

Les antibiotiques dans l'agriculture: Quelles conséquences pour l'environnement?

Après leur application vétérinaire, les antibiotiques du groupe des sulfonamides alors contenus dans les lisiers sont épanchés sur les terres agricoles. Malgré une forte baisse initiale de leurs concentrations dans le sol, certains résidus perdurent pendant plusieurs mois dans le milieu naturel. Avec les pluies, une partie des antibiotiques emmagasinés dans le sol peut être transférée dans le milieu aquatique. De plus, les lisiers sont également vecteurs de bactéries résistantes aux antibiotiques. Il n'est cependant pas encore prouvé que l'utilisation des antibiotiques dans l'agriculture favorise l'apparition et la dissémination de ces bactéries résistantes.

Les antibiotiques ont fait leur apparition dans la première moitié du XX^e siècle, permettant enfin de combattre efficacement les maladies d'origine bactérienne. Tout d'abord employés chez l'homme, ils trouvent aujourd'hui une application très large dans l'élevage (voir l'encadré «Les antibiotiques dans l'élevage»). L'agriculture suisse est ainsi consommatrice de près de 40 tonnes d'antibiotiques par an. Leur utilisation est cependant porteuse de deux grands risques.

D'une part, les antibiotiques se retrouvent tôt ou tard dans le milieu naturel par le biais des excréments animaux, que ce soit sous forme native ou sous forme dérivée: ils sont tout d'abord déversés dans la fosse à purin ou sur le tas de fumier avant d'être répartis sur les champs par l'épandage du lisier. La quantité d'antibiotiques apportés de cette façon aux sols agricoles peut atteindre plusieurs centaines de grammes par hectare et par an. Avec les pluies, ces antibiotiques peuvent être ensuite entraînés vers le milieu

aquatique. Les connaissances sur le devenir des antibiotiques dans l'environnement sont cependant encore très éparpillées.

D'autre part, la pression de sélection exercée par les antibiotiques sur les bactéries favorise l'émergence de souches résistantes dans l'organisme des animaux traités. Les gènes de résistance formés suite à des mutations ou déjà présents dans la communauté bactérienne peuvent être transmis à d'autres souches et espèces, ce qui induit une dissémination rapide de la résistance aux antibiotiques. Si les gènes de résistance sont transmis à des bactéries pathogènes, la situation devient fatale puisque ces agents infectieux ne peuvent plus être combattus avec les antibiotiques qui leur correspondent habituellement. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) considère que le problème de la résistance aux antibiotiques présente une très grande gravité et qu'il convient de le résoudre au plus vite. On ignore encore actuellement à quelle hauteur se chiffre le risque d'émergence et de diffu-

sion de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement agricole.

Face à ces inconnues, nous nous sommes engagés dans une collaboration scientifique basée sur deux axes parallèles dans le but d'une part de caractériser le comportement des antibiotiques dans l'environnement, d'autre part de localiser et suivre les bactéries résistantes aux antibiotiques dans les sols agricoles par traçage des gènes de résistance. Nous cherchons aussi concrètement à savoir s'il existe une relation entre l'utilisation des antibiotiques dans l'agriculture et l'émergence de gènes de résistance dans l'environnement. Notre projet s'intègre dans le Programme nationale de recherche 49 du Fonds national suisse intitulé «La résistance aux antibiotiques» [1].

Des essais de terrain en conditions réelles

Notre étude était basée sur l'idée d'essais de terrain effectués dans des conditions aussi proches que possible de la pratique. Dans cet esprit, nous avons épanché du lisier

La particularité des sulfonamides

Plusieurs arguments ont motivé pour notre étude le choix d'un lisier chargé en sulfaméthazine, un antibiotique du groupe des sulfonamides:

- Les sulfonamides sont très souvent employés en médecine vétérinaire (notamment en traitement prophylactique de mise en stabulation). En médecine humaine, seul un composé actif de ce groupe est couramment utilisé (le sulfaméthoxazole).
- Les sulfonamides ne sont que faiblement métabolisés dans l'organisme animal et sont assez rapidement rejetés [2]. Fait étonnant, dans le lisier, les métabolites sont presque totalement reconvertis en leur substance active d'origine [3]. La particularité la plus importante pour notre étude est cependant la relative stabilité des sulfonamides dans l'environnement qui implique qu'ils y restent assez longtemps décelables.
- Des méthodes de dosage de la sulfaméthazine ont été développées à l'EAWAG pour l'analyse d'échantillons de lisier [4], de sol [5] et d'eau [non publié].

Les antibiotiques dans l'élevage

Les antibiotiques utilisés dans l'élevage appartiennent aux mêmes groupes de substances que ceux utilisés en médecine humaine: les pénicillines, les tétracyclines, les sulfonamides, les macrolides, les aminoglycosides et les fluoroquinolones.

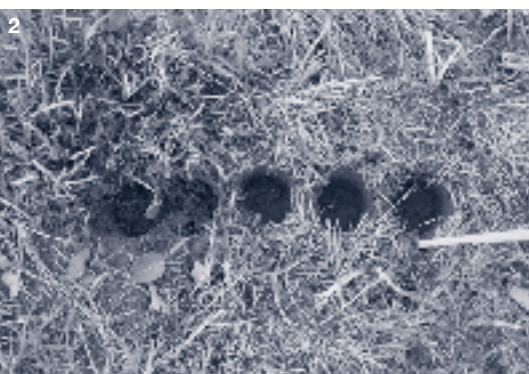
Dans le domaine vétérinaire, les antibiotiques sont employés soit pour le traitement thérapeutique d'animaux isolés, soit pour le traitement préventif de troupeaux entiers. On appelle métaglyphaxie le traitement antibiotique préventif de l'ensemble d'un troupeau suite à l'apparition d'un cas de maladie en son sein. Cette stratégie est appliquée notamment quand des diarrhées ou des affections respiratoires se manifestent chez des porcelets ou des veaux isolés. La démarche prophylactique correspond quant à elle à l'application d'un traitement avant toute manifestation pathologique. Elle est notamment appliquée lors de la mise en stabulation d'animaux d'engraissement provenant de différentes exploitations.

Resistenzgene	Herkunft
<i>sul</i> (I)	<i>Escherichia coli</i> (non pathogène)
<i>sul</i> (II)	<i>E. coli</i>
<i>sul</i> (III)	<i>E. coli</i>
<i>tet</i> (B)	<i>E. coli</i>
<i>tet</i> (C)	<i>E. coli</i>
<i>tet</i> (H)	<i>Pasteurella multocida</i> (pathogène opportuniste)
<i>tet</i> (M)	<i>Enterococcus faecalis</i> (pathogène opportuniste)
<i>tet</i> (O)	<i>Campylobacter coli</i> (pathogène)
<i>tet</i> (Q)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (non pathogène, présent dans le système gastro-intestinal humain)
<i>tet</i> (S)	<i>Listeria monocytogenes</i> (pathogène opportuniste)
<i>tet</i> (T)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (pathogène opportuniste)
<i>tet</i> (W)	<i>Butyrivibrio monocytogenes</i> (bactérie anaérobie de la panse)
<i>tet</i> (Y)	Plasmide isolé dans du lisier porcin (bactérie non identifiée)
<i>tet</i> (Z)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (bactérie du sol)

Tab. 1: Nature et provenance des gènes de résistance étudiés. Les bactéries indiquées sont celles à partir desquelles le gène a été isolé et séquencé pour la première fois. Tous les gènes ont déjà été observés dans d'autres espèces de bactéries: ainsi *tet* (B) a été mis en évidence chez 18 espèces différentes. Dans la plupart des cas, la présence d'un des gènes de résistance aux tétracyclines ou aux sulfonamides suffit pour rendre l'organisme porteur résistant à l'antibiotique correspondant. Les pathogènes opportunistes ne sont pas toujours infectieux, n'induisant des maladies que chez les personnes immunodéprimées.



Photos: EAWAG



chargé en antibiotiques sur deux parcelles de 0,35 ha chacune occupées par des prairies permanentes. Les applications ont été effectuées au début de la période de végétation, le 24 mars 2003 et après la première fauche, le 8 mai 2003. L'épandage du lisier a été effectué avec épandeur à tuyau souple (Photo 1). Ce lisier provenait d'un élevage porcin dans lequel un antibiotique du groupe des sulfonamides, la sulfaméthazine, avait été employé en traitement préventif de mise en stabulation (voir encadré «La particularité des sulfonamides»). La concentration de sulfaméthazine dans le lisier frais était de 15 mg/kg, ce qui correspond certes à une forte charge, mais aussi à une situation tout à fait réaliste [2].

Des échantillons de sol ont été prélevés à intervalles rapprochés dans les deux parcelles expérimentales sur une période de quatre mois avant et après l'épandage de lisier (Photo 2). Une station météo avait d'autre part été aménagée directement sur une des parcelles pour enregistrer directement les différents paramètres météorologiques et en particulier les précipitations (Photo 3). Etant donné que les deux prairies expérimentales se situent de part et d'autre d'un ruisseau, il a de plus été possible d'étudier le transfert des antibiotiques du sol vers le cours d'eau. Pour ce faire, nous avons installé à 500 m en aval une station de mesure permettant l'enregistrement en continu du débit et le prélèvement automatique d'échantillons d'eau (Photo 4).

A l'EAWAG, les concentrations de sulfaméthazine ont été déterminées dans les échantillons de sol, d'eau du sol et d'eau du ruis-



IRAS, Université d'Utrecht

seau (Photo 5). En parallèle, les échantillons de sol et des prélèvements de lisier ont été soumis à des analyses biomoléculaires à l'Université d'Utrecht dans le but de rechercher un total de 14 gènes de résistance aux antibiotiques (Photo 6). 11 des gènes étudiés sont des gènes de résistance aux tétracyclines, les autres sont spécifiques des sulfonamides (voir Tab. 1). La méthode utilisée enregistre le spectre des gènes de résistance présents et permet d'en détecter les modifications. Elle livre donc des résultats de type qualitatif, tout au plus semi-quantitatif.

Une contamination accrue du sol par les antibiotiques suite aux épandages de lisier

La figure 1 indique la teneur en sulfaméthazine du sol avant et après les deux épandages de lisier. Les valeurs représentées correspondent à la valeur moyenne sur l'ensemble de la parcelle aux différentes dates. Etant donné l'hétérogénéité du terrain, il faut s'attendre à observer localement des concentrations jusqu'à cinq fois supérieures à la moyenne. Avant la première application, le sol était exempt de sulfaméthazine. Après ce premier épandage de lisier, la concentration a brusquement augmenté pour rechuter



Parcelle expérimentale occupée par une prairie permanente.

ensuite. Un jour après l'épandage, la teneur dans l'eau du sol ne correspondait déjà plus qu'à 10% de la quantité extraite. Le reste de la sulfaméthazine épandue est restée fixée dans le sol ou a subi une transformation. Quelques jours après l'application, la concentration de sulfaméthazine a à nouveau amorcé une chute importante pour

rester ensuite relativement stable pendant plusieurs semaines, les concentrations n'étant pas revenues au niveau nul initial avant le deuxième épandage. La deuxième application a provoqué une nouvelle augmentation subite des teneurs en sulfaméthazine.

13 des 14 gènes de résistance mis en évidence

13 des 14 gènes de résistance recherchés ont pu être mis en évidence dans le lisier employé. Les échantillons de sol contenaient tout au plus 12 des 14 gènes (Fig. 1). Contrairement à la sulfaméthazine dont il était exempt, le sol contenait déjà des gènes de résistance aux antibiotiques avant la première application de lisier. De 8 à 11 selon la parcelle étaient clairement décelables tandis que de 1 à 4 gènes ne donnaient que de faibles signaux. Les gènes de résistance faiblement décelables étaient probablement présents en des quantités très faibles. L'intensité des gènes de résistance a augmenté après l'épandage de lisier, et respectivement 10 et 12 des 14 gènes recherchés étaient alors nettement décelables pendant plusieurs semaines (Fig. 1). Nous supposons que les gènes supplémentaires provenaient de la flore microbienne du lisier.

Les conditions météorologiques décident du devenir des antibiotiques

Fort heureusement pour notre étude, les conditions météorologiques ayant fait suite aux deux épandages de lisier ont été fondamentalement différentes. Alors que la première application a été suivie d'une semaine de temps sec sans aucune précipitation puis

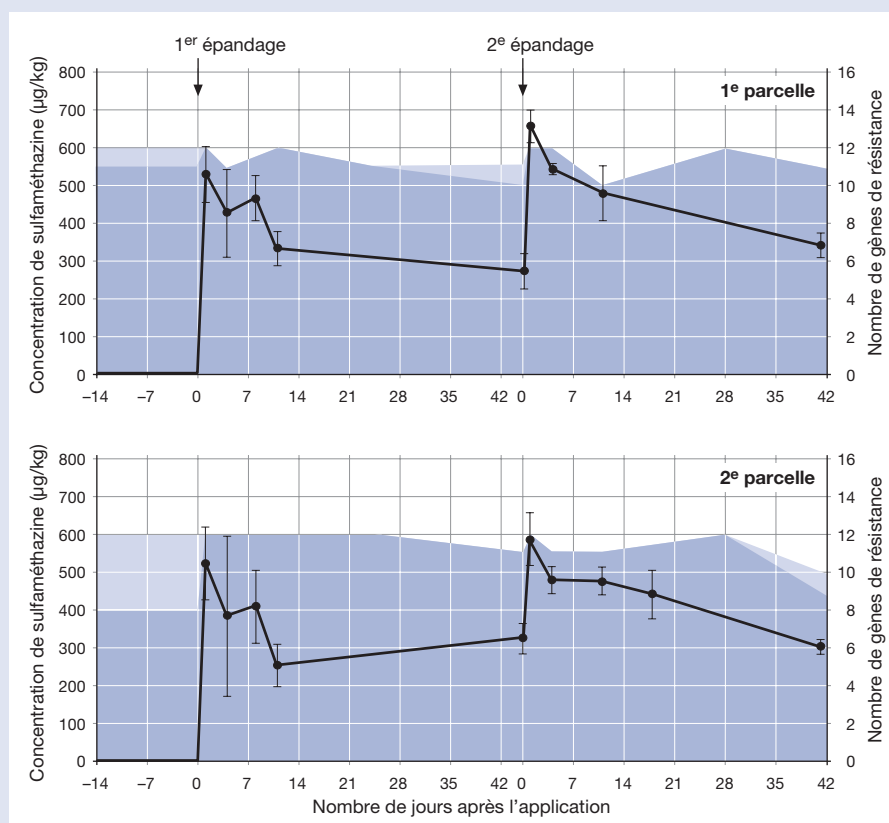


Fig. 1: Concentration de sulfaméthazine (courbe noire, moyennes plus écarts-types) et nombre de gènes de résistance (zone foncée = gènes nettement détectables, zone claire = gènes légèrement décelables) dans les échantillons de sol des deux parcelles expérimentales. Des épandages de lisier contenant de la sulfaméthazine (15 mg/kg) ont été effectués les 24 mars et 8 mai 2003.

d'un mois d'avril peu pluvieux (60% de la moyenne sur plusieurs années), la semaine qui suivit la deuxième application a été marquée par des pluies très abondantes. Cette différence a eu une grande influence sur le devenir de la sulfaméthazine dans l'environnement.

Nous avons ainsi constaté que la quantité totale de sulfaméthazine dans le sol avait moins fortement augmenté par temps humide suite au deuxième épandage de lisier que par temps sec après le premier (Fig. 1). Cette observation est également valable pour les concentrations de sulfaméthazine dans la solution du sol. Elles étaient en effet près de deux fois plus élevées par temps sec après la première application que par temps humide après la seconde (resp. 65 et 35 µg/l). Nous avons d'autre part observé une forte augmentation de la teneur en sulfaméthazine de l'eau du ruisseau qui sépare les parcelles très peu de temps après la deuxième application de lisier contaminé. La concentration maximale était de 4 µg/l (Fig. 2) et de légères augmentations de concentration ont également été observées lors des épisodes pluvieux qui ont suivi, ces pointes étant toutefois de plus en plus faibles au cours du temps. A l'opposé, la concentration en sulfaméthazine du ruisseau a été beaucoup plus faible suite au premier épandage de lisier effectué fin mars.

Des recherches sont encore nécessaires

Nos essais de terrain montrent que les antibiotiques du groupe des sulfonamides restent décelables dans le sol plusieurs mois après leur application avec le lisier. Les concentrations mesurées dans le sol dépassaient largement le seuil de 100 µg par kg de sol défini dans le cadre de la procédure d'homologation des médicaments à usage

vétérinaire. Dans le cas d'un dépassement de ce seuil, une étude d'impact détaillée doit alors être réalisée [6]. D'autres études montrent que les sulfonamides peuvent avoir une influence sur les organismes du sol: pour une concentration de 1 mg/kg, une modification de l'activité enzymatique des bactéries du sol a été observée [7] de même qu'un ralentissement de la respiration du sol [8]. Dans nos essais de terrain, cette concentration a été nettement dépassée à certains endroits suite à la grande hétérogénéité du sol. Nous avons d'autre part pu démontrer récemment qu'à partir de 10 mg/kg les bactéries du sol présentent une tolérance croissante vis-à-vis des sulfonamides [9]. Il devient donc primordial d'étudier plus en détail les effets de telles concentrations dans le milieu naturel et d'approfondir la question de la biodisponibilité des sulfonamides dans le sol.

Nos analyses ont permis de confirmer la présence de gènes de résistance aux antibiotiques aussi bien dans le sol que dans le lisier. La présence de tels gènes de résistance dans l'environnement a également été observée dans d'autres études [10, 11]. Nos travaux ne montrent cependant pas clairement si les lisiers sont vecteurs de gènes de résistance supplémentaires ou non. Pour pouvoir trancher sur cette question, une analyse quantitative serait nécessaire. Il serait d'autre part intéressant de savoir si une partie des gènes de résistance est entraînée lors d'événements pluvieux pour atteindre les cours d'eau et donc se diffuser dans l'environnement. Il importe enfin de déterminer l'impact d'une présence accrue de gènes de résistance dans l'environnement sur la manifestation de la résistance aux antibiotiques chez les agents infectieux.

Il n'est donc pas encore possible dans les conditions actuelles de procéder à une éva-

luation fondée du risque dû à l'emploi des antibiotiques dans l'élevage. Nous manquons pour cela de trop d'informations. Sur la base de nos résultats, nous ne pouvons toutefois que recommander un usage prudent et parcimonieux de ces médicaments dans l'agriculture.



Krispin Stoob, spécialiste de sciences de l'environnement, effectue actuellement une thèse de doctorat dans le groupe «Eau et agriculture» au département «Chimie environnementale» de l'EAWAG.

Coauteurs

Heike Schmitt, Institute for Risk Assessment Sciences, Université d'Utrecht et National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Pays-Bas.
Marcel Wanner, professeur à l'Institut d'alimentation animale (Institut für Tiernahrung) de l'Université de Zurich.

- [1] www.nrp49.ch
- [2] Vree T.B., Hekster Y.A. (1987): Clinical pharmacokinetics of sulfonamides and their metabolites – an encyclopedia. *Antibiotics and Chemotherapy* 37, 1–214.
- [3] Langhammer J.P. (1989): Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Dissertation, Universität Bonn, 138 S.
- [4] Haller M.Y., Müller S.R., McDardell C.S., Alder A.C., Suter M.J.F. (2002): Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952, 111–120.
- [5] Stettler S. (2004): Extrahierbarkeit und Transportverfügbarkeit von Sulfonamiden in Grünlandböden nach Gülle-Applikation. Diplomarbeit, ETH-Zürich, 61 S.
- [6] International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products (VICH). http://vich.eudra.org/pdf/2000/GI06_st7.pdf
- [7] Boleas S., Fernández C., Carbonell G., Babín M.M., Alonso C., Pro J., Tarazona J.V. (2003): Effects assessment of the antimicrobial sulfachloropyridazine. Poster an der Envirpharma, Lyon: www.envirpharma.org
- [8] Thiele S., Beck I.-C. (2001): Wirkungen pharmazeutischer Antibiotika auf die Bodenmikroflora – Bestimmung mittels ausgewählter bodenbiologischer Testverfahren. *Mitteilungen der deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 96, 383–384.
- [9] Schmitt H., van Beelen P., Tolls J., van Leeuwen C.L. (2004): Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environmental Science & Technology* 38, 1148–1153.
- [10] Séveno N.A., Kallifidas D., Smalla K., van Elsas J.D., Collard J.M., Karagouni A.D., Wellington E.M.H. (2002): Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Reviews in Medical Microbiology* 13, 15–27.
- [11] Stanton T.B., Humphrey S.B. (2003): Isolation of tetracycline-resistant *Megasphaera elsdenii* strains with novel mosaic gene combinations of *tet* (O) and *tet* (W) from swine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3874–3882.

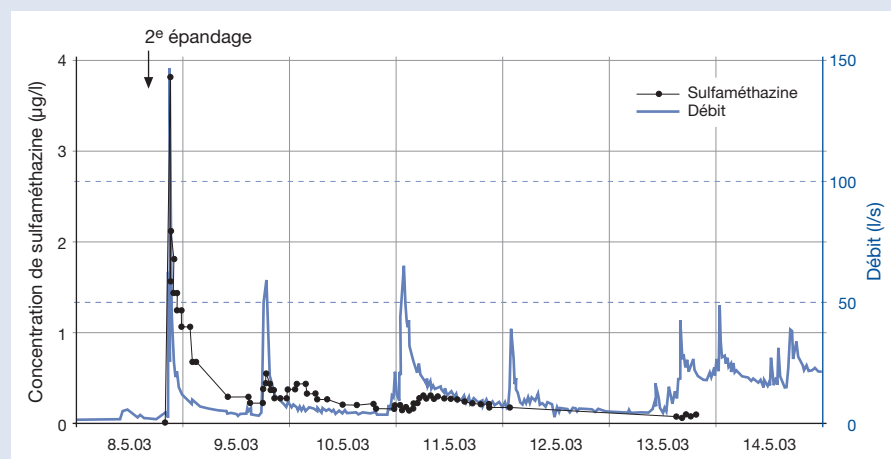


Fig. 2: Débit et concentration de sulfaméthazine du ruisseau au cours des épisodes pluvieux consécutifs au deuxième épandage de lisier effectué le 8 mai 2003.