévalence de résistance importante pour triméthoprim/sulfaméthoxazole (65%) et érythromycine (49%). Par contre ils ne retrouvaient pas d'entérocoques résistants à la vancomycine.

KÜMMERER (2004) rapporte aussi la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux souterraines en milieu rural.

En ce qui concerne l'eau potable, des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été retrouvées notamment dans le réseau de distribution à partir des années 1980. On a aussi trouvé des gènes de résistance à la vancomycine, *vanA*, dans des bactéries hétérotrophes de biofilms dans l'eau potable [46].

III-2-4- Sols et sédiments

BLANCO *et al.* (2009), rapportent une haute prévalence de résistance aux antibiotiques dans différents engrais animaux utilisés en épandage sur les champs, et donc, consécutivement dans les sols ayant reçu ces épandages. ZHANG *et al.* (2009), ont détecté des gènes de résistance aux bêta-lactamines (gènes *bla*) dans les sols et dans les sédiments en aquaculture. Ils retrouvent également des gènes de résistance à la tétracycline (*tet*) dans les sédiments marins, dans les sédiments de l'aquaculture et dans les sédiments de rivières. Des bactéries résistants peuvent être présentes dans ces sédiments à cause de l'application d'antibiotiques dans les fermes aquacoles, ou à cause de la sélection par les antibiotiques présents dans les sédiments. Une haute résistance aux antibiotiques dans les bactéries des sédiments est souvent l'indicateur environnemental le plus sensible d'un usage passé d'antibiotiques [48].

III-3- Origine de la contamination

III-3-1- Présence naturelle dans l'environnement

La grande majorité des antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique, de même

que les gènes de résistance aux antibiotiques acquis par les germes pathogènes humains ont une origine environnementale [63]. Beaucoup d'antibiotiques utilisés pour le traitement des infections sont produits par des micro-organismes environnementaux, présents notamment dans les sols. Le rôle primaire de ces antibiotiques est probablement d'être un inhibiteur de la croissance des micro-organismes en compétition. Il semble alors clair que les micro-organismes producteurs d'antibiotiques possèdent des déterminants génétiques qui leur permettent de résister aux antibiotiques qu'ils produisent. Il est probable alors, que les gènes de résistance aux antibiotiques doivent aussi avoir émergé de l'environnement. L'analyse des isolats bactériens de l'ère préantibiotique montre que le taux de plasmide portés par les bactéries pathogènes était à peu près le même qu'aujourd'hui. Cependant les plasmides de l'ère préantibiotique ne portaient pas de gènes de résistance aux antibiotiques [1]. On peut alors dire que la forte pression de sélection exercée par l'usage intensif d'antibiotiques en thérapie est à l'origine de l'acquisition et de la dissémination des gènes de résistance à travers les populations bactériennes pathogènes. Mais elle n'est pas seule en cause. En effet, la sélection sans pression sélective par les antibiotiques peut se produire si les gènes portent d'autres éléments qu'une résistance aux antibiotiques. Cela peut être alors des éléments utiles pour résister à une pollution chimique par des métaux lourds par exemple, ou encore un déterminant génétique qui accompagne le gène de résistance aux antibiotiques qui donne un avantage écologique à la bactérie pour coloniser son habitat. Des environnements naturels contaminés à la fois par des métaux traces et sujets à des contaminations d'origine fécale favoriseraient l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et aux métaux lourds, les gènes de résistances étant portés sur un même support génétique [87]. Enfin, des mécanismes peuvent être utilisés par les bactéries pour différentes fonctions. *Escherichia coli* par exemple, possède des pompes à efflux impliquées dans l'extrusion des sels biliaires qui sont toxiques pour la bactérie. L'apparition de ces pompes pour sels biliaires a été sélectionnée par la présence des sels biliaires depuis toujours, même si depuis 50 ans, ils ont aussi un rôle dans l'expulsion des antibiotiques à l'extérieur de la bactérie [1]. Ces données montrent donc que des bactéries résistantes aux antibiotiques ainsi que des gènes de résistance sont présents naturellement dans l'environnement.

Mais il reste à savoir si l'apport d'antibiotiques dans l'environnement par l'usage thérapeutique est un facteur important de l'émergence de bactéries résistantes dans l'environnement, et si la concentration d'antibiotiques et la densité bactérienne sont suffisamment élevées pour faire émerger des résistances. À cet égard, comme nous l'avons

indiqué auparavant, les résultats sont controversés. Des résultats préliminaires indiquent que le transfert de résistances et la sélection de bactéries résistantes n'est pas favorisé avec les concentrations d'antibiotiques retrouvées dans l'environnement [46]. Enfin, le transfert de résistance à partir de bactéries déjà résistantes en raison d'un mésusage des antibiotiques pourrait avoir un rôle plus important dans l'émergence de résistances dans l'environnement que l'apport des antibiotiques eux-mêmes.

III-3-2- Les eaux usées

La corrélation entre la consommation d'antibiotiques et la résistance des bactéries commensales est maintenant bien établie, et l'on peut dire que les niveaux auxquels ces bactéries fécales sont exposés avant leur rejet dans l'environnement sont la première raison expliquant le niveau de bactéries résistantes observé dans les rivières [76]. L'apport de bactéries qui sont déjà devenues résistantes par l'utilisation d'antibiotiques est largement retrouvée notamment dans les effluents hospitaliers. Le rejet des eaux usées, qu'elles soient municipales ou hospitalières, semble vraisemblablement être la source principale de bactéries fécales résistantes [76]. Les contributions respectives des eaux usées domestiques et des eaux usées hospitalières restent inconnues. On peut les estimer par la proportion de la population totale qui est hospitalisée chaque jour. Cela indique que 99% des bactéries fécales ont une origine domestique. En prenant en compte que les effluents hospitaliers sont normalement dilués au moins 100 fois par les eaux usées municipales, et que dans les eaux usées municipales sans effluents hospitaliers il y a aussi des bactéries résistantes à cause de l'usage d'antibiotiques communautaires, la conclusion est que c'est probablement la communauté dans son entier qui est responsable de l'apport principal de bactéries résistantes dans les STEP, et par la suite dans l'environnement. Donc même si la prévalence de résistance parmi les *E.coli* issues des eaux usées hospitalières est 2 fois celle des eaux usées domestiques, les eaux usées domestiques sont le contributeur majeur des bactéries fécales résistantes dans les eaux des rivières du bassin de la Seine [76]. Mais, d'autres études, notamment celle de CHITNIS *et al.* (2004) indiquent qu'en Inde, c'est l'hôpital qui est la principale source de bactéries multirésistantes dans l'environnement. Peut-être que dans de tels pays en voie de développement, l'utilisation des antibiotiques en ville est moins répandue que dans les pays développés, ce qui expliquerait ces observations.

Cependant, en ce qui concerne la dispersion de gènes de résistance, la contribution des

bactéries résistantes et multiR contenues dans les eaux usées hospitalières pourrait être prédominante à cause des hauts niveaux de résistance de ces bactéries [76].

III-3-3- L'agriculture

D'autres sources pour la dispersion des bactéries multirésistantes dans l'environnement existent. Notamment l'épandage d'engrais à base de boues d'épuration et de fumiers animaux en agriculture, qui en est une source importante. En effet, dans une étude de BLANCO *et al.* (2009), les oiseaux vivant à proximité des champs où l'épandage est réalisé possèdent plus de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques dans leur fécès que les oiseaux qui vivent proches de champs où l'épandage n'est pas réalisé. On imagine alors très bien, avec la distance que peuvent parcourir des oiseaux, que ces bactéries résistantes peuvent se disperser largement dans l'environnement. D'autre part KÜMMERER (2004) remarquait que l'incidence des *E. coli* résistantes aux antibiotiques était étonnamment haute dans les eaux souterraines en milieu rural. Le ruissellement à partir des fermes et les fuites des fosses septiques sont des possibilités claires d'apport de bactéries résistantes dans les eaux souterraines, aussi bien que les fuites à partir des réseaux d'eaux usées. Une étude de LATA (2009) suggère que la présence d'ERV dans les eaux d'une rivière peut être due à l'utilisation d'antibiotiques vétérinaires comme compléments alimentaires ou à l'épandage de fumiers dans les champs comme engrais. Enfin un rapport de l'AFSSA en 2006 indique que la pisciculture, l'élevage bovin, porcin ou de volailles, représentent des réservoirs et des sources de bactéries multirésistantes aux antibiotiques consécutivement à des traitements préventifs ou curatifs. La source fécale est sans doute la source principale, mais on remarque que des bactéries aquatiques antibiorésistantes peuvent apparaître au sein des piscicultures.

III-3-4- Le rôle des STEP

Il est généralement admis que le traitement des eaux usées au niveau des STEP entraîne une réduction marquée du nombre total de bactéries, incluant le nombre total de bactéries résistantes. Cependant des études suggèrent que les populations résistantes ou sensibles ne sont pas également affectées par les traitements, mais les études manquent à ce sujet pour confirmer cette idée. En effet, il a été remarqué que le pourcentage de coliformes fécaux transportant des gènes de résistance transmissibles était plus élevé dans les eaux usées traitées

que dans les eaux usées non traitées. De plus, on a rapporté une augmentation dans le pourcentage de coliformes multirésistants après traitement mécanique et biologique d'eaux usées municipales [36]. Une étude de FERREIRA DA SILVA *et al.* (2007), montre que le traitement des eaux usées s'accompagne par une augmentation généralisée de la prévalence de multirésistance chez *Escherichia spp.* Le même effet était observé pour les entérocoques isolés de la même STEP [29]. Qu'il soit noté ou non une augmentation de la prévalence des bactéries résistantes après traitements par les STEP, il est admis que leur faible efficacité en termes d'abattement microbiologique (qui d'ailleurs ne leur est pas demandé) pourrait entraîner la dissémination de bactéries multirésistantes dans l'environnement [29 ;84]. Enfin il faut noter que les boues d'épuration, qui peuvent être utilisées dans l'épandage agricole, contiennent généralement un nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques similaire à celui des eaux usées [36].

Enfin, il semble par contre évident que les STEP sont de potentiels points chauds pour le transfert horizontal et la sélection de gènes de résistances antibiotiques parmi les bactéries aquatiques [36].

III-4- Conséquences

La présence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans l'environnement peut avoir des conséquences néfastes. En effet, il a été suggéré que les résistances dans des populations bactériennes peuvent se disperser d'un écosystème à un autre [74]. Le sol, les eaux de surface et du sous-sol notamment reçoivent des bactéries résistantes qui viennent de l'hôpital, de la population générale, des animaux, et qui se mélangent et interagissent avec les organismes de l'environnement [2]. La dispersion à large échelle de ces bactéries multirésistantes pourrait alors avoir lieu et causer ainsi des problèmes de traitement lors des infections humaines et animales.

III-4-1- Le transfert vertical de résistances aux antibiotiques

Parallèlement aux antibiotiques eux-mêmes, les milieux aquatiques reçoivent des bactéries résistantes adaptées à d'autres milieux, notamment au tube digestif humain ou animal (contamination fécale). Le transfert de bactéries résistantes à l'homme peut se produire par l'eau ou la nourriture si les champs sont arrosés avec des eaux de surface ou si on

épand des boues d'épuration... Un pré requis pour un transfert direct de résistance est que les bactéries soient capables de survivre ou alors que le matériel génétique soit assez stable pour être transféré dans le nouvel environnement, par exemple du corps humain vers l'eau de surface qui est bien plus froide et bien plus pauvre en nutriments [46]. Si elles sont capables de survivre dans l'environnement, les bactéries vont transmettre leurs résistances à leurs descendants. Cette diffusion de bactéries multirésistantes aux antibiotiques, en particulier à travers les eaux usées hospitalières est préoccupante, spécialement pour les espèces hydrophiles comme *P. aeruginosa* pour qui les eaux usées hospitalières peuvent être un habitat idéal [80].

III-4-2- Le transfert horizontal de gènes de résistance

À défaut de pouvoir survivre longtemps dans l'environnement aquatique, certaines de ces bactéries déjà résistantes aux antibiotiques vont pouvoir transmettre leur résistance à d'autres bactéries, dont certaines peuvent être pathogènes pour l'homme. On parle alors de transfert horizontal de gènes de résistance. Ces transferts peuvent se réaliser lorsque ces gènes de résistance sont situés sur des éléments génétiques mobiles et transférables, ce qui contribue à la dissémination des résistances aux antibiotiques [76]. Cette dissémination de la résistance entre bactéries pourrait être d'autant plus efficace que des antibiotiques sont également présents et exercent une pression de sélection. Certains rapports parlent d'un possible transfert de gènes de résistance entre les bactéries de l'environnement des fermes piscicoles et les bactéries de l'environnement terrestre, y compris des bactéries pathogènes pour les animaux et pour l'homme [46]. Les gènes codant pour l'efflux des tétracyclines par exemple, les gènes *tet* notamment, sont retrouvés dans les boues activées de STEP, dans les fermes aquatiques ou dans les eaux de surface. *Tet E* notamment, est souvent localisé sur un grand plasmide chez *Aeromonas spp.* et on a prouvé que ce gène pouvait être transféré à une autre espèce comme *E. coli*. L'échange de gènes de résistance entre *Pseudomonas* et *E.coli* dans des boues d'épuration a aussi été rapporté. Cela indique le danger potentiel de la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement [85]. Du fait de la haute densité et diversité bactérienne et de l'abondance de nutriments, les eaux usées, les boues activées ou les biofilms représentent un habitat approprié pour le transfert horizontal de gènes. En conséquence les bactéries indigènes de l'eau peuvent acquérir des plasmides et d'autres éléments génétiques codant pour des résistances antimicrobiennes à partir des bactéries résistantes présentes dans

l'eau [36, 37, 85].

III-4-3- L'exemple des entérobactéries BLSE

À titre d'exemple, les entérobactéries BLSE représentent aujourd'hui un péril sanitaire (nouveau péril fécal) qui découle de l'usage excessif des antibiotiques et de la diffusion épidémique de souches d'entérobactéries BLSE (ou de leurs gènes de résistance) par suite d'un respect insuffisant des règles d'hygiène de base [89]. Ce problème se pose notamment pour *E. coli* BLSE. En effet, la transmission croisée de *E. coli* BLSE, ou des gènes BLSE, est favorisée par la taille du réservoir, beaucoup plus important pour *E. coli* que pour les SARM par exemple. L'homme héberge dans son tube digestif plus de 10^8 *E. coli* par gramme de selles, soit un total de 10^{10} à 10^{11} . Ainsi, un porteur de *E. coli* BLSE peut éliminer chaque jour dans l'environnement, *via* ses excréments, plus de 10^{10} *E. coli* BLSE. En cas d'infection urinaire à *E. coli* BLSE, le nombre de bactéries excrétées par jour via les urines peut atteindre 10^8 à 10^9 . La transmission interhumaine d'*E. coli* BLSE, ou de gènes codant pour des BLSE, est donc aisée. Avec le développement de techniques d'assainissement comme le tout-à-l'égout et le traitement des eaux usées, nos sociétés se croyaient à l'abri du « péril fécal » représenté par les bactéries pathogènes à tropisme digestif (salmonelles, shigelles...). Les *E. coli* BLSE représentent aujourd'hui un péril fécal d'un nouveau genre [89].

Quant au transfert de BLSE entre animal et homme (et réciproquement), par contact (animaux de compagnie ou contacts professionnels) ou par voie alimentaire, il n'est pas exclu mais reste très peu documenté. Les gènes codant les BLSE les plus prévalents ne sont pas les mêmes chez les animaux que chez l'homme. La principale hypothèse épidémiologique est plutôt celle d'une évolution parallèle de la prévalence des *E. coli* BLSE chez l'homme et l'animal [89]. Une étude de BONNEDAHL *et al.* (2009) montre tout de même un transfert d'*Escherchia coli* productrices de BLSE CTX-M de l'homme vers certains oiseaux.

CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA PRESENCE DE BACTERIES MULTIRESISTANTES DANS LES EFFLUENTS DE LA VILLE DE TOULOUSE

I- PRESENTATION DE L'ETUDE

Nous avons choisi d'étudier la présence de bactéries multirésistantes dans les effluents de la ville de Toulouse. Pour cela, des prélèvements ont été réalisés au niveau d'effluents hospitaliers et au niveau d'effluents urbains, en entrée et en sortie de STEP. Les bactéries multirésistantes isolées ont par la suite été caractérisées.

Nous souhaitons, grâce aux prélèvements réalisés, déterminer la présence ou non de bactéries multirésistantes dans les effluents hospitaliers, et dans les effluents urbains en amont et en aval de la Station d'épuration de Toulouse. Les rejets environnementaux en sortie de STEP nous permettront de dire si la ville de Toulouse contribue à la dissémination de bactéries multirésistantes dans l'environnement. Enfin nous rechercherons à déterminer si la STEP de Ginestous permet un abattement des bactéries multirésistantes.

II-MATERIEL ET METHODE

II-1- Points de prélèvements

II-1-1- Effluents hospitaliers

Nous avons choisi d'étudier les effluents de l'hôpital de Rangueil à Toulouse. Le CHU de Rangueil est implanté sur un terrain de 35 hectares environ sur les coteaux de Pech-David, dans le quartier de Rangueil. Situé au cœur d'un campus universitaire, le CHU de Rangueil regroupe de nombreuses disciplines médicales et chirurgicales adultes, prend en charge des hospitalisations essentiellement de court séjour et assure 24h/24h l'accueil des urgences. Le CHU de Rangueil comporte 130 000 m² de planchers et 1400 lits répartis en plusieurs ensembles distincts mais reliés par des galeries permettant une liaison très facile entre eux.

Les prélèvements des effluents hospitaliers ont été réalisés au niveau d'un collecteur qui regroupe toutes les eaux usées du CHU, situé au pied de la colline de Pech-David. Ils ont été réalisés à l'aide d'un préleveur automatique AQUINOX froid portable disposant d'un bidon de stockage de 10L réfrigéré (Ref. AQXPFR0112Z AQUALYSE). Ce préleveur avait été programmé pour prélever des volumes d'échantillonnage plus importants au moment des plus forts débits.



Image 4 : Préleveur automatique et collecteur des effluents hospitaliers du CHU de Rangueil

Les échantillons étaient ensuite conservés à 4°C jusqu'à analyse.

II-1-2- Effluents urbains au niveau de la STEP de Ginestous

L'usine d'épuration de Ginestous, construite en 1954, faisait partie du Service Municipal de l'eau jusqu'en 1990, date à laquelle la mairie de Toulouse rétrocéda l'exploitation et la gestion des Services de production et d'assainissement de l'eau à la Compagnie Générale des Eaux (CGE, filiale du groupe Vivendi).



Image 5 : Usine de dépollution Ginestous-Garonne (source : le grand Toulouse, communauté urbaine <http://www.grandtoulouse.org>)

L'usine de dépollution de Ginestous-Garonne traite les eaux usées de 90% des habitants de l'agglomération toulousaine. Plus de 1 000 km de réseaux acheminent les eaux usées des communes de Toulouse, Balma, Colomiers, L'Union, Quint-Fonsegrives, Saint-Orens, Tournefeuille et Ramonville jusqu'à l'usine, qui assure leur dépollution avant de les rejeter dans la Garonne. Pour faire face à l'augmentation de la population et à l'accroissement des activités économiques de la région, et adapter les installations aux nouvelles contraintes réglementaires résultant de la loi sur l'eau de 1992 et des directives européennes pour la protection de l'environnement, la station de Ginestous-Garonne a subi des évolutions. Cette usine a aujourd'hui une capacité de traitement de 160 000 m³ d'eau/jour et elle permet le traitement des boues, qui est réalisé par séchage thermique, compostage et incinération. Les eaux usées ont un temps de séjour moyen entre l'entrée et la sortie de la station d'épuration de 18 heures environ.

Un projet de réhabilitation et de valorisation de l'usine a également été réalisé afin de faire de Ginestous-Garonne une véritable vitrine technologique au service de l'environnement, en améliorant notamment son intégration urbanistique par une étude du paysage et en organisant un circuit de visite du site. Veolia Eau (Compagnie Générale des Eaux) est chargé de la gestion complète de l'usine de dépollution Ginestous-Garonne.

Nous avons décidé de réaliser des prélèvements en amont et en aval de la STEP :

- Prélèvements en amont : Ils ont été réalisés au niveau de collecteurs qui acheminent des eaux usées vers la station d'épuration. Des prélèvements ont alors été réalisés au niveau du collecteur Sud, qui reçoit entre autres les rejets des hôpitaux de Purpan et Rangueil, et au niveau du collecteur Nord qui reçoit des eaux usées urbaines provenant de zones d'habitation.

Ceci peut éventuellement nous permettre de mesurer l'impact des effluents hospitaliers sur les effluents urbains.

- Prélèvements en aval : Ils ont été réalisés au niveau de la sortie de la STEP. Ce sont les eaux qui sont rejetées dans l'environnement, en l'occurrence, dans la Garonne, après tous les traitements nécessaires.

Les prélèvements au niveau de la STEP de Ginestous étaient réalisés *via* des préleveurs automatiques débits dépendants.

Les échantillons étaient ensuite conservés à 4°C jusqu'à analyse.

II-2- Centrifugation des échantillons hospitaliers

Les échantillons obtenus au niveau des effluents du CHU de Rangueil ont été concentrés mille fois car ils sont fortement dilués du fait de l'utilisation de très grandes quantités d'eau à l'hôpital (jusqu'à 1200 litres/lit/jour). Pour cela, les échantillons ont été centrifugés à une vitesse de 10 000g pendant 10 minutes, selon un protocole mis en place par l'école nationale vétérinaire de Toulouse. Le culot de centrifugation a été repris par le volume de sérum physiologique nécessaire pour obtenir un échantillon mille fois plus concentré.

II-3- Ensemencement des géloses

L'ensemencement des différentes géloses décrites par la suite a été réalisé à partir de dilutions de 10 en 10 de l'échantillon prélevé. Pour les échantillons hospitaliers, à partir de l'échantillon concentré 1000 fois, 100 µL des dilutions suivantes ont été ensemencées en duplicat : échantillon pur, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 et 1/100000. Pour évaluer la concentration de l'échantillon initial, il suffit alors de multiplier le nombre de colonies retrouvées sur une dilution, par le facteur de dilution et diviser par 1000 qui correspond au facteur de concentration de l'échantillon de départ. Une conversion permet alors d'avoir les résultats en UFC/L.

Pour les échantillons prélevés au niveau des postes Nord et Sud de la STEP, 100 µL des dilutions suivantes ont été ensemencées en duplicat : échantillon pur, 1/10 et 1/100. Pour les échantillons prélevés à la sortie de la STEP, et moins concentrés que les échantillons en entrée

de STEP, 100 µL de la dilution au 1/10 étaient ensemencés, puis 100 µL de l'échantillon pur, en duplicat. Des volumes plus importants, de 1 mL et 10 mL de l'échantillon pur, ont été ensemencés par filtration sur membrane quadrillée d'acétate de cellulose.

II-4- Dénombrement des bactéries

II-4-1- Dénombrement de la flore totale

Nous avons effectué, sur les prélèvements des effluents du CHU de Rangueil, le dénombrement de la flore bactérienne totale par ensemencement de géloses R2A (BD, Heidelberg) et décompte de l'ensemble des UFC après 48 h d'incubation à 37°C.

II-4-2- Dénombrement des entérocoques fécaux

Le dénombrement des entérocoques fécaux a été effectué sur les prélèvements de la STEP de Ginestous.

L'ensemencement de géloses Slanetz (AES, Bruz) et le décompte des colonies rouges, marron ou rose a été réalisé après 24 h d'incubation à 37°C. Les colonies isolées étaient identifiées par :

- examen au microscope des colonies (coccies en chaînettes)
- isolement sur COS
- détection de la pyrrolidonyl peptidase (PYR positif)
- détection de l'hydrolyse de l'esculine (ESC positif)

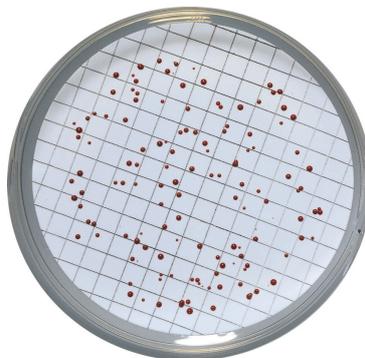


Image 6 : Entérocoques fécaux sur gélose Slanetz

II-4-3- Dénombrement des coliformes

Il a été réalisé sur les prélèvements de la STEP de Ginestous.

Des géloses Tergitol 7-lactose-TTC (OXOID, Wesel) ont été ensemencées et le décompte effectué après 24 h d'incubation à 36°C :

- Colonies jaunes avec halo jaune : présomption d'*E.coli*
- Colonies jaunes à verdâtre : présomption d'*Enterobacter* et de *Klebsiella*
- Colonies rouges avec halo bleuâtre : présomption de *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* et *Pseudomonas* spp.
- Dénombrement des colonies suspectes contrôlées comme oxydase négative.

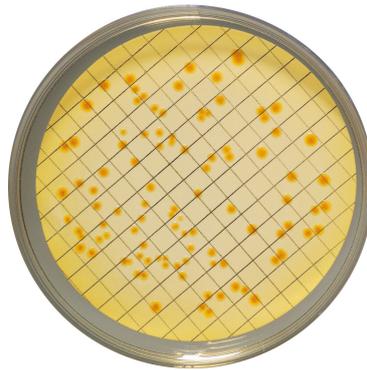


Image 7 : coliformes sur gélose TTC

II-4-4- Dénombrement des *Pseudomonas aeruginosa*

L'ensemencement de géloses *Pseudomonas* cétrimide (OXOID, Wesel) a été réalisé sur les prélèvements de Ranguel et de Ginestous, et le décompte de l'ensemble des UFC effectué après 48 h d'incubation à 41°C.

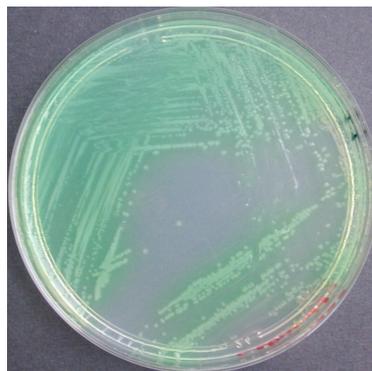


Image 8 : *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose cétrimide

II-5- Mise en évidence des bactéries multirésistantes

À partir des prélèvements d'eaux usées réalisés, nous avons essayé de mettre en évidence la présence de bactéries multirésistantes dans les effluents du CHU de Rangueil, et en amont et en aval de la STEP de Ginestous. Les données de la littérature nous ont conduit à rechercher différents types de bactéries multirésistantes.

II-5-1- Recherche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Pour cela nous avons utilisé deux milieux sélectifs chromogènes différents :

- Gélose *ChromID™ MRSA* (Biomérieux) : mise en évidence de colonies vertes à 24 h et 48 h d'incubation.



Image 9 : SARM sur gélose ChromID™ MRSA

- Gélose *Brilliance™ MRSA* (Oxoid) : mise en évidence de colonies bleues jean à 24 h et 48 h d'incubation.

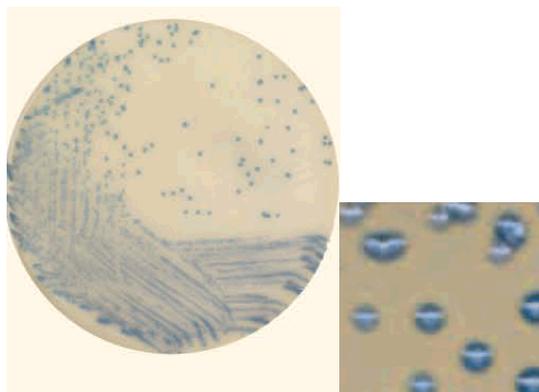


Image 10 : SARM sur gélose Brilliance™ MRSA

Les colonies suspectes sur milieux chromogènes étaient contrôlées au microscope (coccies en grappe) avec recherche de la DNase et confirmation par agglutination latex. L'identification et l'antibiogramme ont été réalisés sur automate Vitek 2 avec les cartes GP 581.

II-5-2- Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu

Les entérobactéries possèdent de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques mais nous avons choisi de nous intéresser uniquement à la production de BLSE.

Nous avons également utilisé deux milieux sélectifs chromogènes différents :

- Gélose *BrillianceTM ESBL* : mise en évidence en 24 h de colonies bleu foncé présomptives d'*E.coli* et de colonies vertes présomptives de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter*.

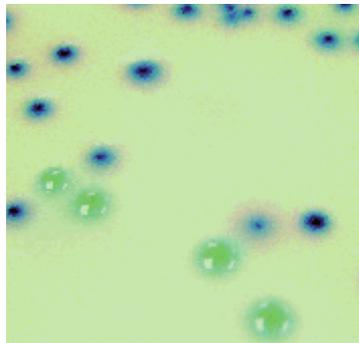


Image 11 : Entérobactéries BLSE sur gélose BrillianceTM ESBL

- Gélose *chromIDTM ESBL* : mise en évidence en 24 h de colonies roses à bordeaux présomptives d'*E.coli*, de colonies bleues vertes à vert-bruns présomptives des *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter* et de colonies brunes à marrons présomptives des *Proteae* (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*).



Image 12 : Entérobactéries BLSE sur gélose chromIDTM ESBL

Les colonies suspectes étaient contrôlées au microscope (bacilles), avec recherche de l'oxydase (négative pour les entérobactéries), et réalisation du test de synergie sur gélose de Müller-Hinton avec et sans cloxacilline, pour mettre en évidence la présence de BLSE. Les bactéries pour lesquelles le test de synergie était positif étaient identifiées à l'aide d'une galerie Api 20 E ou de l'automate Vitek 2 (carte GN pour l'identification et carte AST-N103 pour l'antibiogramme).

II-5-3- Recherche d'entérocoques résistants aux glycopeptides

Deux milieux chromogènes différents ont là aussi été utilisés :

- Gélose *BrillianceTM VRE* : mise en évidence en 24 h de colonies violettes présomptives d'*Enterococcus faecium* et de colonies vertes présomptives d'*Enterococcus faecalis*.

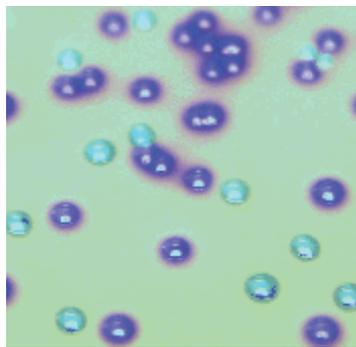


Image 13 : Entérocoques résistants aux glycopeptides sur gélose *BrillianceTM VRE*

- Gélose *chromID VRE* : mise en évidence en 24 h et 48 h de colonies violettes présomptives d'*Enterococcus faecium* et de colonies bleues-vertes présomptives d'*Enterococcus faecalis*.

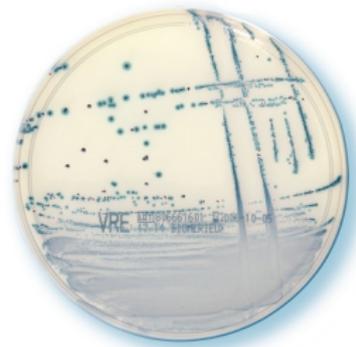


Image 14 : Entérocoques résistants aux glycopeptides sur gélose *chromID VRE*

Les colonies suspectes étaient contrôlées au microscope (coccies à Gram positif en chaînette), avec isolement sur COS et détection de la pyrrolidonyl peptidase (PYR positif). L'identification était réalisée à l'aide de l'automate Vitek 2 (carte GP pour l'identification et carte AST-P606 pour l'antibiogramme).

II-5-4- Recherche de *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème, la ceftazidime, la ciprofloxacine et à l'amikacine

La gélose sélective était obtenue par ajout au milieu *Pseudomonas aeruginosa* (BIORAD, Marnes –La –Coquette) des antibiotiques à la concentration suivante :

- Imipénème : 8 mg/L
- Ceftazidime : 8 mg/L
- Ciprofloxacine : 2 mg/L
- Amikacine : 16 mg/L

Les colonies suspectes étaient identifiées par leur coloration jaune-vert et leur forte odeur de seringat après une pousse à 41°C, et un test de résistance à la kanamycine. L'antibiogramme a été réalisé sur l'automate Vitek 2 avec des cartes AST-N093.

II-6- Caractérisation des Bactéries multirésistantes isolées

Les bactéries multirésistantes isolées à partir de nos prélèvements d'eaux usées ont par la suite été caractérisées sur le plan moléculaire. Nous avons alors effectué la recherche de gènes de virulence et de gènes de résistance sur ces différentes bactéries.

II-6-1- Caractérisation des SARM

Recherche du gène *mecA* et du gène de la toxine de Panton Valentine (LPV) par PCR :

La confirmation de la résistance à la méticilline de même que la recherche de la production de la toxine de Panton Valentine a été réalisé à l'aide du kit GenoType®MRSA ver 2.0. (Hain Lifescience GmbH). Le profil d'amplification était le suivant :

95°C	15 minutes	22 cycles
95°C	20 secondes	
60°C	30 secondes	

Tableau 4 : Conditions de PCR pour la recherche du gène *mecA* et du gène codant pour la LPV

Recherche du gène responsable du Choc Toxique staphylococcique par PCR :

Les amorces utilisées pour détecter le gène *tst* sont les suivantes [65] :

tst, F : 5'-ACC CCT GTT CCC TTA TCA TC-3'

tst, R : 5'-TTT TCA GTA TTT GTA ACG CC-3'

Recherche des entérotoxines par PCR :

Nous avons recherché les gènes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, codant respectivement pour les entérotoxines A, B, C, D, E. Les amorces utilisées sont les suivantes [65] :

sea, F : 5'-GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG-3'

sea, R : 5'-CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG-3'

seb, F : 5'-GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC-3'

seb, R : 5'-CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG-3'

sec, F : 5'-AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG-3'

sec, R : 5'-CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG-3'

sed, F : 5'-CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG-3'

sed, R : 5'-ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC-3'

see, F : 5'-AGG TTT TTT CAC AGG TCA TCC-3'

see, R : 5'-CTT TTT TTT CTT CGG TCA ATC-3'

Recherche des exfoliatines par PCR :

Nous avons recherché les gènes *eta* et *etb*, codant respectivement pour les exfoliatines A et B. Les amorces utilisées sont les suivantes [65] :

eta, F : 5'-GCA GGT GTT GAT TTA GCA TT-3'

eta, R : 5'-AGA TGT CCC TAT TTT TGC TG-3'

etb, F : 5'-ACA AGC AAA AGA ATA CAG CG-3'

etb, R : 5'-GTT TTT GGC TGC TTC TCT TG-3'

Les conditions de PCR pour la recherche du gène de la TSST, des entérotoxines et des exfoliatines sont :

95°C	5 minutes	Dénaturation	35 cycles
95°C	20 secondes	Dénaturation	
57°C	20 secondes	Hybridation	
72°C	20 secondes	Elongation	
72°C	4 minutes		

Tableau 5 : Conditions de PCR pour la recherche des gènes des entérotoxines, des exfoliatines et de la TSST

II-6-2- Caractérisation des entérobactéries BLSE

Recherche des gènes de résistance aux antibiotiques par PCR :

Cette recherche a été effectuée par PCR sur toutes les bactéries isolées qui présentaient une BLSE. Les gènes codant pour les enzymes SHV, OXA, CTX-M et TEM ont été recherchés. Les amorces utilisées sont les suivantes [16] :

bla-SHV, F : 5'-AGGATTGACTGCCTTTTTG-3'

bla-SHV, R : 5'-ATTTGCTGATTTTCGCTCG-3'

bla-OXA, F : 5'-ATATCTCTACTGTTGCATCTCC-3'

bla-OXA, R : 5'-AAACCCTTCAAACCATCC-3'

bla-CTX-M, F : 5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3'

bla-CTX-M, R : 5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'

bla-TEM, F : 5'-CGGGATCCCACCCAGAAACGC-3'

bla-TEM, R : 5'-AAAAGTACTCAACCAAGTCATTCTG-3'

Recherche de gènes de virulence chez *Escherichia coli* BLSE par PCR:

Nous avons recherché par PCR le gène *eae* codant pour l'intimine, et les gènes *stx1* et *stx2* codant pour les Shiga-toxines 1 et 2. Les amorces utilisées sont les suivantes [71]:

eae, F : 5'-AGG CTT CGT CAC AGT TG -3'

eae, R : 5'-CCA TCG TCA CCA GAG GA -3'

stx1, F : 5'-AGA GCG ATG TTA CGG TTT G-3'

stx1, R : 5'-TTG CCC CCA GAG TGG ATG-3'

stx2, F : 5'-TGG GTT TTT CTT CGG TAT C-3'

stx2, R : 5'-GAC ATT CTG GTT GAC TCT CTT-3'

Les conditions de PCR pour la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques et les gènes de virulence sont les suivantes :

95°C	5 minutes	Dénaturation	
95°C	20 secondes	Dénaturation	35 cycles
55°C	30 secondes	Hybridation	
72°C	20 secondes	Elongation	
72°C	4 minutes		

Tableau 6 : Conditions de PCR pour la recherche des gènes codant pour les enzymes de résistance SHV, OXA, CTX-M et TEM, et pour les gènes *eae*, *stx1* et *stx2*

Recherche du gène de l'entérotoxine cytolytique (AHCYTOEN) chez *Aeromonas spp.* par PCR :

La recherche du gène codant pour l'entérotoxine cytolytique par PCR a été réalisée avec les amorces suivantes [44] :

ach, F : 5'-GAG AAG GTG ACC ACC CAA GAA CA-3'

ach, R : 5'-AAC TGA CAT CGG CCT TGA ACT C-3'

Les conditions de PCR étaient les suivantes :

95°C	5 minutes	Dénaturation	35 cycles
95°C	20 secondes	Dénaturation	
55°C	20 secondes	Hybridation	
72°C	20 secondes	Elongation	
72°C	4 minutes		

Tableau 7 : Conditions de PCR pour la recherche de l'entérotoxine cytolytique

II-6-3- Caractérisation des entérocoques résistants aux glycopeptides

Recherche des gènes de résistance aux antibiotiques par PCR:

La caractérisation et la confirmation de la résistance aux glycopeptides ont été réalisées à l'aide du kit GenoType®Enterococcus. (Hain Lifescience GmbH). Ce kit permet l'identification de *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.gallinarum*, *E.casseliflavus*, et des gènes *vanA*, *vanB*, *vanC1* et *vanC2/C3*.

95°C	5 minutes	1 cycle
95°C	30 secondes	10 cycles
58°C	2 minutes	
95°C	25 secondes	20 cycles
53°C	40 secondes	
70°C	40 secondes	
70°C	8 minutes	1 cycle

Tableau 8 : Conditions de PCR pour la recherche de la résistance aux glycopeptides

Typage des souches ERV par Electrophorèse en champs pulsés :

Trois colonies d'ERV sont mises à incuber dans un bouillon BHI pendant 3 h à 37°C en bain marie agité. Un volume de 100 μL est récupéré et lysé par 40 μL de lysosyme, lysostaphine et mutanolysine pendant 24 h à 37°C. Une seconde lyse est réalisée par de la protéinase K pendant 24 h à 50°C. Quatre lavages successifs par un tampon de lavage (Biorad®) sont effectués préalablement à la digestion par l'enzyme de restriction SmaI pendant 20 h à 30°C. La migration se déroule pendant 18H50 (6V/cm, 120° d'angle, 1-17 sec, non linéaire).

III- RESULTATS

III-1- Dénombrement de la flore totale

Sur 3 séries de prélèvements effectuées au niveau des effluents de l'hôpital de Rangueil, un dénombrement de la flore totale a été réalisé. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

	Prélèvement 1 16/07/09	Prélèvement 2 29/07/09	Prélèvement 3 02/09/09	moyenne
Flore totale	$2,4 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^8$	$9,7 \cdot 10^7$ $IC_{0,05}=[0;2,2 \cdot 10^8]$

Tableau 9 : Flore totale (en UFC/L)

Sur 3 séries de prélèvements, on dénombre en moyenne une flore totale de $9,7 \cdot 10^7$ UFC/L soit $1 \cdot 10^8$ UFC/L.

III-2- *Pseudomonas aeruginosa*

Dénombrement des *P. aeruginosa* :

Un décompte des *Pseudomonas aeruginosa* présents dans les effluents de l'hôpital de Rangueil a été effectué après ensemencement sur gélose cétrimide et culture à 41°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

	Prélèvement 1 29/07/09	Prélèvement 2 02/09/09	Moyenne
<i>P.aeruginosa</i>	$3,7. 10^5$	$1,6. 10^6$	$9,8. 10^5$ IC _{0,05} =[0;2,2.10 ⁶]

Tableau 10 : Dénombrement des *Pseudomonas aeruginosa* (en UFC/L)

Sur deux séries de prélèvements, on observe en moyenne une concentration de *Pseudomonas aeruginosa* de $1. 10^6$ UFC/L.

P. aeruginosa multirésistants :

À partir des géloses cétrimide additionnées d'antibiotiques, nous avons isolé deux *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants, P.a1 et P.a2, issus respectivement de deux campagnes de prélèvements différentes dans les effluents du CHU de Rangueil le 16/07/09 et 2/09/09. Isolés tous les deux à partir de dilutions au 1/1000 on peut alors estimer la concentration de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants dans les effluents de l'hôpital de Rangueil $1. 10^3$ UFC/L.

Aucun *P.aeruginosa* multirésistant n'a été retrouvé au niveau de la STEP de Ginestous. Le seul qui a été isolé, P.a3, était non multirésistant selon nos critères. Il provient du collecteur Sud lors de la campagne de prélèvement du 4/03/10. Isolé sur une gélose cétrimide sans ajout d'antibiotiques, à partir de 100 µL de l'échantillon pur, il nous permet d'estimer la concentration en *Pseudomonas aeruginosa* non multirésistants au niveau du collecteur sud de l'ordre de 10^4 UFC/L.

Les résultats de l'antibiogramme des 3 souches isolées sont présentés dans le tableau suivant.

	tic	cla	pip	tzp	caz	fep	atm	imp	mer	an	gm	isp	tm	cip	pef	Min	cs	sxt
P.a1	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
P.a2	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
P.a3	R	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R

Tableau 11 : Antibiogramme des 3 *Pseudomonas aeruginosa* isolés

III-3- Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM)

Au niveau des effluents de Rangueil, un SARM a été isolé à partir d'une dilution au 1/100. La concentration estimée pour *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans les effluents de l'hôpital de Rangueil est de $1. 10^2$ UFC/L.

Les résultats de l'antibiogramme pour la souche isolée sont présentés dans le tableau suivant.

	pen	oxa	gm	k	tm	lvx	e	l	pt	qda	lnz	tec	van	min	te	fos	ft	fa	rmp	sxt
S.a1	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tableau 12 : Antibiogramme du SARM isolé

Une recherche de toxines a également été effectuée sur cette souche. Elle est :

- PVL négative
- TSST négative
- exfoliatines A et B négatives
- entérotoxines B, C et D négatives
- entérotoxines A et E positives .

La résistance à la méticilline a été confirmée par la recherche du gène *mecA* qui était positive.

Au niveau de la STEP de Ginestous aucun SARM n'a été retrouvé lors des différentes campagnes de prélèvement.

III-4- Entérocoques résistants à la vancomycine

Dénombrement des entérocoques fécaux :

Au niveau de la STEP de Ginestous, un dénombrement des entérocoques fécaux a été effectué lors de trois campagnes de prélèvement, après ensemencement sur milieu de culture Slanetz et culture à 37°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

	Prélèvement 1 04/03/10	Prélèvement 2 31/03/10	Prélèvement 3 28/04/10	moyenne
Collecteur Sud	$1,6 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$ $IC_{0,05}=[1,6 \cdot 10^7; 2,2 \cdot 10^7]$
Collecteur Nord	$1,9 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$ $IC_{0,05}=[1,8 \cdot 10^7; 3 \cdot 10^7]$
Sortie STEP	$2,4 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$ $IC_{0,05}=[0,3 \cdot 10^5; 2,5 \cdot 10^5]$

Tableau 13 : Quantification des entérocoques (en UFC/L)

Sur 3 séries de prélèvements, on dénombre en moyenne $2,2 \cdot 10^7$ UFC/L pour les entérocoques fécaux au niveau de l'entrée de la STEP et $1,4 \cdot 10^5$ UFC/L au niveau de la sortie. On observe alors un abattement moyen entre l'entrée et la sortie de la STEP, c'est-à-dire entre les eaux usées non traitées et les eaux usées traitées et rejetées dans l'environnement, de 2 log.

Entérocoques résistants à la vancomycine :

Nous avons isolé 6 souches d'ERV à partir des géloses sélectives pour ERV dans la série de prélèvements du 04/03/10 au niveau de la STEP de Ginestous. Ce sont tous des *Enterococcus faecium vanA*. Quatre ont été isolés au niveau du poste Sud (E.f1, E.f2, E.f3 E.f4) à partir de dilutions au 1/100, et les deux autres ont été isolés au niveau de l'exutoire de la STEP (E.f5, E.f6) dans des dilutions au 1/10. Nous pouvons alors estimer la concentration pour *Enterococcus faecium vanA* dans les effluents urbains à 10^6 UFC/L, et dans les effluents traités à 10^5 UFC/L.

Les résultats de l'antibiogramme pour les 6 souches d'*Enterococcus faecium vanA* isolées sont présentés dans le tableau suivant.

	Pen	am	gm	k	s	lvx	mox	e	Cli	qda	lnz	tec	van	te	ft	c	sxt
E.f1	R	R	S	R	R	I	S	R	R	I	S	R	R	R	S	S	R
E.f2	R	R	S	R	R	I	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R
E.f3	R	R	S	R	R	I	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R
E.f4	R	R	S	R	R	I	S	R	R	I	S	R	R	R	S	S	R
E.f5	R	R	S	R	R	I	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R
E.f6	R	R	S	R	R	I	S	R	R	I	S	R	R	R	S	S	R

Tableau 14 : Antibiogramme des 6 *Enterococcus faecium* Van A isolés (les antibiotiques gm, k et s sont utilisés à haute concentration)

L'identification de ces souches et la recherche du gène *vanA* par PCR confirme que nous avons isolé des souches d'*Enterococcus faecium* porteurs du gène *vanA*.

La caractérisation de ces souches par électrophorèse (ECP) en champs pulsés nous a permis de les comparer.

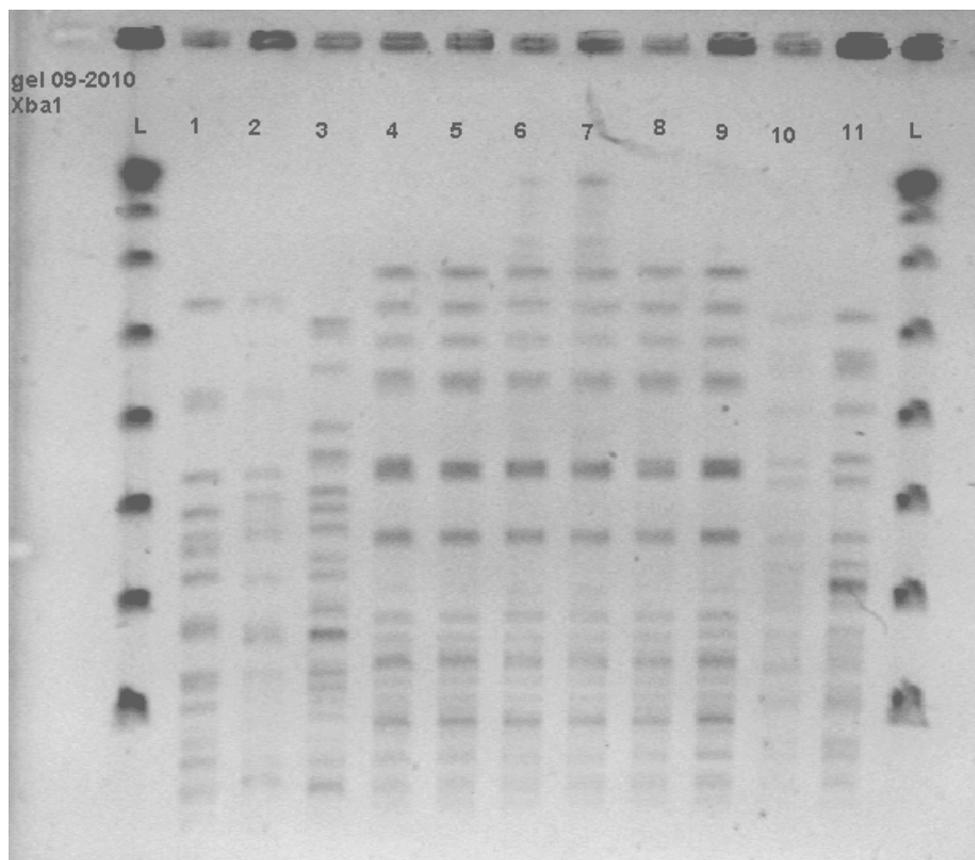


image 15 : Résultats de l'ECP pour les 6 ERV *vanA* isolés (1, 2, 3 : ERV *vanA* hospitaliers ; 10, 11 : ERV *vanB* ; 4, 5, 6, 7, 8, 9 : ERV *vanA* de notre étude)

Selon les résultats obtenus, les 6 ERV isolés sont clonaux, c'est-à-dire issus d'une même souche, différente des autres souches préalablement rencontrées au CHU.

Au niveau des effluents de l'hôpital de Ranguel, aucun ERV n'a été isolé lors des différentes campagnes de prélèvement.

III-5- Entérobactéries productrices de BLSE

Dénombrement des coliformes totaux :

Sur 3 séries de prélèvements, le dénombrement des coliformes totaux a pu être réalisé. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

	Prélèvement 1 02/03/10	Prélèvement 2 20/04/10	Prélèvement 3 06/05/10	moyenne
Collecteur Sud	$1,9 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$5,3 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$ $IC_{0,05}=[0,4 \cdot 10^8; 2 \cdot 10^8]$
Collecteur Nord	$9 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$ $IC_{0,05}=[6 \cdot 10^7; 9 \cdot 10^7]$
Sortie STEP	$2,6 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^6$ $IC_{0,05}=[0,5 \cdot 10^6; 2,9 \cdot 10^6]$

Tableau 15 : Quantification des coliformes totaux (en UFC/L)

On retrouve en moyenne sur 3 séries de prélèvements, au niveau de l'entrée de la STEP $1 \cdot 10^8$ UFC/L pour les coliformes totaux et $1,7 \cdot 10^6$ UFC/L au niveau de la sortie de la STEP.

On observe alors un abattement moyen pour les coliformes totaux entre l'entrée et la sortie de la STEP de 2 log.

III-5-1- Entérobactéries BLSE Ranguel :

Sur les 3 campagnes de prélèvement réalisées au niveau des effluents de Ranguel, 8 entérobactéries BLSE ont été isolées :

- 3 *Escherichia coli* BLSE (E.c1, E.c2, E.c3), dont deux isolées à partir d'une dilution au 1/1000, et une isolée à partir d'une dilution au 1/10000.

Concentration estimée : 10^3 à 10^4 UFC/L

- 1 *Pantoea spp* BLSE (P.4), isolée à partir d'une dilution au 1/1000

Concentration estimée : 10^3 UFC/L

- 2 *Serratia marcescens* BLSE (S.m5, S.m6), dont une isolée à partir d'une dilution au 1/1000 et l'autre isolée à partir d'une dilution au 1/10000.

Concentration estimée : 10^3 à 10^4 UFC/L

- 1 *Klebsiella oxytoca* BLSE (K.o7), isolée à partir d'une dilution au 1/10000.

Concentration estimée : 10^4 UFC/L

- 1 *Enterobacter cloacae* BLSE (En.8), isolé à partir d'une dilution au 1/1000

Concentration estimée : 10^3 UFC/L

Les résultats de l'antibiogramme pour les 8 souches d'entérobactéries BLSE isolées dans les effluents de Rangueil sont présentés dans le tableau suivant.

	am	amc	tic	tzp	cf	fox	ctx	caz	ert	ipm	an	gm	net	tm	na	cip	nor	ofx	ft	sxt
E.c1	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
E.c2	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E.c3	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P.4		S	R	S	R	I	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R
S.m5	R	I	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S
S.m6	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	I	R	R	S
K.o7	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S
En.8	R	R	R	I	R	R	R	I	S	S	I	R	R	R	R	S	I	I	S	S

Tableau 16 : Antibiogramme des entérobactéries BLSE isolées au niveau des effluents de Rangueil

III-5-2- Entérobactéries BLSE STEP Ginestous :

Sur les 3 campagnes de prélèvements réalisés au niveau de la STEP de Ginestous pour la recherche d'entérobactéries BLSE, 40 ont été isolées.

Au niveau du poste Sud :

- 17 *Escherichia coli* BLSE (E.c9 à E.c25) dont 14 ont été obtenues à partir de dilutions au 1/10 et 3 à partir de dilutions au 1/100.

Concentration estimée : 10^5 à 10^6 UFC/L

- 2 *Klebsiella pneumoniae* BLSE (K.p29 et K.p30), toutes les deux isolées à partir de dilutions au 1/100.

Concentration estimée : 10^6 UFC/L

Les résultats de l'antibiogramme pour les 19 souches d'entérobactéries BLSE isolées au niveau du poste Sud de la STEP de Ginestous sont présentés dans le tableau suivant.

	am	amc	tic	tzp	cf	fox	ctx	caz	ert	ipm	an	gm	net	tm	na	cip	nor	ofx	ft	sxt
E.c9	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
E.c10	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	S	R
E.c11	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c12	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c13	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R
E.c14	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c15	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E.c16	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c17	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c18	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E.c19	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c20	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c21	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S
E.c22	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R
E.c23	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	R	S	R	R	S	I	I	S	R
E.c24	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
E.c25	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K.p29	R	I	R	S	R	S	R	R	S	S	I	S	R	R	R	I	R	R	S	S
K.p30	R	I	R	S	R	S	R	R	S	S	I	S	R	R	R	I	R	R	S	S

Tableau 17 : Antibiogramme des entérobactéries BLSE isolées au niveau du collecteur Sud de la STEP de Ginestous

Au niveau du poste Nord :

- 11 *Escherichia coli* BLSE (E.c31 à E.c41) dont 7 isolées à partir de dilutions au 1/10 et 4 à partir de dilutions au 1/100.

Concentration estimée : 10^5 à 10^6 UFC/L.

- Une *Pantoea spp.* BLSE (P.43), isolée à partir d'une dilution au 1/100

Concentration estimée : 10^6 UFC/L.

Les résultats de l'antibiogramme pour les 12 souches d'entérobactéries BLSE isolées au niveau du poste Sud de la STEP de Ginestous sont présentés dans le tableau suivant.

	am	amc	tic	tzp	cf	fox	ctx	caz	ert	ipm	an	gm	net	tm	na	cip	nor	ofx	ft	sxt
E.c31	R	R	R	S	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
E.c32	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E.c33	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
E.c34	R	R	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c35	R	R	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S
E.c36	R	R	R	S	R	S	R	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R
E.c37	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	R	S	R	R	S	I	R	S	R
E.c38	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E.c39	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E.c40	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.c41	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
P.43	S	R	S	R	I	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S

Tableau 18 : Antibiogramme des entérobactéries BLSE isolés au niveau du collecteur Nord de la STEP de Ginestous

Au niveau de la sortie de la STEP :

- 3 *Escherichia coli* BLSE, dont 2 (E.c44 et E.c45) isolées à partir de 100 µL de l'échantillon pur et 1 (E.c46) à partir de 1 mL de l'échantillon pur.

Concentration estimée : 10^3 à 10^4 UFC/L.

- Une *Klebsiella pneumoniae* BLSE (K.p47) isolée à partir de 1 mL de l'échantillon pur.

Concentration estimée : 10^3 UFC/L.

- Une *Klebsiella oxytoca* BLSE (K.o48) isolée à partir de 1 mL de l'échantillon pur.

Concentration estimée : 10^3 UFC/L.

Les résultats de l'antibiogramme pour les 5 souches d'entérobactéries BLSE isolées au niveau du poste Sud de la STEP de Ginestous sont présentés dans le tableau suivant.

	am	amc	tic	tzp	cf	fox	ctx	caz	ert	ipm	an	gm	net	tm	na	cip	nor	ofx	ft	sxt	
E.c44	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
E.c45	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E.c46	R	I	R	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
K.p47	R	S	R	S	R	S	R	I	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	
K.o48	R	R	R	I	R	S	R	I	S	S	I	I	I	R	R	R	R	R	S	S	

Tableau 19 : Antibiogramme des entérobactéries BLSE isolés au niveau de la sortie de la

STEP

III-5-3- Aeromonas spp. producteurs de BLSE

Les *Aeromonas* n'étant pas des entérobactéries sont présentés à part.

- 3 *Aeromonas spp.* BLSE (A.26 à A.28), tous isolés à partir de dilutions au 1/100 au niveau du poste Sud de la STEP de Ginestous.

Concentration estimée : 10⁶ UFC/L

- Un *Aeromonas spp.* BLSE (A. 42), isolé à partir d'une dilution au 1/100 au niveau du poste Nord de la STEP de Ginestous.

Concentration estimée : 10⁶ UFC/L

Les résultats de l'antibiogramme pour les 5 souches d'entérobactéries BLSE isolées au niveau du poste Sud de la STEP de Ginestous sont présentés dans le tableau suivant.

	am	amc	tic	tzp	cf	fox	ctx	caz	ert	ipm	an	gm	net	tm	na	cip	nor	ofx	ft	sxt
A.26	R	I	R	S	R	I	I	I	S	S	S	S	S	R	R	I	R	R	S	S
A.27	R	I	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	I	S	R
A.28	R	I	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	I	S	I
A.42	R	R	R	I	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	R	S	I	I	S	S

Tableau 20 : Antibiogramme des *Aeromonas spp.* BLSE

La recherche des gènes de l'entérotoxine cytolytique chez les 4 *Aeromonas spp.* isolés est négative.

Le récapitulatif des bactéries productrices de BLSE isolées au niveau des différents sites de prélèvement est présenté dans le tableau suivant.

	RANGUEIL			STEP GINESTOUS		
	16/07/09	29/07/09	02/09/09	02/03/10	20/04/10	06/05/10
<i>E. coli</i>	1	1	1	2 sud 1 nord	13 sud 6 nord 1 sortie	2 sud 4 nord 2 sortie
<i>Aeromonas sp.</i>				3 sud 1 nord		
<u><i>E. cloacae</i></u>	1					
<i>Pantoea spp.</i>		1			1 nord	
<u><i>S. marcescens</i></u>		1	1			
<u><i>K. oxytoca</i></u>			1	1 sortie		
<u><i>K. pneumoniae</i></u>				1 sortie		2 sud

Tableau 21 : Les *enéro*bactéries BLSE isolées des différents sites de prélèvements

III-5-4- Recherche des gènes de virulence et de résistance chez les bactéries productrices de BLSE

La recherche des gènes de virulence chez *E. coli* BLSE codant pour l'intimine et les Shiga-toxines 1 et 2 est négative pour toutes les souches testées.

Les résultats de la recherche des gènes de résistance pour *E. coli* BLSE sont présentés dans le tableau suivant.

	BLSE TEM	BLSE SHV	BLSE CTX-M	BLSE OXA
E.c1	P	N	N	N
E.c2	N	N	P	N
E.c3	P	N	P	N
E.c9	P	N	N	N
E.c10	P	N	P	N
E.c11	N	N	P	N
E.c12	P	N	P	N
E.c13	N	N	P	N
E.c14	N	N	P	N
E.c15	N	N	P	N
E.c16	N	N	P	N
E.c17	N	N	P	N
E.c18	N	N	P	N
E.c19	P	N	P	N
E.c20	N	N	P	N
E.c21	P	N	P	N
E.c22	N	N	P	N
E.c23	N	N	P	N
E.c24	P	N	P	N
E.c25	P	N	P	N
E.c31	P	N	P	N
E.c32	N	N	P	N
E.c33	N	P	N	N
E.c34	N	N	P	N
E.c35	P	N	P	N
E.c36	P	N	P	N
E.c37	P	N	P	N
E.c38	N	N	P	N
E.c39	P	N	P	N
E.c40	N	N	P	N
E.c41	N	N	P	N
E.c44	N	N	P	N
E.c45	P	N	P	P
E.c46	N	N	P	N

Tableau 22 : Gènes de résistance des *Escherichia coli* BLSE isolés

Les résultats de la recherche des gènes de résistance pour les autres bactéries productrices de BLSE sont présentés dans le tableau suivant.

	BLSE TEM	BLSE SHV	BLSE CTX M	BLSE OXA
A.26	N	N	N	P
A.27	N	P	N	N
A.28	N	N	N	P
A.42	N	P	N	N
K.p29	P	N	N	N
K.p30	P	N	N	N
K.p47	P	N	P	P
K.o7	N	P	N	N
K.o48	N	P	N	N
S.m5	P	N	N	N
S.m6	P	N	N	N
P.4	P	N	N	N
P.43	N	P	N	N
En.8	N	P	N	N

Tableau 23: Gènes de résistance des autres entérobactéries BLSE isolées

Pour les 34 *E. coli* BLSE isolées, nous avons choisi de présenter dans les graphiques suivants les CMI pour 4 antibiotiques que sont amc, tzp, ctx et caz.

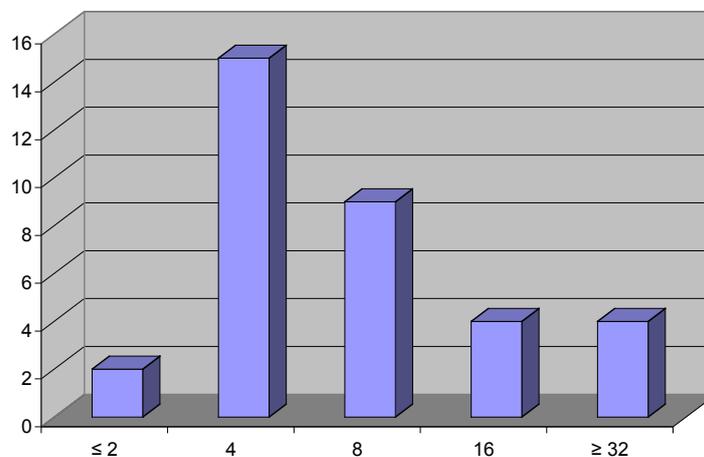


Figure 9 : *E. coli* BLSE et CMI pour amc

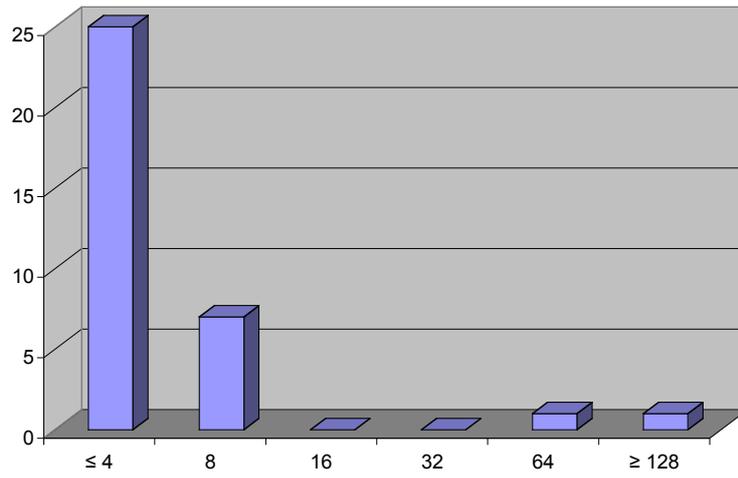


Figure 10 : *E. coli* BLSE et CMI pour tzp

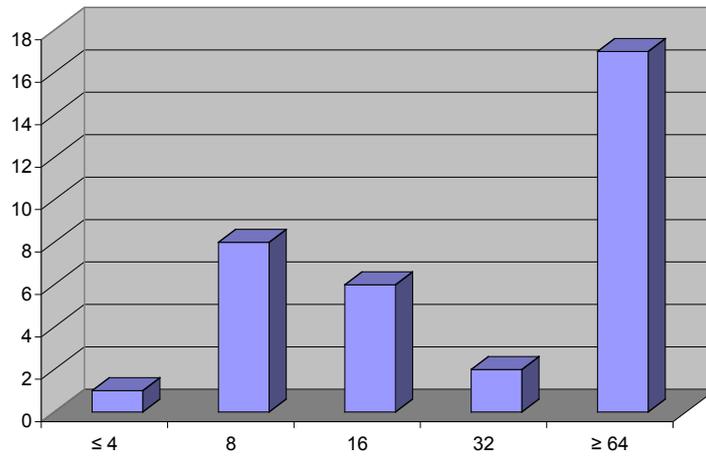


Figure 11 : *E. coli* BLSE et CMI pour ctx

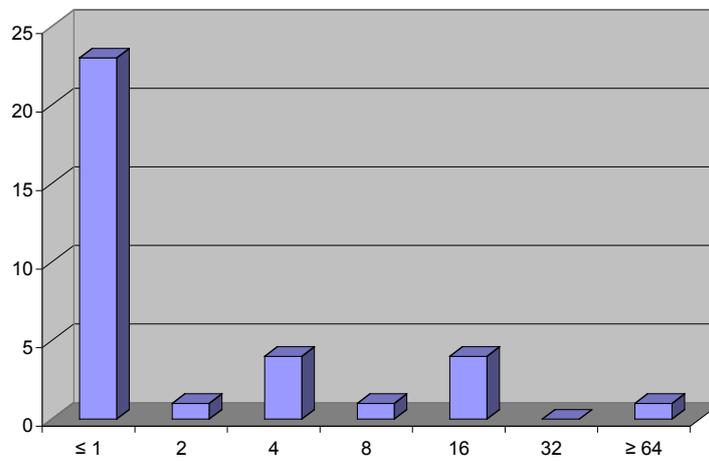


Figure 12 : *E. coli* BLSE et CMI pour caz

IV- DISCUSSION

IV-1- Caractérisation des effluents

IV-1-1 Bactéries « sensibles »

Au niveau des effluents de l'hôpital de Rangueil, les valeurs observées pour le dénombrement de la flore totale sont aux alentours de 10^8 UFC/L. Ces valeurs correspondent aux résultats relevés par différents auteurs, notamment BERNET et FINES (2000), qui observent une concentration pour la flore totale dans les effluents hospitaliers de $3 \cdot 10^8$ UFC/L.

Nous avons aussi quantifié les *P. aeruginosa* présents dans les effluents de l'hôpital de Rangueil et nous rapportons une concentration de 10^6 UFC/L. Des *P. aeruginosa* ont été retrouvés lors de chaque campagne de prélèvements à Rangueil alors qu'au niveau de la STEP de Ginestous, nous n'en avons retrouvé qu'une seule fois sur 3 campagnes de prélèvements différentes. Ceci peut s'accorder avec des résultats qui indiquent que les échantillons d'effluents hospitaliers sont plus souvent positifs pour *P. aeruginosa* (95%) que les effluents urbains (70%) [80] et pourrait s'expliquer par le fait que *P. aeruginosa*, germe pathogène opportuniste, est très largement présent à l'hôpital.

Au niveau de la STEP de Ginestous, la quantification des coliformes totaux et des entérocoques fécaux, nous indique que les effluents urbains arrivant au poste Sud et qui reçoivent entre autres les effluents des hôpitaux toulousains Purpan et Rangueil, ne semblent pas différents des effluents urbains arrivant au poste Nord qui reçoivent essentiellement des effluents provenant de zones d'habitation (cf. tableaux 13 et 15). Ceci semble donc indiquer que les effluents hospitaliers n'ont pas d'impact sur les effluents urbains en termes de contamination fécale. On peut rapprocher ces résultats avec ceux observés par BOILLOT (2008) qui rapporte que la contamination fécale des effluents hospitaliers est moins importante que celle observée dans les effluents urbains d'une grande ville, ou encore avec ceux de JEHANNIN (1999), qui indique que la flore bactérienne des effluents hospitaliers peut être assimilable à celle d'un effluent urbain classique.

Les résultats que nous observons pour les coliformes totaux et pour les entérocoques fécaux au niveau de l'exutoire de la STEP, montrent que cette dernière, permet un abattement

d'environ 2 log entre les eaux usées non traitées et les eaux usées traitées. Même si les STEP n'ont pas d'objectifs d'abattement microbiologique, on peut observer que la STEP de Ginestous rejette dans l'environnement des eaux qui ont une qualité microbiologique proche de celle exigée pour des eaux brutes (pouvant être utilisées pour la potabilisation). En effet, pour être potabilisées, des eaux de surface ne doivent pas contenir plus que 500 000 UFC/L de coliformes totaux et 100 000 UFC/L d'entérocoques fécaux. Avec des rejets observés sur la STEP de Ginestous de l'ordre de $1 \cdot 10^6$ UFC/L pour les coliformes totaux et de l'ordre de $1 \cdot 10^5$ UFC/L pour les entérocoques fécaux, il est très probable que les eaux de la Garonne où sont effectués ces rejets permettent une dilution suffisante des effluents de la STEP, et ainsi rendre les eaux potabilisables.

IV-1-2- Bactéries multirésistantes

Nous avons pu mettre en évidence, lors de nos différentes campagnes de prélèvements, la présence de bactéries multirésistantes dans les effluents hospitaliers et dans les effluents urbains de Toulouse.

IV-1-2-1- Entérobactéries BLSE

Il faut tout d'abord remarquer que nous avons mis en évidence la présence d'entérobactéries BLSE lors de chaque campagne de prélèvements, et aussi bien dans les effluents hospitaliers que dans les effluents urbains. Cela signe leur présence permanente dans les effluents.

Au niveau des effluents de l'hôpital de Rangueil, les concentrations observées étaient de l'ordre de 10^3 à 10^4 UFC/L, alors que dans les effluents urbains prélevés à l'entrée de la STEP, ces concentrations étaient autour de 10^5 à 10^6 UFC/L. La grande quantité de désinfectants utilisés à l'hôpital ainsi que la dilution importante de ces effluents (consommation d'eau jusqu'à 1200 Litres / lit/ jour contre 200 Litres/ habitants/ jour en ville) pourraient en partie expliquer les faibles concentrations observées dans les effluents hospitaliers. D'autre part, les concentrations observées au niveau du collecteur Nord (effluents urbains purs) et du collecteur Sud (mélange d'effluents urbains et hospitaliers) sont du même ordre (10^5 à 10^6 UFC/L) ce qui est en accord avec les résultats d'une étude qui

indiquent qu'en termes de bactéries multirésistantes, aucune différence n'est détectable entre les eaux usées municipales qui contiennent ou non les effluents hospitaliers [48]. Nos résultats suggèrent donc que la contribution de l'hôpital de Ranguel dans l'apport d'entérobactéries BLSE au niveau de la STEP, et par la suite dans l'environnement, est mineure par rapport à la contribution des effluents urbains. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par SERVAIS (2009) qui indique que les eaux usées domestiques sont la principale source d'entérobactéries BLSE dans les eaux des rivières du bassin de la Seine. Enfin, nos observations nous permettent de confirmer que les entérobactéries BLSE, qui étaient initialement des bactéries hospitalières [8], ont largement émergé en ville.

Les résultats que nous avons obtenus en sortie de STEP montrent la présence d'entérobactéries BLSE à des concentrations de l'ordre de 10^3 à 10^4 UFC/L. On observe donc un abattement d'environ 2 log entre les eaux usées non traitées et les eaux usées traitées pour les entérobactéries BLSE. Nous rapportons donc le même abattement pour les entérobactéries BLSE que pour les coliformes totaux et les entérocoques fécaux. Les résultats tirés de la littérature sont contradictoires en ce qui concerne le rôle des STEP dans la diffusion de bactéries multirésistantes dans l'environnement. En effet, certains résultats suggèrent que le traitement des eaux usées entraîne une augmentation de la fréquence de résistance aux antibiotiques chez *E. coli* notamment [29] alors que d'autres suggèrent que le traitement n'a pas sélectionné particulièrement des bactéries multirésistantes [36]. Nos résultats suggèrent que la STEP de Ginestous n'a pas sélectionné particulièrement les entérobactéries BLSE. En revanche, nos résultats objectivent le fait que la STEP de Ginestous rejette des entérobactéries BLSE dans l'environnement, ce qui est en accord avec ce qui est observé dans la littérature [84, 36, 29].

Enfin, sur 44 entérobactéries BLSE isolées, 34 sont des *E. coli* qui sont avec les entérocoques les véritables indicateurs de la contamination fécale. Nous les avons observés à chaque campagne de prélèvements, aussi bien dans les effluents hospitaliers que dans les effluents urbains en entrée et en sortie de STEP.

IV-1-2-2- SARM et P. aeruginosa multirésistant

La mise en évidence de la présence de SARM et de *P. aeruginosa* multirésistant n'a été possible que dans les effluents de l'hôpital de Ranguel. Ces BMR étant largement présentes à

l'hôpital, il semble normal de pouvoir les retrouver dans les effluents de l'hôpital de Ranguéil, notamment pour *P. aeruginosa*, espèce hydrophile pour qui les eaux usées hospitalières peuvent être un habitat idéal [80]. Leur présence dans les effluents hospitaliers a d'ailleurs été mise en évidence par plusieurs auteurs [75, 80]. En revanche, leur absence au niveau de la STEP peut nous interroger. La dilution des effluents hospitaliers par les effluents urbains, dans lesquels nous n'avons pas observé ces BMR (absence au niveau du collecteur Nord qui ne reçoit que des effluents urbains), pourrait expliquer leur absence au niveau de la STEP. De plus, l'eau n'étant pas un habitat naturel pour *S. aureus*, il est probable qu'il ne survive pas longtemps dans les eaux usées, excepté fixé dans un biofilm. Enfin, le portage humain des SARM est relativement faible, de 10^3 à 10^4 UFC/cm² au niveau de la muqueuse nasale, chez 10 à 40% des individus [11], ce qui pourrait expliquer sa faible dissémination. Nos résultats s'accordent pourtant avec ceux de SCHWARTZ *et al.* (2003) qui ont mis en évidence la présence de *S. aureus* porteurs du gène *mecA*, mais uniquement dans les biofilms présents dans le réseau d'évacuation des effluents hospitaliers, et pas dans les eaux usées urbaines. Il aurait alors été intéressant d'étudier les biofilms présents au niveau de la STEP et d'y rechercher la présence de SARM, afin de confirmer les résultats obtenus. Notons que le SARM que nous avons isolé n'était porteur que de deux facteurs de virulence parmi ceux recherchés : les entérotoxines A et E.

En ce qui concerne *P. aeruginosa* multirésistant, TUMEO *et al.* (2007) les ont mis en évidence dans les eaux usées hospitalières et urbaines, mais la fréquence de résistance aux antibiotiques était bien plus élevée dans les eaux usées hospitalières que dans les eaux usées urbaines. Des prélèvements plus nombreux nous auraient peut-être permis de les mettre en évidence au niveau de la STEP. Notons que les 2 *P. aeruginosa* multirésistants isolés sont résistants à 16 des 18 antibiotiques testés, qu'ils présentent une sensibilité intermédiaire à l'aztréonam, et qu'ils sont sensibles à la colistine.

IV-1-2-3- *Aeromonas* BLSE

La recherche des *Aeromonas* n'était pas prévue dans notre étude. Malgré tout, nous avons choisi, lors d'une série de prélèvements, d'isoler quelques colonies oxydase-positives, à partir des milieux sélectifs pour entérobactéries BLSE. Nous avons réalisé le test de synergie sur gélose Müller-Hinton avec et sans cloxacilline, pour mettre en évidence la présence de BLSE sur ces colonies. Nous avons ainsi isolé 4 *Aeromonas* producteurs de BLSE au niveau

de l'entrée de la STEP, dans les collecteurs Nord et Sud, à une concentration de 10^6 UFC/L. Leur présence au niveau de l'entrée de la STEP pourrait entraîner leur présence dans les eaux de la Garonne, ce qui confirmerait les résultats de GIRLICH (2010) qui a récemment mis en évidence la présence d'*Aeromonas* BLSE dans les eaux de la Seine. Nous n'avons pas réalisé la recherche systématique des *Aeromonas* BLSE car il aurait été trop fastidieux d'analyser toutes les colonies (oxydase-négatives et oxydase-positives) présentes sur les milieux sélectifs pour entérobactéries BLSE.

IV-1-2-4- Entérocoques résistants aux glycopeptides

La présence d'ERV dans les eaux usées n'a été mise en évidence qu'au niveau de la STEP de Ginestous. Il s'agissait d'*Enterococcus faecium* porteurs du gène *vanA*. Nous les avons retrouvés seulement lors d'une campagne de prélèvements, au niveau du collecteur Sud à la concentration 10^6 UFC/L, et au niveau de la sortie de la STEP à la concentration de 10^5 UFC/L, objectivant ainsi qu'ils peuvent se retrouver dans les eaux de l'environnement. Ces résultats confirment les résultats de plusieurs études qui mettent en évidence la présence d'ERV dans l'environnement [87, 75, 46, 52, 3]. Les ERV étant des germes présents à l'hôpital, leur absence dans les effluents hospitaliers peut sembler étonnante. Il aurait été intéressant de tester la sensibilité de ces germes aux désinfectants et détergents utilisés à l'hôpital. En effet, s'il s'avérait que les ERV sont plus sensibles à ces produits que les entérobactéries BLSE, les SARM ou les *P. aeruginosa*, cela pourrait expliquer leur absence dans les effluents hospitaliers.

Les résultats de l'électrophorèse en champs pulsés nous indiquent que les ERV que nous avons isolés sont différents des *E. faecium vanA* isolés au CHU de Toulouse, et surtout qu'ils sont clonaux, c'est à dire issus d'une même souche. Le fait de retrouver des ERV clonaux sur deux points de prélèvements différents (Collecteur Sud et Sortie de la STEP) peut sembler étonnant. Cela signifierait qu'un clone s'est développé au niveau de la STEP de Ginestous, mais qu'il n'aurait existé que temporairement car nous ne l'avons pas retrouvé lors des 2 campagnes de prélèvement suivantes.

IV-2- Caractérisation des entérobactéries BLSE isolées

IV-2-1- *Escherichia coli* BLSE

Les gènes de résistance et les gènes de virulence :

Comme nous l'avons vu auparavant, 77% des entérobactéries BLSE que nous avons isolées sont des *E. coli* (34 sur 44). Aucun de ces *E. coli* ne portait de gènes de virulence codant pour l'intimine et les Shiga-toxines 1 et 2, ce qui suggère que les *E. coli* BLSE de l'environnement semblent peu virulents, en tout cas pour les facteurs de virulence généralement recherchés à l'hôpital.

La recherche des gènes de résistance nous indique que tous les *E. coli* BLSE isolés sont positifs pour au moins 1 gène de résistance. 91% (31 sur 34) portent le gène codant pour une enzyme CTX-M et parmi eux 42% (13 sur 31) portent aussi le gène codant pour une enzyme TEM. Seulement 3 des *E. coli* BLSE isolés ne portent pas l'enzyme CTX-M et parmi eux, 2 ne portent que l'enzyme TEM et une ne porte que l'enzyme SHV. Enfin, l'enzyme OXA n'est présente que sur une souche isolée, associée à une enzyme TEM et une enzyme CTX-M (cf. tableau 22).

Nous observons donc que la majorité des *E. coli* BLSE isolés portent l'enzyme CTX-M ce qui pourrait confirmer les résultats observés dans la littérature [89], qui indiquent que, à l'heure actuelle, les souches de *E. coli* productrices de CTX-M représentent la majorité des entérobactéries BLSE et sont retrouvées dans tous les types de services hospitaliers. Ceci confirme également que la prévalence de CTX-M chez les *E. coli* BLSE est très importante et qu'elle peut atteindre 90 % des *E. coli* BLSE [89]. Les *E. coli* BLSE que nous avons isolés ont des origines variées puisque nous en avons isolés au niveau des effluents hospitaliers et des effluents urbains. Ceci confirme l'émergence des *E. coli* BLSE dans la communauté, ainsi que la large diffusion des enzymes CTX-M. Il est probable que certains de nos *E. coli* BLSE CTX-M isolés aient une origine animale, car il est rapporté que les animaux peuvent constituer un important réservoir d'*E. coli* BLSE CTX-M [89, 7].

Sensibilité aux antibiotiques :

L'analyse de la résistance aux antibiotiques des *E. coli* BLSE nous indique qu'ils sont généralement sensibles aux inhibiteurs de bêta-lactamases. En effet, pour l'association

amoxicilline/acide clavulanique, 17 sont sensibles avec des CMI ≤ 2 ou égales à 4 mg/L, 9 présentent une sensibilité intermédiaire avec une CMI de 8 mg/L, et seulement 8 sont résistants avec des CMI de 16 mg/L et ≥ 32 mg/L (cf. figure 9). Ces résultats suggèrent donc qu'il serait possible d'utiliser l'association amoxicilline/acide clavulanique pour traiter des infections à *E. coli* BLSE, alors qu'il était généralement recommandé de ne pas utiliser de bêta-lactamines dans le traitement des infections dues à *E. coli* BLSE. En ce qui concerne l'association pipéracilline/tazobactam, 32 sont sensibles dont 25 avec une CMI ≤ 4 mg/L et 7 avec une CMI de 8 mg/L. Seulement 2 sont résistants avec des CMI de 64 et ≥ 128 mg/L (cf. figure 10). Là aussi, ces résultats suggèrent que le traitement d'infections par ces bactéries pourrait utiliser cette association. On remarque aussi que ces *E. coli* BLSE sont plus sensibles à l'association pipéracilline/tazobactam qu'à l'association amoxicilline/acide clavulanique, ce qui confirme des résultats issus de la littérature qui indiquent que les BLSE CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique [89].

Pour l'antibiotique céfotaxime, tous les *E. coli* BLSE isolés sont résistants et 17 isolats présentent une résistance de haut niveau avec une CMI ≥ 64 mg/L (cf. figure 11). Pour le ceftazidime, seulement 5 isolats présentent une résistance avec des CMI de 16 mg/L (4 isolats) et ≥ 64 mg/L (1 isolat). Les 29 autres souches présentent une sensibilité intermédiaire avec des CMI ≤ 1 mg/L pour 23 isolats, les autres isolats présentant des CMI de 2 à 8 mg/L (cf. figure 12). Ces observations nous suggèrent que la plupart des *E. coli* BLSE isolés possèdent des céfotaximases, plutôt que des ceftazidimases, confirmant ainsi les résultats de la recherche de gènes de résistance qui montre que 91% de *E. coli* isolés portent une CTX-M (céfotaximase) qui hydrolyse préférentiellement le céfotaxime. Il est donc probable que pour certaines souches portant à la fois les enzymes CTX-M et TEM, le phénotype BLSE observé provient de l'enzyme CTX-M. Malgré tout, certains variants de l'enzyme TEM, comme TEM-3, étant des céfotaximases, la détermination précise des variants de ces enzymes nous aurait permis de distinguer les souches pour lesquelles le phénotype BLSE est dû à une CTX-M de celles dont le phénotype BLSE est dû à une TEM.

Signalons également que toutes les *E. coli* BLSE isolées sont sensibles à l'imipénème et à l'ertapénème. En revanche, 16 d'entre elles présentent une résistance associée aux quinolones, ce qui peut poser un problème en thérapeutique, car *E. coli* est aussi un germe urinaire, et les quinolones sont les antibiotiques utilisés généralement dans les infections urinaires.

Enfin, il aurait été intéressant de pouvoir comparer toutes ces souches par électrophorèse en champs pulsés et ainsi déterminer leur degré de clonalité. La littérature rapporte tout de même que la taille considérable des réservoirs commensaux chez l'homme (10^8 *E. coli* par gramme de fèces) et l'animal explique que le degré de clonalité entre ces souches est beaucoup plus faible que celui qu'on connaît par exemple pour *Enterobacter* BLSE ou pour les SARM [89]. Cela suggère que l'endémie croissante de *E. coli* BLSE est plus une épidémie de gènes par transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles, qu'une épidémie de souches.

IV-2-2- Les autres entérobactéries BLSE

L'analyse des gènes de résistance chez les autres entérobactéries BLSE isolées (10 au total) montre qu'une seule souche, une *K. pneumoniae*, est porteuse de l'enzyme CTX-M, sur les 3 *K. pneumoniae* isolées (cf. tableau 23). Ceci confirme que l'on retrouve plus fréquemment l'enzyme CTX-M chez *E. coli* BLSE que chez les autres entérobactérie BLSE. D'autre part, au sein des entérobactéries BLSE, *K. pneumoniae* représente environ 15% alors que *E. coli* représenterait 58% des entérobactéries BLSE [89]. Nos résultats semblent accentuer cette différence puisque 77% des entérobactéries BLSE isolées lors de notre étude sont des *E. coli*, alors que seulement 7% environ (3 sur 44) sont des *K. pneumoniae*. Signalons que cette souche porteuse d'une CTX-M porte aussi une enzyme TEM et une enzyme OXA.

Les 2 *K. oxytoca* isolées portent une enzyme SHV, et l'une de ces *K. oxytoca* isolée dans les effluents de Ranguel, est résistante à 16 antibiotiques sur 20 testés, a une sensibilité intermédiaire pour 2 antibiotiques et est sensible à 2 antibiotiques que sont imipénème et triméthoprime/sulfaméthoxazole.

Enfin, les 2 *S. marcescens* BLSE isolées portent une enzyme TEM. Pour les *Pantoea spp.* BLSE, l'une porte une enzyme TEM, l'autre une enzyme SHV. L'*Enterobacter cloacae* BLSE porte une enzyme SHV.

IV-2-3- Les *Aeromonas* BLSE

L'analyse des gènes de résistance chez les 4 *Aeromonas* BLSE isolés montre que deux d'entre eux portent une enzyme SHV et les deux autres une enzyme OXA. La présence de

l'enzyme SHV semble confirmer les résultats de GIRLICH (2010) qui a récemment mis en évidence cette enzyme chez *Aeromonas* BLSE. En revanche il n'a pas observé la présence de l'enzyme OXA sur des *Aeromonas* BLSE et nous n'avons pas trouvé de publications faisant état de la présence de cette enzyme chez des *Aeromonas* BLSE.

IV-3- Améliorations à apporter à notre méthode

Il serait intéressant d'effectuer en parallèle de la recherche des BMR, le dosage des antibiotiques présents dans les milieux où ces BMR sont retrouvées. Cela permettrait peut-être de déterminer si la présence de résidus d'antibiotiques dans l'environnement est réellement responsable de l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

Une quantification plus précise des bactéries retrouvées pourrait permettre de déterminer la proportion de bactéries multirésistantes dans une espèce donnée. La réalisation de prélèvements plus nombreux pourrait permettre de palier en partie ce problème.

La comparaison de toutes les souches isolées par électrophorèse en champs pulsés nous donnerait des indications précieuses sur la diffusion clonale ou non de ces BMR.

La recherche directe de gènes de résistance par PCR en temps réel, pourrait simplifier le travail et permettre ainsi de traiter plus d'échantillons. En revanche, l'existence de nombreux faux positifs est un problème. En effet, au CHU de Toulouse, le dépistage des ERV est réalisé par PCR en temps réel, et il semble que seulement 33% des entérocoques pour lesquels des gènes de résistance aux glycopeptides ont été retrouvés, soient réellement résistants aux glycopeptides. Notre méthode a l'avantage de déterminer à l'avance le caractère multirésistant des bactéries que nous avons isolées.

V- SYNTHÈSE

Notre étude nous a permis de mettre en évidence la présence de BMR dans les effluents hospitaliers et dans les effluents urbains. La grande majorité des BMR retrouvées sont des entérobactéries BLSE, dont 77% sont des *Escherichia coli* qui portent dans 91% des cas une enzyme CTX-M, signant ainsi l'émergence de ces BMR dans la communauté, car présentes à la fois dans les effluents hospitaliers et urbains, et présentes également au niveau de l'exutoire de la STEP. Les SARM et *P. aeruginosa* multirésistants n'ont été retrouvés que dans les

effluents hospitaliers. Les ERV et *Aeromonas* BLSE n'ont été isolés que lors d'une campagne de prélèvements et ce, dans les effluents urbains.

Les effluents de l'hôpital de Ranguel ne semblent pas avoir un impact plus important que les effluents urbains sur la diffusion de bactéries multirésistantes dans l'environnement.

La STEP de Ginestous ne semble pas sélectionner particulièrement les BMR. En revanche, nous avons mis en évidence qu'elle rejette dans l'environnement des BMR.

CONCLUSION

Nous avons pu mettre en évidence la présence de bactéries multirésistantes dans les effluents hospitaliers et dans les effluents urbains au niveau de la ville de Toulouse. Nous avons également observé leur rejet dans l'environnement à partir de la station d'épuration de Ginestous. La majorité des bactéries multirésistantes isolées étaient des entérobactéries BLSE, dont 77% étaient des *Escherichia coli* BLSE, qui portaient de manière prépondérante une BLSE de type CTX-M.

Nous avons pu observer que les effluents de l'hôpital de Rangueil n'ont pas plus d'impact que les effluents urbains sur la diffusion des bactéries multirésistantes dans l'environnement, et que la station d'épuration de Ginestous permet un abattement similaire pour les bactéries témoins de contamination fécale et pour les bactéries multirésistantes.

Si le rôle des antibiotiques dans l'émergence des bactéries multirésistantes en thérapeutique humaine et animale est clairement défini, il est encore flou aux concentrations subthérapeutiques retrouvées dans l'environnement. Il reste donc à étudier, et le dosage des antibiotiques dans les milieux où sont retrouvées les bactéries multirésistantes est une perspective intéressante.

Enfin, après avoir observé le rejet de bactéries multirésistantes dans les eaux de la Garonne, il semblerait intéressant d'étudier leur présence dans les eaux de la Garonne en aval de la ville de Toulouse, permettant ainsi de connaître l'impact d'une grande ville comme Toulouse sur la présence de bactéries multirésistantes dans l'environnement. Dans cette perspective, le typage des souches isolées par électrophorèse en champs pulsés pourrait permettre de déterminer leur origine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ALONSO A., SANCHEZ P., MARTINEZ J.L., Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, 2001, 3, p. 1-9
- 2- BAQUERO F., MARTINEZ J.L., CANTON R., Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19, p. 260-265
- 3- BEIER R.C., DUKE S.E., ZIPRIN R.L., HARVEY R.B., HUME M.E., POOLE T.L., SCOTT R.B., HIGHFIELD L.D., ALALI W.Q., ANDREWS K., ANDERSON R.C., NISBET D.J., Antibiotic and disinfectant susceptibility profiles of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* (VRE) isolated from community wastewater. *Bull. Environ., Contam. Toxicol.*, 2008, 80, p.188-194
- 4- BERNET S., FINES M., Effluents du CHU de CAEN : Etude qualitative et quantitative de la flore microbienne et recherche de bactéries multirésistantes. Poster. Quatrième journée du Réseau Régional d'Hygiène de Basse-Normandie, Caen, 2000, 1 p.
- 5- BLANCO G., LEMUS J.A., GRANDE J., Microbial pollution in wildlife : Linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environmental Research*, 2009, 109, p. 405-412
- 6- BOILLOT C., 2008, Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques, Thèse de doctorat : Ecole doctorale de chimie de Lyon, 292 p.
- 7- BONNEDAHN J., DROBNI M., GAUTHIER-CLERC M., HERNANDEZ J., GRANHOLM S., KAYSER Y., MELHUS A., KAHKMEYER G., WALDENSTRÖM J., JOHANSSON A., OLSEN B., Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between, humans and yellow-legged Gulls in the south of France, *Plos One*, 2009, 4,6, 6 p.
- 8- BONNET R., 2007, Béta-lactamines et entérobactéries, In COURVALIN P., LECLERCQ R., BINGEN E., *Antibiogramme*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 141-162
- 9- BONNIN J., 1984, *L'eau dans l'antiquité*, Editions Eyrolles, Paris.
- 10- BOUVET A., SCHLEGEL L., LOUBINOUX J. 2007, *Streptococcaceae : Streptococcus, Abiotrophia, Granulicatella, Enterococcus...* In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 868-874

- 11-** BRUN Y., BES M., VANDENESCH F., 2007, *Staphylococcus*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 796-830
- 12-** CARDOZA L.A., KNAPP C.W., LARIVE C.K., BELDEN J.B., LYDY M., GRAHAM D.W., Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water, Air and Soil Pollution*, 2005, 161, p. 383-398
- 13-** CATTOIR V., DAUREL C., Quelles nouveautés en antibiothérapie ? *Médecine et Maladies infectieuses*, 2009, doi :10.1016/j.medmal.2009.10.009
- 14-** CATTOIR V., Les nouvelles bêta-lactamses à spectre étendu (BLSE), *Pathologie infectieuse en réanimation*, p. 203-209
- 15-** CHITNIS V., CHITNIS S., VAIDYA K., RAVIKANT S., PATIL S., CHITNIS D.S., Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. *Water Research*, 2004, 38, p. 441-447
- 16-** COLOM K., PEREZ J., FERNANDEZ-ARANGUIZ A., LARINO E., CISTERNA R., Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and bla OXA-1 genes in Enterobacteriaceae, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 223, p. 147-151
- 17-** DARSY C., LESCURE I., PAYOT V., ROULAND G., Effluents des établissements hospitaliers : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues, 2002, Office International de l'Eau
- 18-** DAVIN-REGLI A., BORNET C., 2007, *Enterobacter*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 1116-1122
- 19-** DEALDA M.J., DIAZCRUZ S., PETROVIC M., BARCELO D., Liquid chromatography –tandem mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs, and alkylphenolic surfactants) in the environment, *J. Chromatog.r A*, 2003, 1000, p. 503-506
- 20-** DESBROW C., ROUTLEDGE E.J., BRIGHTLY G.C., SUMPTER J.P., WALDOCK M., Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and *in vitro* Biological Screening. *Environmental Science and Technology*, 1998, 32, 11, p. 1549-1558
- 21-** DRANCOURT M., 2007, *Klebsiella*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p.1011-1015
- 22-** DREMONT C. et HADJALI, R., Gestion des effluents liquides en milieu hospitalier– Université de Technologie de Compiègne - 1997 URL : http://www.utc.fr/~farges/dess_tbh/96-97/Projets/EL/EL.htm

- 23-** DUONG H.A., PHAM N.H, NGUYEN H.T., HOANG T.T., PHAM H.V., PHAM V.C., BERG M., GIGER W., ALDER A.C., Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*, 2008, 72, p. 968-973
- 24-** EMMANUEL E., 2004, Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. Lyon: 259p.
- 25-** FEITOSA-FELIZZOLA J., TEMINE B., CHIRON S., Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography - ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1164, p. 95-104
- 26-** FEITOSA-FELIZZOLA J., CHIRON S., Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *Journal of Hydrology*, 2009, 364, p. 50-57
- 27-** FENET H., GOMEZ E., LECLERC M., CASELLAS C., Devenir des médicaments dans l'environnement, *Environ Risques Santé*, 2006, 5, p. 243-247
- 28-** FERNANDO DELGADO ZAMBRANO L., 2009, Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux: élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé, Thèse de doctorat : Ecole doctorale de Mécanique, Energétique, Génie civil, & Procédés de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 284 p.
- 29-** FERREIRA DA SILVA M., VAZ-MOREIRA I., GONZALEZ-PAJUELO M., NUNES O.C., MANAIA C.M., Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, 60, 166-176
- 30-** FORTINEAU N., BOURDON N., LECLERCQ R., VACHEE A., DELARBRE J.M., MAUGAT S., ROBERT J., ONERBA, Low carriage of vancomycine-resistant enterococci in the digestive tract of french hospitalised patients : a nationwide prospective study in 2006, *J. Hosp. Infect.*, 2011, 77, p. 179-181
- 31-** FRENEY J., MONNET D., CROZE M., 2007a, *Serratia*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 1025-1033

- 32-** FRENEY J., CROZE M., 2007b, *Enterobacteriaceae – Généralités*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 979-987
- 33-** GIGER W., Emerging chemical drinking water contaminants, Identifying future drinking water contaminants, 2000, *The National Academy Press*
- 34-** GIRLICH D., POIREL L., NORDMANN P., A diversity of clavulanic acid inhibited extended spectrum beta-lactamases in *Aeromonas* sp. From the Seine River, Paris, France, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, en ligne le 13 décembre 2010
- 35-** HARF-MONTEIL C., MONTEIL H., 2007, *Aeromonas*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 1167-1174
- 36-** GUARDABASSI L., LO FO WONG D.M.A., DALSGAARD A., The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*, 2002, 36, p. 1955-1964
- 37-** HEUER H., KRÖGERRECKLENFORT E., WELLINGTON E.M.H., EGAN S., VAN ELSAS J.D., VAN OVERBEEK L., COLLARD J.-M., GUILLAUME G., KARAGOUNI A.D., NIKOLAKOPOULOU T.L., SMALLA K., Gentamicin resistance genes in environmental bacteria : prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42, p. 289-302
- 38-** HIRSCH R., TERNES T.A., HABERER K., MEHLICH A., BALLWANZ F., KRATZ K.L., Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1998, 815, p. 213–223
- 39-** HOUETO P., Envirovigilance: Réglementation Européenne et Evaluation du risque Environnemental des médicaments, AFSSAPS, Direction de l'Évaluation des Médicaments et Produits Biologiques, Juin 2002.
- 40-** HUSSON M.O., HARF-MONTEIL C., MONTEIL H., 2007, *Pseudomonas – Burkholderia – Ralstonia – Pandorea*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p.1123-1130
- 41-** JEHANNIN P., 1999, Caractérisation et gestion des rejets liquides hospitaliers - étude particulière de la station du centre hospitalier de Hyères (Var), Mémoire de fin d'étude - Spécialité Génie Sanitaire, Rennes: Ecole Nationale de la Santé Publique, 71p.

- 42-** JOHNSON J.K., SMITH G., LEE M.S., VENEZIA R.A., STINE O.C., NATARO J.P., HSIAO W., HARRIS A.D., The role of patient-to-patient Transmission in the acquisition of Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Colonization in the intensive care unit. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 200, p. 900-905
- 43-** KEMPER N., Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 2008, 8, p. 1-13
- 44-** KINGOMBE C.I., HUYS G., TONOLLA M., ALBERTI M.J., SWINGS J., PEDUZZI R., JEMMI T., PCR détection characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, p. 293-302
- 45-** KOLPIN D.W., FURLONG E.T., MEYER M.T., THURMAN E.M., ZAUGG S.D., BARBER L.B., BUXTON H.T., Pharmaceuticals, hormones, and organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36, p. 1202-1211
- 46-** KÜMMERER K., Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 54, p. 311-320
- 47-** KÜMMERER K., Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 2009a, 75, p. 417-434
- 48-** KÜMMERER K., Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, 2009b, 75, p. 435-441
- 49-** KÜMMERER K., The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use. Present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 2009c, 90, p. 2354-2366
- 50-** LÄNGIN A., ALEXY R., KÖNIG A., KÜMMERER K., Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere*, 2009, 75, p. 347-354
- 51-** LARSSON J., DE PEDRO C., PAXEUS N., Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* 2007, 148, 3, p. 751-755
- 52-** LATA P., RAM S., AGRAWAL M., SHANKER R., *Enterococci* in river Ganga surface waters : Propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BMC Microbiology*, 2009, 9, 140,
- 53-** LEPRAT P, Caractéristiques et impacts des rejets liquides hospitaliers. *Techniques hospitalières*, 1999, 634, p. 56-57

- 54-** LEPRAT P, CHEDEVERGNE E, CAMUS A, PACHECO A et MOUNIER M, Diagnostic physico-chimique et microbiologique des rejets hospitaliers. État des lieux à l'hôpital Dupuytren CHU de Limoges. *Techniques hospitalières*, 1996, 612, p. 35-38
- 55-** LE ROY LADURIE E., 1983, *L'histoire du climat depuis l'an mil*, Editions Flammarion, Paris.
- 56-** LEVI Y., HAGUENOER J.M., Antibiotiques et Pesticides dans les eaux : les risques à court et moyen termes. <http://www.canalacademie.com/Antibiotiques-et-pesticides-dans.html>, 2008
- 57-** LIVRELLI V., BONNET R., JOLY B., DARFEUILLE-MICHAUD A., 2007, *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*, In FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R., RIEGEL P., *Précis de bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Editions ESKA, p. 989-1010
- 58-** LÖFFLER D., TERNES T., Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 2003, 1021, p. 133-144
- 59-** MAINIL J., Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : II) Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, 147, p. 159-171
- 60-** MAINIL J., VAN BOST S., Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : IV) Souches nécrotoxigènes. *Ann. Méd. Vét.*, 2004, 148, p. 121-132
- 61-** MANEGLIER H., 1991, *Histoire de l'eau*, François Bourin, Paris.
- 62-** MANSOTTE F. and JESTIN E., Les rejets liquides des établissements de santé : Caractérisation à la source et impact sur l'environnement marin côtier. Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales de la Seine Maritime, Agence de l'Eau de la Seine Normandie, Nanterre, 2000, 73 p.
- 63-** MARTINEZ J.L., Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in natural environments. *Science*, 2008, 321, p. 365-367
- 64-** MARTY N., PASQUIER C., DOURNES J.L., CHEMIN K., CHAVAGNAT F., GUINAND M., CHABANON G., PIPY B., MONTROZIER H., Effects of characterised *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides on adherence to human tracheal cells, *J. Med. Microbiol.*, 1998, 47, p. 129-134
- 65-** MEHROTRA M., WANG G., JOHNSON W.M., Multiplex PCR of detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance, *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, P. 1032-1035

- 66-** MOUBAREK C., BOURGEOIS N., DOUCET-POPULAIRE F., L'utilisation des antibiotiques en pratique vétérinaire et ses risques pour la santé humaine, *Environ Risques Santé*, 2003, 2, p. 97-104
- 67-** MUNIOZ-AGUAYO J., LANG K.S., LA PARA T.M., GONZALES G., SINGER R.S., Evaluating the effects of chlortetracycline on the proliferation of antibiotic resistant bacteria in a simulated river water ecosystem, *Appl Environ Microbiol*, 2007, *in press*
- 68-** NAGESWARA RAO R., VENKATESWARLU N., NARSIMHA R., Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1187, p. 151-164
- 69-** NOVO A., MANAIA C. M., Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010
- 70-** ONERBA, 2010, *Rapport d'activité 2008*, Edition Décembre 2010, Paris : Vivactis plus Editions, 168 p.
- 71-** PRERE M.F., FAYET O., A new genetic test for the rapid identification of shiga-toxines producing (STEC), enteropathogenic (EPEC) *E. coli* isolates from children, *Pathol. Biol. (Paris)*, 2005, 53 P. 466-469
- 72-** ROSAS I., SALINAS E., MARTINEZ L., CALVA E., CRAVIOTO A., ESLAVA C., AMABILE-CUEVAS C.F., Urban dust fecal pollution in Mexico City : Antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2006, 209, p. 461-470
- 73-** ROUILLARD T., LE GUENNEC J. et MOALIC P.Y., Détection et identification par PCR des facteurs de virulence de souches d'*Escherichia coli* responsables de diarrhées néonatales. *Revue Méd. Vét.*, 2002, 153, 4, p. 261-268
- 74-** SABATE M., PRATS G., MORENO E., BALLESTE E., BLANCH A.R., ANDREU A., Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology*, 2008, 159, p. 288-293
- 75-** SCHWARTZ T., KOHNEN W., JANSEN B. et OBST U., Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43, 3, p. 325-335
- 76-** SERVAIS P., PASSERAT J., Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine River watershed (France). *Science of the Total Environment*, 2009, 408, p. 365-372

- 77- SMITH A.J., BALAAM J.L., WARD A., The development of a rapid screening technique to measure antibiotic activity in effluents and surface water samples. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54, p. 1940–1946
- 78- SQUINAZI F., Molécules antibiotiques et antibiorésistance des bactéries dans les eaux de consommation, Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris,; consulté le 21/01/11
http://www.celluleregionalehygiene.com/images/48/download/13_Presence%20molec%20medicamentuses%20ATB%20et%20resistance%20microorg%20dans%20eau.pdf
- 79- TAMTAM F., MERCIER F., LE BOT B., EURIN J., TUC DINH Q., CLEMENT M., CHEVREUIL M., Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environnement*, 2008, 393, p. 84-95
- 80- TUMEO E., GBAGUIDI-HAORE H., PATRY I., BERTRAND X., THOUVEREZ M., TALON D., Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2008, 211, p. 200-204
- 81- VARSHNEY A.K., MEDIAVILLA J.R., ROBIOU N., GUH A., WANG X., GIALANELLA P., LEVI M.H., KREISWIRTH B.N., FRIES B.C., Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75, 21, p. 6839-6849
- 82- WATKINSON A.J., MURBY E.J., KOLPIN D.W., COSTANZO S.D., The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment*, 2009, 407, p. 2711–2723
- 83- WATKINSON A.J., MURBY E.J., COSTANZO S.D., Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling, *Water Res*, 2007, 41, p. 4164-4176
- 84- YANG C.M., LIN M.F., LIAO P.C., YEH H.W., CHANG B.V., TANG T.K., CHENG C., SUNG C.H., LIOU M.L., Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48, p. 560-565
- 85- ZHANG X.X., ZHANG T., FANG H.P., Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 82, p. 397-414
- 86- RAPPORT DE L'ACADEMIE NATIONALE DE PHARMACIE, *Médicaments et Environnement*, septembre 2008, 103 p.
- 87- AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS, *Analyse des*

mécanismes qui aboutissent à la présence de bactéries antibiorésistantes dans les eaux – éléments d'évaluation des risques, juillet 2006, 15 p.

88- CONSEIL SUPERIEUR D'HYGIENE PUBLIQUE DE France, Section des eaux, *Retour d'expérience des traitements anti-amibiens par untra-violets sur les circuits de refroidissement du CNPE de Civaux (Vienne) présenté par EDF*, 7 mai 2002, 2 p.

http://www.sante-jeunesse-sports.gouv.fr/.../cshpf/a_e_070502_amib_civaux.pdf

89- HAUT CONSEIL DE LA SANTE PUBLIQUE, Commission spécialisée Sécurité des patients : infections nosocomiales et autres événements indésirables liés aux soins et aux pratiques, *Rapport Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination*, février 2010, 71 p.

90- CNRS, Dossiers scientifiques Sagascience : L'eau douce une ressource précieuse,

<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/univers/MenuUniv.html> (consulté 10/2010)

91- Le LERM, Dossier technique, *Les réseaux d'assainissement : petite histoire et fonctionnement*, http://www.lerm.fr/lerm/Newsletter/Newsletter9/lerm_Newsletter9_histoire.shtml (consulté 11/2010)

92- ADEME, L'assainissement : Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture <http://www.ademe.fr/partenaires/boues/pages/chap12.htm> (consulté 11/2010)

93- INRS, ED 820, Usines de dépollution des eaux résiduaires et ouvrages d'assainissement, 2002, *Guide pratique de ventilation n° 19*, 24 p. [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/INRS-FR/\\$FILE/fset.html](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/INRS-FR/$FILE/fset.html)

94- RAPPORT DE L'OFFICE PARLEMENTAIRE D'EVALUATION DES CHOIX SCIENTIFIQUES ET TECHNOLOGIQUES, *La qualité de l'eau et de l'assainissement en France*, mars 2003, Tome II Annexes, 293 p.

TABLE DES MATIERES

Introduction -----	12
CHAPITRE 1 : L'eau, une ressource précieuse à gérer avec attention -----	13
<u>I- L'EAU SUR TERRE</u> -----	13
I-1- L'eau sur Terre aux sources de la vie-----	13
I-2- Le cycle de l'eau sur terre : Histoire et réalité-----	14
I-2-1- Histoire d'un cycle-----	14
I-2-2- Aujourd'hui-----	16
I-3- Les ressources-----	17
I-4- L'eau et l'Homme-----	19
I-4-1- L'eau, vecteur de mort-----	19
I-4-2- L'eau, enjeu de pouvoir et enjeu économique-----	21
<u>II- DE LA DISTRIBUTION A L'EAU POTABLE</u> -----	22
II-1- Histoire de la distribution de l'eau-----	22
II-1-1- Panorama des civilisations antiques-----	23
II-1-2- Histoire de l'eau courante en France-----	25
II-1-3- Histoire des traitements de l'eau pour la consommation humaine-----	27
<u>III- L'ASSAINISSEMENT DES EAUX USEES</u> -----	30
III-1- Histoire de l'assainissement des eaux usées-----	30
III-1-1- Le temps du cloaque-----	30
III-1-2- Des égouts pour assainir les villes-----	32
III-1-3- De l'assainissement des villes à l'assainissement de l'eau-----	32
III-1-4- L'exemple de Paris-----	33
III-2- L'assainissement des eaux usées aujourd'hui-----	34
III-2-1- A quoi sert l'assainissement-----	34
III-2-2- Que sont les eaux usées-----	36
III-2-3- La collecte des eaux usées-----	37
III-2-4- Les traitements des eaux usées-----	39
III-2-5- les boues des stations d'épuration-----	49

CHAPITRE 2 : Etat des lieux de la contamination des milieux aquatiques	55
<u>I- SOURCES ET CHEMINEMENT DES POLLUANTS</u>	55
I-1- Sources des principaux polluants des milieux aquatiques	55
I-2- Cheminement des polluants dans les milieux aquatiques	56
<u>II- LES DIFFERENTS TYPES DE POLLUTION</u>	57
II-1- Les pollutions physiques	57
II-2- Les pollutions par les matières organiques	57
II-3- La pollution chimique	58
II-4- La contamination des milieux aquatiques par les médicaments	60
II-4-1- Mécanismes aboutissant à la présence de médicaments dans l'environnement	60
II-4-2- Constat de la contamination	61
II-5- La pollution microbiologique	71
II-5-1- Généralités	71
II-5-2- Caractérisation microbiologique des différentes eaux	72
<u>III- LES BACTERIES MULTIRESISTANTES DANS L'ENVIRONNEMENT</u>	73
III-1- Le point sur quelques bactéries multirésistantes	74
III-1-1- Les Entérobactéries à bêta-lactamases à spectre étendu	74
III-1-2- <i>Aeromonas</i>	82
III-1-3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
III-1-4- Entérocoques résistants aux glycopeptides	85
III-1-5- <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	86
III-2- Constat de la contamination environnementale	87
III-2-1- Effluents hospitaliers	88
III-2-2- Eaux usées urbaines – STEP- boues d'épuration	89
III-2-3- Eaux de surface et eaux souterraines	89
III-2-4- Sols et sédiments	90
III-3- Origine de la contamination	90
III-3-1- Présence naturelle dans l'environnement	90
III-3-2- Les eaux usées	92
III-3-3- L'agriculture	93
III-3-4- Le rôle des STEP	93

III-4- Conséquences-----	94
III-4-1- Le transfert vertical de résistances aux antibiotiques-----	94
III-4-2- Le transfert horizontal de gènes de résistance-----	95
III-4-3- L'exemple des entérobactéries BLSE-----	96
CHAPITRE 3 : Etude de la présence de bactéries multirésistantes dans les effluents de la ville de Toulouse-----	97
<u>I- PRESENTATION DE L'ETUDE-----</u>	<u>97</u>
<u>II-MATERIEL ET METHODE-----</u>	<u>97</u>
II-1- Points de prélèvements-----	97
II-2-1- Effluents hospitaliers-----	97
II-2-2- Effluents urbains au niveau de la STEP de Ginestous-----	98
II-2- Centrifugation des échantillons hospitaliers-----	100
II-3- Ensemencement des géloses-----	100
II-4- Dénombrement des bactéries-----	101
II-4-1- Dénombrement de la flore totale-----	101
II-4-2- Dénombrement des entérocoques fécaux-----	101
II-4-3- Dénombrement des coliformes-----	102
II-4-4- Dénombrement des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	102
II-5- Mise en évidence des bactéries multirésistantes-----	103
II-5-1- Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline-----	103
II-5-2- Recherche d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu---	104
II-5-3- Recherche d'entérocoques résistants aux glycopeptides-----	105
II-5-4- Recherche de <i>P. aeruginosa</i> résistants à l'imipénème, la ceftazidime, la ciprofloxacine et à l'amikacine-----	106
II-6- Caractérisation des Bactéries multirésistantes isolées-----	106
II-6-1- Caractérisation des SARM-----	106
II-6-2- Caractérisation des entérobactéries BLSE-----	108
II-6-3- Caractérisation des entérocoques résistants aux glycopeptides-----	110
<u>III- RESULTATS-----</u>	<u>111</u>
III-1- Dénombrement de la flore totale-----	111
III-2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	112
III-3- <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM)-----	113

III-4- Entérocoques résistants à la vancomycine-----	114
III-5- Entérobactéries productrices de BLSE-----	116
III-5-1- Entérobactéries BLSE Ranguel-----	116
III-5-2- Entérobactéries BLSE STEP Ginestous-----	118
III-5-3- <i>Aeromonas spp.</i> producteurs de BLSE-----	121
III-5-4- Recherche des gènes de virulence et de résistance chez les bactéries productrices de BLSE-----	122
IV- DISCUSSION -----	126
IV-1- Caractérisation des effluents-----	126
IV-1-1 Bactéries « sensibles »-----	126
IV-1-2- Bactéries multirésistantes-----	127
IV-2- Caractérisation des entérobactéries BLSE isolées-----	131
IV-2-1- <i>Escherichia coli</i> BLSE-----	131
IV-2-2- Les autres entérobactéries BLSE-----	133
IV-2-3- Les <i>Aeromonas</i> BLSE-----	133
IV-3- Améliorations à apporter à notre méthode-----	134
V- SYNTHÈSE -----	134
Conclusion -----	136
Bibliographie -----	137

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Le cycle de l'eau dans ses trois phases, solide, liquide, gazeuse</i> -----	16
<i>Figure 2 : L'eau de l'hydrosphère</i> -----	18
<i>Figure 3 : Les eaux douces</i> -----	18
<i>Figure 4 : Schéma de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées</i> -----	41
<i>Figure 5 : Schéma d'un décanteur lamellaire</i> -----	43
<i>Figure 6 : Schéma d'une installation à boues activées en culture libre</i> -----	45
<i>Figure 7: Schéma d'un biofiltre</i> -----	46
<i>Figure 8: Schéma d'un bioréacteur à membrane externe</i> -----	47
<i>Figure 9 : E. coli BLSE et CMI pour amc</i> -----	124

<i>Figure 10 : E. coli BLSE et CMI pour tzp</i> -----	125
<i>Figure 11 : E. coli BLSE et CMI pour ctx</i> -----	125
<i>Figure 12 : E. coli BLSE et CMI pour caz</i> -----	125

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Les stocks d'eau dans les 4 réservoirs terrestres</i> -----	17
<i>Tableau 2 : Performances épuratoires</i> -----	40
<i>Tableau 3: Performances épuratoires en zone sensible</i> -----	41
<i>Tableau 4 : Conditions de PCR pour la recherche du gène mecA et du gène codant pour la LPV</i> -----	107
<i>Tableau 5 : Conditions de PCR pour la recherche des gènes des entérotoxines, des exfoliatines et de la TSST</i> -----	108
<i>Tableau 6 : Conditions de PCR pour la recherche des gènes codant pour les enzymes de résistance SHV, OXA, CTX-M et TEM, et pour les gènes eae, stx1 et stx2</i> -----	109
<i>Tableau 7 : Conditions de PCR pour la recherche de l'entérotoxine cytolytique</i> -----	110
<i>Tableau 8 : Conditions de PCR pour la recherche de la résistance aux glycopeptides</i> -----	110
<i>Tableau 9 : Flore totale (en UFC/L)</i> -----	111
<i>Tableau 10 : Dénombrement des Pseudomonas aeruginosa (en UFC/L)</i> -----	112
<i>Tableau 11 : AntibioGramme des 3 Pseudomonas aeruginosa isolés</i> -----	113
<i>Tableau 12 : AntibioGramme du SARM isolé</i> -----	113
<i>Tableau 13 : Quantification des entérocoques (en UFC/L)</i> -----	114
<i>Tableau 14 : AntibioGramme des 6 Enterococcus faecium Van A isolés (les antibiotiques gm, k et s sont utilisés à haute concentration)</i> -----	115
<i>Tableau 15 : Quantification des coliformes totaux (en UFC/L)</i> -----	116
<i>Tableau 16 : AntibioGramme des entérobactéries BLSE isolées au niveau des effluents de Ranguel</i> -----	117
<i>Tableau 17 : AntibioGramme des entérobactéries BLSE isolées au niveau du collecteur Sud de la STEP de Ginestous</i> -----	119

<i>Tableau 18 : Antibiogramme des entérobactéries BLSE isolés au niveau du collecteur Nord de la STEP de Ginestous</i> -----	120
<i>Tableau 19 : Antibiogramme des entérobactéries BLSE isolés au niveau de la sortie de la STEP</i> -----	121
<i>Tableau 20 : Antibiogramme des Aeromonas spp. BLSE</i> -----	121
<i>Tableau 21 : Les entérobactéries BLSE isolées des différents sites de prélèvements</i> -----	122
<i>Tableau 22 : Gènes de résistance des Escherichia coli BLSE isolés</i> -----	123
<i>Tableau 23: Gènes de résistance des autres entérobactéries BLSE isolées</i> -----	124

TABLE DES IMAGES

<i>Image 1: Le chadouf Nouvel Empire (vers 1250 av JC) musée du Louvre Fresque de la tombe d'Ipouy à Deir el-Médineh</i> -----	23
<i>Image 2 : bains publiques à Mohenjo-Daro, Pakistan</i> -----	24
<i>Image 3 : Le pont du Gard</i> -----	25
<i>Image 4 : Préleveur automatique et collecteur des effluents hospitaliers du CHU de rangueil</i> -----	98
<i>Image 5 : Usine de dépollution Ginestous-Garonne</i> -----	99
<i>Image 6 : Entérocoques fécaux sur gélose Slanetz</i> -----	101
<i>Image 7 : coliformes sur gélose TTC</i> -----	102
<i>Image 8 : Pseudomonas aeruginosa sur gélose cétrimide</i> -----	102
<i>Image 9 : SARM sur gélose ChromID™ MRSA</i> -----	103
<i>Image 10 : SARM sur gélose Brilliance™ MRSA</i> -----	103
<i>Image 11 : Entérobactéries BLSE sur gélose Brilliance™ ESBL</i> -----	104
<i>Image 12 : Entérobactéries BLSE sur gélose chromID™ ESBL</i> -----	104
<i>Image 13 : Entérocoques résistants aux glycopeptides sur gélose Brilliance™ VRE</i> -----	105
<i>Image 14 : Entérocoques résistants aux glycopeptides sur gélose chromID VRE</i> -----	105
<i>image 15 : Résultats de l'ECP pour les 6 ERV vanA isolés</i> -----	115

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

