

# **Université Paris-Sud**

Année : 1988

Série Doctorat n° 95

## **Thèse**

Présentée à l'Unité d'Enseignement et de Recherche  
d'HYGIENE et PROTECTION de l'HOMME et de son  
ENVIRONNEMENT de l'UNIVERSITÉ PARIS-SUD  
pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Nouveau doctorat, Arrêté du 5 juillet 1984)  
par

**Denis CORPET**

# **RÉSISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES DES BACTÉRIES INTESTINALES DE L'HOMME : ORIGINE NON-IATROGÈNE**

Soutenue publiquement le 28 novembre 1988, devant le jury suivant :

*Monsieur le Professeur P. BOURLIOUX, président*

*Monsieur le Professeur A. ANDREMONT, rapporteur*

*Monsieur le Professeur P. POHL (Bruxelles), rapporteur*

*Monsieur R. DUCLUZEAU*

*Monsieur J.P. LAFONT*

*et Monsieur F. RODOLPHE*

A Philippe et Laurence, d'où je viens

A Florence, où je suis

A Agnès, Pascal, Meige, Cécile, Cyrille (et Guillemette)  
Où je vais.

## REMERCIEMENTS

Monsieur P. BOURLIOUX, Professeur à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, Chef du département Microbiologie et Immunologie et Chef de service à l'hôpital Vaucluse, a accepté de présider cette thèse, dont Monsieur A. ANDREMONT, Professeur à la Faculté de Pharmacie et Assistant au service de Microbiologie Médicale de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif) a été l'amical initiateur. Monsieur R. DUCLUZEAU, Chef du Département de Nutrition à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Monsieur J.P. LAFONT, Directeur de Recherche à, la Station de Pathologie Aviaire de l'Institut National de la Recherche Agronomique (Tours), et Monsieur F. RODOLPHE, Directeur du Laboratoire de Biométrie (Jouy en Josas), ont accepté de prendre du temps pour lire<sup>1</sup> et juger ce travail. Monsieur le Professeur P. POHL, Directeur du service de Bactériologie de l'Institut National de Recherche Vétérinaire (Belgique) a de plus accepté de venir de Bruxelles.

**Qu'ils en soient ici très vivement remerciés.**

Je remercie aussi ici tous ceux qui m'ont formé ou aidé dans mes recherches:

- Georges Bories, qui m'invita à rejoindre son équipe du laboratoire des Xéno-biotiques, et qui depuis 1979 me fait confiance et m'encourage à avancer sur des chemins pourtant différents des siens, et tous les membres de ce laboratoire qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé.

- Robert Ducluzeau et Pierre Raibaud qui m'apprirent les bactéries et l'écologie, après que J.P. Laplace m'eut initié à la recherche.

- Solange Lumeau, qui a contribué efficacement à la réalisation concrète des expériences de bactériologie présentées ici.

- les stagiaires qui ont participé (manipulateurs et volontaires) aux expériences: Mireille Ambid, Martine Calmels, Marc Faget, Florence Gérard, Martine Isambart, Frédéric Legendre, Héléne Nadalin, et Christian Poggi.

- Florence Corpet, qui m'a fait comprendre la beauté et l'utilité des modèles mathématiques, et a accepté de participer comme cobaye aux expériences.

- mes maîtres de l'Institut Pasteur et de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, ainsi que Monsieur Leroy, enseignant en classe préparatoire au lycée Henri IV :

**ils m'ont émerveillé de biologie.**

<sup>1</sup> *Merci aux lecteurs de cette thèse, dactylographiée par son auteur, de leur indulgence pour les fautes de frappe, rares grâce à Philippe Corpet. La thèse originale a été "scannée" ce qui a rajouté des fautes, notamment au niveau des accents.*

## SOMMAIRE

### **Résistance aux antibiotiques des bactéries intestinales de l'Homme : origine non-iatrogène.**

	page
Introduction.	5
Chapitre I.                    UN MODÈLE COMPLEXE. Un modèle animal : la souris hétéroxénique.	13
Chapitre II.                    ADDITIFS ET FLORE DES ANIMAUX. Utilisation du modèle hétéroxénique pour l'étude de l'effet des additifs antibiotiques donnés aux animaux d'élevage.	21
Chapitre III.                    RÉSIDUS ET FLORE DE L'HOMME. Utilisation du modèle hétéroxénique pour l'étude de l'effet des résidus antibiotiques des aliments de l'homme. Validation du modèle par une étude chez des volontaires.	31
Chapitre IV.                    UN MODÈLE SIMPLE. Un modèle animal, simplifié : la souris dixénique.	45
Chapitre V.                    DOSE MINIMALE SÉLECTIONNANTE. Utilisation du modèle dixénique pour déterminer la dose minimale sélectionnante d'un antibiotique <i>in vivo</i> .	53
Chapitre VI.                    MODÈLES MATHÉMATIQUES. A.    Modèle mathématique du transfert des plasmides <i>in vivo et in vitro</i> D.    Modélisation de l'effet des antibiotiques chez les dixéniques.	65
Chapitre VII.                    BACTÉRIES RESISTANTES ET ALIMENTS Élimination des bactéries résistantes des selles par un régime stérile.	77
CONCLUSIONS : - Origine des bactéries résistantes de la flore de l'homme. - Danger des antibiotiques : additifs et thérapeutiques. - Modèles empiriques et théoriques en biologie: intérêt et limites.	83
CONCLUSION FINALE.	91
Références bibliographiques.	93
Liste des tables et figures	103
Table des matières	104

" L'amour, l'énergie, la matière et l'information sont les quatre choses qui font que ce monde tourne rond. Nous sommes en déficit dramatique d'amour, nous manquons d'énergie et nous allons bientôt manquer de certains matériaux, mais nous sommes complètement envahis par un excès d'information.

Nous, les scientifiques, devons contribuer à cet excès.  
Mais laissez-nous le faire avec amour..."

Robert A. Day [48]

Les ANTIBIOTIQUES, fabriqués par certains microbes, peuvent tuer d'autres microbes. Ces substances sont utilisées par l'homme pour lutter contre les bactéries pathogènes, et notre vision de la santé et de la mort a été profondément changée par nos victoires sur les maladies infectieuses.

Mais les bactéries s'adaptent, et l'on observe, chez certaines d'entre elles, des modifications qui les rendent résistantes à un antibiotique inhibant pourtant les autres bactéries de la même espèce. Ces résistances se transmettent au cours des divisions bactériennes (de "mère" à "fille") et, sous la pression sélectionnante d'un antibiotique, toute une population bactérienne peut devenir résistante. Certaines de ces résistances, codées par des plasmides, peuvent aussi se transmettre d'une bactérie à l'autre, même entre espèces bactériennes différentes [220]. On connaît des épidémies de plasmides, où les bactéries pathogènes ne peuvent plus être maîtrisées par les antibiotiques, laissant l'homme impuissant devant la maladie. On comprend donc la nécessité de freiner l'apparition des résistances aux antibiotiques, et de maîtriser la dispersion des plasmides codant pour ces résistances [22].

Or les antibiotiques<sup>2</sup> sont utilisés depuis près de quarante ans en alimentation animale, en raison de la propriété qu'ils ont de stimuler la croissance des animaux. Ils sont à cet effet ajoutés à très faible dose, généralement comprises entre 5 et 50 g/tonne, comme additifs aux aliments du bétail, ce qui augmente le gain de poids journalier et diminue l'indice de consommation des animaux. L'art vétérinaire est aussi utilisateur des antibiotiques comme médicaments, pour prévenir ou guérir les infections des animaux d'élevage.

<sup>1</sup> Cette introduction, ainsi que la conclusion, ont été écrites pour pouvoir être lues par toute personne cultivée.

<sup>2</sup> Cette partie a été publiée en 1988 dans un article de synthèse de la revue Médecine et Nutrition, Vol 4, tome 24.

<sup>3</sup> Le contenu de chaque chapitre correspondant à une publication, n'a pas été scanné ni inclus sur ce site internet: seule la première page de chaque chapitre est donc disponible "en ligne", ainsi que la conclusion dans son entier, puisqu'elle n'a jamais été publiée.

" Le chercheur choisit un thème qui lui parait relativement vierge et fécond. Pour mieux comprendre, il réduit son problème en sélectionnant un système modèle qui sera souvent très éloigné de toute situation pratique."

René Dubos [54]

## CHAPITRE I : UN MODÈLE COMPLEXE.

### Invention d'un modèle animal d'étude : la souris hétéroxénique.

#### INTRODUCTION

Les antibiotiques<sup>1</sup> sont utilisés à faible dose dans l'alimentation animale pour améliorer les performances zootechniques des animaux d'élevage. Mais l'un des reproches qui est fait à cette supplémentation, et qui a conduit la plupart des pays à en limiter l'emploi [237], est qu'elle risque d'augmenter la résistance aux antibiotiques des bactéries intestinales des animaux [133]. L'existence même de ce risque dans le cas de faibles doses utilisées en alimentation animale, reste cependant à démontrer [70, 168]. En effet, ni les expérimentations en étable [162], ni les enquêtes [161, 209, 228] qui ont été réalisées ne permettent d'isoler l'action de l'additif alimentaire de celle des traitements thérapeutiques [159], ou des diverses contaminations bactériennes possibles par l'éleveur, par l'aliment [96] ou par les animaux des autres lots [162],

Le seul moyen de démontrer une action de l'antibiotique utilisé comme additif, est de soustraire les animaux à leur environnement microbien, c'est à dire de les maintenir en isolateur [55]. Cela est difficile à réaliser avec les gros animaux d'élevage. C'est pourquoi nous avons pensé utiliser des souris axéniques maintenues en isolateur, chez qui nous avons implanté des flores d'autres animaux. Ce type de modèle animal, appelé hétéroxénique, a déjà été utilisé dans d'autres buts [39, 60]. Parmi les antibiotiques qui ont été utilisés en alimentation animale, les tétracyclines sont ceux qui, dans les expérimentations sur le terrain, ont entraîné le plus régulièrement une augmentation du niveau de résistance de la microflore digestive [162]. C'est pourquoi l'action de la chlortétracycline à la dose de 20 µg/ml d'eau de boisson a été testée chez des souris axéniques auxquelles on a implanté des flores complexes de nouveau-né, de veau ou de porcelet.

<sup>1</sup>Le contenu de ce chapitre a été publié en 1980 dans les Annales de Microbiologie (Institut Pasteur), Vol. 131 B, p. 309-318, sous le titre: Influence de faibles doses de chlortétracycline sur la résistance à la chlortétracycline de *Escherichia coli* dans le tube digestif de souris axéniques hébergeant des flores complexes d'enfant, de veau ou de porcelet.

## **CHAPITRE II : ADDITIFS ET FLORE DES ANIMAUX**

### **Utilisation du modèle hétéroxénique pour l'étude de l'effet des additifs antibiotiques donnés aux animaux d'élevage.**

#### INTRODUCTION

Les porcelets<sup>1</sup>, comme presque tous les animaux d'élevage, reçoivent dans leur alimentation des concentrations sub-thérapeutiques de substances à activité antimicrobienne, pour accroître la production de protéines animales.

Cet effet des antibiotiques sur la croissance s'explique par leur action sur la microflore des animaux, puisque l'on observe pas de stimulation chez les axéniques. La microflore a une influence globalement défavorable sur les performances zootechniques des monogastriques, mais il n'a pas été possible de prouver un changement important de la composition de cette microflore sous l'effet des additifs antibiotiques. On a pu par contre montrer des modifications importantes du métabolisme de la flore sous l'influence des antibiotiques [74, 109, 251]. Les principales conséquences de l'administration d'antibiotiques en faible dose aux animaux sont [31]:

- (i) une épargne de nutriments, notamment des acides aminés et des sucres simples, qui sont donc disponibles en plus grande quantité pour l'hôte.
  - (ii) une moindre production de métabolites microbiens toxiques : ammoniac, amines, sels biliaires modifiés, toxines bactériennes. Il en résulte d'une part une économie importante dans la production de la muqueuse intestinale (masse plus faible et renouvellement moins rapide), et d'autre part une meilleure cinétique d'absorption des nutriments.
- Enfin, les synthèses bactériennes de vitamines et d'acides aminés ne profitent à l'hôte monogastrique que s'il pratique la coprophagie [31].

L'utilisation des antibiotiques a été cependant restreinte, en raison de leurs effets indésirables sur la flore digestive [227, 237]: on observe souvent une augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries intestinales après l'utilisation de certains facteurs de croissance antibiotiques [132, 153, 201]. De nombreuses études ont été réalisées pour mesurer l'effet de l'administration continue de régimes antibiosupplémentés sur l'incidence des bactéries résistantes dans les selles de veaux, de porcs, de poulets et de chiens [50, 82, 85, 158, 162, 228, 254, 255], ainsi que l'effet de l'arrêt de la supplémentation [139, 140]. Cependant dans ces études, les

<sup>1</sup> Le contenu de ce chapitre a été publié dans les Annales de Micro-biologie de l'Institut Pasteur en 1984, 135 A, p.329-339, sous le titre : "Effet du carbadox, de la chlortétracycline, de la flavomycine et de l'olaquinox, sur la résistance aux antibiotiques des coliformes intestinaux".

### **CHAPITRE III : RÉSIDUS ET FLORE DE L'HOMME**

#### **Utilisation du modèle hétéroxénique pour l'étude de l'effet des résidus antibiotiques des aliments de l'homme, et Validation du modèle par une étude chez des volontaires humains..**

#### **INTRODUCTION**

Des résidus<sup>1</sup> antibiotiques sont parfois retrouvés dans le lait ou la viande, lorsque, après un traitement antibiotique préventif ou thérapeutique des animaux, l'éleveur n'observe pas le temps de retrait prescrit par la législation. D'après les enquêtes ces résidus sont en général retrouvés à des concentrations inférieures à 1 ppm [75, 76, 173], mais il est possible que, même à ces faibles concentrations, ils puissent avoir un effet sur la flore digestive de l'homme. Pour le législateur, qui doit fixer les limites tolérables pour les résidus antibiotiques, il serait utile de connaître la dose d'antibiotique sans effet sur la résistance des bactéries intestinales [141, 234].

Des expériences ont été réalisées avec des animaux pour répondre à ces questions. Lorsque l'on donne certains antibiotiques à des poulets ou à des porc, on provoque effectivement l'apparition d'une population de *E. coli* fécaux résistants. Il est cependant très difficile d'obtenir des animaux ayant au départ peu de bactéries intestinales résistantes, alors qu'ils seraient indispensables pour obtenir des résultats significatifs [168]. On ne peut travailler avec des rongeurs, car ils ont très peu de *E. coli* dans leur tractus digestif. Le chien a été utilisé comme modèle animal pour déterminer l'effet de faibles doses d'oxytétracycline sur la résistance des entérobactéries fermentant le lactose, mais aucun effet n'a été observé pour des doses inférieures à 10 pg/g d'aliment [215]. Or cette dose est supérieure à celle que peuvent apporter les résidus des aliments.

Enfin quand on donne à des volontaires humains de faibles doses d'oxytétracycline pendant de longues périodes [90, 135], on observe l'apparition sporadique d'entérobactéries résistantes chez certains des individus recevant 10 mg/jour d'antibiotique, mais les doses plus faibles n'ont eu aucun effet. Cette dose quotidienne, qui correspondrait à 50 ppm d'antibiotique dans 200 g de viande, est toujours nettement plus élevée que les concentrations trouvées habituellement dans les aliments.

<sup>1</sup> le contenu de ce chapitre a été publié en 1987, dans la revue "Antimicrobial Agents and Chemotherapy", Vol.31, No.4, p.587-593.



## CHAPITRE IV : UN MODÈLE SIMPLE

### Invention d'un modèle animal simplifié : la souris dixénique.

#### INTRODUCTION

Lebek<sup>1</sup> et Egger ont recherché dans une étude publiée en 1983 [141] la concentration minimale de tétracycline qui sélectionne un plasmide de résistance dans un modèle in vitro. Ils cherchaient à savoir si les résidus antibiotiques qui peuvent se trouver dans le lait ou la viande peuvent sélectionner des bactéries intestinales porteuse d'un plasmide de résistance. Ils ont mis simultanément en culture dans un chémostat trois clones de E. coli , dont l'un portait un plasmide de résistance, en présence de concentrations croissantes de tétracycline. Dans ce modèle simple, ils ont trouvé qu'une concentration de 0,25 µg de tétracycline par ml de milieu était suffisante pour favoriser la sélection de la souche résistante à la tétracycline.

Mais comme nous pensons que ce modèle in vitro peut ne pas refléter les conditions écologiques régnant in vivo, nous avons tenté de valider ce modèle en inoculant per os des souris axéniques avec les trois mêmes souches utilisées par Lebek et Egger. Nous étions par ailleurs intéressé de mettre au point un modèle plus simple et plus facile à reproduire à l'identique que la souris hétéroxénique, pour pouvoir étudier l'effet des antibiotiques sur les bactéries intestinales.

#### MATÉRIEL et MÉTHODES

Les souches nous ont été fournies par Monsieur le Professeur Lebek (Université de Berne, Suisse). Il s'agit de trois E. coli K-12 921 lac-, marquées sur le chromosome par une résistance soit à la streptomycine, soit à l'acide nalidixique, soit à la rifampicine. La souche résistante à la streptomycine n'hébergeait pas de plasmide de résistance, la souche résistante à l'acide nalidixique hébergeait le plasmide de résistance R270 codant pour les résistances à la tétracycline et aux sulfamides (du groupe Inc F II, réprimé), et la souche résistante à la rifampicine portait un plasmide "témoin" R- F' lac+, Inc F I dérprimé [141].

<sup>1</sup> le contenu de ce chapitre a été publié en 1987, dans la revue : "Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene", Series A, Vol. 264, p. 178-184, sous le titre: Résidus antibiotiques et sélection des plasmides de résistance : le chémostat est-il un bon modèle ?"

## CHAPITRE V : DOSE MINIMALE SÉLECTIONNANTE

### Utilisation du modèle dixénique pour déterminer

### la dose minimale sélectionnante d'un antibiotique *in vivo*

#### INTRODUCTION

Quelle est la dose sans effet <sup>1</sup> d'un antibiotique sur la proportion de bactéries fécales portant un plasmide de résistance ? Il faut répondre à cette question pour savoir si les résidus antibiotiques qui peuvent être trouvés dans la viande ou le lait, à des doses le plus souvent inférieures au µg/g d'aliment, peuvent présenter un risque pour le consommateur. Des expériences ont été effectuées, destinées à répondre à cette question, chez des volontaires humains et dans des modèles *in vitro*, mais les résultats de ces études semblent contradictoires.

Chez des volontaires, l'administration per os de 1,5 mg d'ampicilline ou de 1 mg d'oxytétracycline par jour n'a pas produit d'effet significatif sur les entérobactéries résistantes des selles [8, 32]. Quand des volontaires reçoivent de l'oxytétracycline pendant de longues périodes, on note l'apparition sporadique d'entérobactéries résistantes chez quelques individus qui reçoivent des doses de 10 mg par jour de l'antibiotique, mais les doses plus faibles n'ont pas d'effet [90]. Cependant, en raison des contaminations bactériennes des aliments, le nombre de *E. coli* résistants est éminemment variable dans les selles de l'homme, pouvant chez un même volontaire passer en quelques jours d'un niveau indétectable à un niveau où les bactéries résistantes dépassent en nombre les *E. coli* sensibles [32, 33]. La démonstration d'un petit changement du niveau de résistance dans la microflore de l'homme sous l'effet d'une dose d'antibiotique nécessiterait donc l'étude d'un très grand nombre de personnes.

Dans un chémostat qui contient la culture continue de 3 clones de *E. coli* K-12 dont l'un porte un plasmide de résistance, la dose minimale sélectionnante le plasmide de résistance est de 0,25 Kg/ml [141]. Ce modèle *in vitro* ne prend cependant pas en compte des facteurs écologiques qui interfèrent *in vivo* : les résidus antibiotique sont absorbés et dégradés *in vivo*, l'anti-biotique peut modifier la microflore anaérobie stricte dominante, et les conditions écologiques sont très loin de l'*in vitro* (absence totale d'oxygène et faible rH, transit très lent et substrats nutritionnels limitants) [34]. On a des preuves que les bactéries se multiplient beaucoup plus lentement dans l'intestin d'un animal que dans un chémostat. Le temps de doublement, qui

<sup>1</sup> le contenu de ce chapitre, regroupé avec le chapitre VI-B a été soumis à une revue pour publication, en 1988.

## CHAPITRE VI : MODÈLES MATHÉMATIQUES

### VI-A. Modélisation des facteurs écologiques influençant le transfert des plasmides *in vitro* et *in vivo*

### VI-B. Modélisation de l'effet des antibiotiques observé *in vivo* chez les dixéniques

#### INTRODUCTION

Des expérimentations<sup>1</sup> nombreuses ont été faites pour déterminer les paramètres qui influencent le transfert des plasmides [256]. Nous nous limiterons dans ce chapitre à l'étude de l'écologie de *E. coli* dans le tractus digestif et dans des cultures continues anaérobies. Une revue de la littérature permet de distinguer deux catégories d'expériences : dans certaines d'entre elles, les bactéries potentiellement donneuses et receveuses sont en dominance dans l'écosystème, alors que dans les autres expériences, ces souches qui pourraient conjuguer sont limitées en nombre par une flore bactérienne dominante.

#### **1- Bactéries potentiellement conjugantes dominant l'écosystème.**

Voici des exemples de cette catégorie d'écosystèmes : les cultures en "batch" (en milieu liquide ou sur gélose), les cultures continues (chémostats) en absence d'autres bactéries, les animaux axéniques (rongeurs, poulets, porcs) inoculés par le mélange des souches conjugantes (voir chapitres IV et V), les très jeunes animaux, les hommes ou les animaux traités par les antibiotiques [1, 46, 231], et enfin les hommes ou les animaux sujets d'une infection entérique, souvent liée à la domination d'une entérobactérie dans l'intestin. Dans toutes ces situations écologiques, le transfert des plasmides se produit avec une grande fréquence.

#### **2- Bactéries potentiellement conjugantes sous-dominantes dans l'écosystème.**

Voici quelques exemples de cette catégorie d'écosystème : des cultures continues (avec un milieu très dilué, un taux de renouvellement très grand et proche du lessivage, un temps d'incubation très bref [141], ou avec une flore complexe associée [79]), des animaux axéniques associés à des flores complexes exerçant un effet antagoniste sur les entérobactéries [2, 79], et les adultes sains, hommes ou animaux [257]. Dans ces écosystèmes, le transfert de plasmide est un événement rare. Cette faible fréquence de transfert pourrait être due à des inhibiteurs spécifiques du transfert, synthétisés par les bactéries anaérobies dominantes.

<sup>1</sup> le contenu de la première partie de ce chapitre a été publié en 1986, dans le Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol 18, Supplément C, p.127-132. Le contenu de la deuxième partie de ce chapitre, regroupé avec le chapitre 5, a été soumis pour publication.

## **CHAPITRE VII : BACTÉRIES RÉSISTANTES ET ALIMENTS**

### **Élimination des bactéries résistantes aux antibiotiques des selles de l'Homme par un régime stérile**

#### **INTRODUCTION**

Les plasmides de résistance<sup>1</sup> sont très fréquemment hébergés par les entérobactéries fécales, chez des gens loin de tout traitement antibiotique : des souches d'E. coli résistantes aux antibiotiques sont trouvées dans 75 à 93 % des échantillons fécaux d'une population urbaine normale [8, 103, 143,,171].

Chez un même personne, le nombre de E. coli résistants dans les selles varie beaucoup dans le temps : ainsi des périodes pendant lesquelles on ne peut détecter aucune bactérie résistante dans les selles, alternent avec des périodes où les bactéries résistantes dépassent en nombre les bactéries sensibles. Ces changements très importants des tailles des populations sont corrélés avec des changements de biotype, de sérotype et de type électrophorétique [21, 99, 32, 46]. L'origine de ces fluctuations dans les populations bactériennes est inconnue. Il est possible que les bactéries résistantes soient résidentes dans l'intestin, auquel cas les fluctuations observées seraient dues à des changement du milieu intestinal (nutriments, antibiotiques). Mais il est beaucoup plus probable que ces bactéries résistantes ne sont que transitoires, et sont éliminées de l'intestin par l'effet antagoniste de la flore dominante, auquel cas les pics de résistance que l'on observe seraient dus à des contaminations bactériennes venant de l'environnement, des personnes, de l'eau et des aliments.

Or une étude précise a démontré l'absence de transmission des E. coli entre personnes, malgré des contacts inter-personnels importants [145). Par contre, certains aliments contiennent des bacilles gram négatifs en grand nombre, dont certains sont résistants aux antibiotiques [146, 223]. Voilà pourquoi nous avons voulu étudier l'effet d'un régime pratiquement stérile sur l'excrétion fécale des bactéries résistantes chez des volontaires sains.

1 le contenu de ce chapitre a été partiellement publié, dans le "New England Journal of Médecine" du 5 Mai 1988, Vol 318, N°18, p.1206-1207, sous le titre : Antibiotic resistance from food. .

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

### A. Origine des bactéries résistantes de la flore de l'homme.

Nous avons étudié l'effet de très faibles doses d'antibiotiques administrées tous les jours au cours des repas à des volontaires humains (chapitre III), à des souris hétéroxéniques à flore humaine (chapitre III), et des souris dixéniques (chapitre V), maintenues en isolateur. Les résultats obtenus montrent que les concentrations d'antibiotiques qui peuvent être retrouvées comme résidus dans la viande ou le lait ne peuvent être responsables d'une augmentation importante du nombre des entérobactéries fécales résistantes aux antibiotiques, donc :

Les résidus antibiotiques des aliments  
ne sont pas à l'origine des grandes populations  
d'entérobactéries résistantes trouvées chez l'homme sain.

(Cependant, un effet sélectionnant des doses résiduelles d'antibiotique, minime mais significatif, a été observé chez un sujet, et chez les souris à flore humaine. Il convient donc de rester vigilant face à ce type de problème, en particulier pour les nouvelles molécules mises sur le marché.)

Nous avons par ailleurs comparé l'excrétion fécale de bactéries résistantes chez des volontaires mangeant une alimentation normale ou stérilisée. Les résultats montrent que la majorité des entérobactéries résistantes de l'intestin de l'homme proviennent d'un apport continu par les aliments contaminés. Si l'on compare, de façon synoptique, les résultats des tables 7 et 15, on voit qu'un résidu d'ampicilline multiplie en moyenne par 4 le nombre d'entérobactéries résistantes chez l'homme, alors qu'un régime stérile divise ce nombre par 200.

Les entérobactéries antibiorésistantes  
de l'homme sain viennent des aliments.

Enfin le danger lié à la présence de bactéries non pathogènes résistantes dans l'intestin, discuté en introduction et au chapitre VII, reste une hypothèse non démontrée formellement.

## **B. Danger des antibiotiques :**

### **Additifs, thérapeutique vétérinaire, médecine humaine.**

Nous avons montré que certains additifs utilisés dans les élevages européens ne sélectionnaient pas, ou très peu, les bactéries résistantes.

Ceci doit être nuancé par la démonstration, dans des élevages où sont utilisés beaucoup d'antibiotiques (mélanges et quantités importantes, comme au Japon), de la sélection de plasmides de résistance (au carbadox notamment, [187, 188]). Par ailleurs, dans certains pays, des antibiotiques très sélectionnants sont utilisés à des doses élevées comme additifs à l'alimentation (en particulier dans les élevages en bandes immenses ("feed-lots" des Etats-Unis) ). Il est très probable que dans ces élevages, l'administration continue de 100 g de chlortétracycline par tonne sélectionne les bactéries porteuses de plasmide, des salmonelles en particulier [121, 123, 147, 244].

Il a par contre été démontré maintes fois, et de façon irréfutable, que les traitements par des doses importantes d'antibiotiques, que ce soit à titre thérapeutique ou préventif, sélectionnaient de façon rapide, importante et durable, des bactéries porteuses de plasmide [89, 116, 1961. Le problème est particulièrement critique dans deux mondes très différents : les unités de soins intensifs des grands hôpitaux occidentaux, et les quartiers pauvres des mégapoles des pays tropicaux où tous les médicaments sont en vente libre [68, 122].

Étant donné la nature des molécules utilisées en Europe comme additifs, et les doses autorisées par la loi, il semble, d'après les travaux présentés ici, que les additifs à l'alimentation animale, et les résidus antibiotiques qui peuvent se trouver dans les produits de l'élevage, ont un effet nul ou négligeable sur le nombre global de bactéries résistantes dans l'environnement et dans les écosystèmes digestifs, à l'exception possible du carbadox [20]. Cet effet est à notre avis à celui des antibiotiques utilisés en thérapeutique animale et humaine [131, 239].

Par contre, si on ne se place plus sur le plan quantitatif mais qualitatif, l'apparition d'un nouveau plasmide de résistance, et en particulier l'addition d'un nouveau gène de résistance sur un plasmide existant, est un événement rare et irréversible qu'il convient dans la mesure du possible d'éviter. Or on ne sait pratiquement rien de la séquence d'événements qui conduisent à la construction d'un nouveau gène, et on ne connaît guère mieux les conditions réelles de passage d'un transposon d'un génome à un autre.

Il est donc prudent, et c'est ce qui se fait effectivement en France, de réserver l'usage des antibiotiques nouveaux :

- (i) à la thérapeutique, et ne pas les utiliser comme additifs,
- (ii) à la médecine humaine et pas au traitement des animaux,
- (iii) aux malades traités dans des conditions contrôlées, et dont la vie est mise en danger par une infection intraitable par d'autres moyens.

C'est ainsi que les céphalosporines de troisième génération et les fluoroquinolones sont normalement réservées à l'usage des médecins hospitaliers. Il est bien compréhensible que ces derniers, qui sont confrontés chez les grands malades aux problèmes posés par les bactéries multirésistantes, se montrent très prudents quand aux usages extra-médicaux des antibiotiques.

Mais les preuves scientifiques du danger des additifs de l'alimentation animale ou des résidus antibiotiques manquent, et nos travaux montrent que, si pression de sélection il y a, cette pression est très faible et bien difficile à mettre en évidence.

Enfin l'effet des substances antimicrobiennes naturellement présentes dans les aliments sur la microflore est inconnu. L'effet de l'oignon, des fromages fermentés ou des vins rouges sur les équilibres entre bactéries du tractus digestif pourrait être étudié dans des modèles gnotoxéniques. Les résultats obtenus permettraient peut-être de relativiser l'importance attribuée aujourd'hui aux effets néfastes des xénobiotiques.

"L'évidence n'est qu'une accoutumance"

Hume.

## C. Modèles empiriques et théoriques en biologie:

### Intérêt et limites.

#### C.1. Nous proposons des modèles gnotoxéniques

pour l'étude de l'effet des faibles doses d'antibiotiques sur la micro-flore de l'homme, et en particulier sur les populations d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques. Ces modèles sont soit hétéroxéniques, soit dixéniques (souris axéniques associées à une flore humaine, ou à deux souches d'*E. coli* identiques, l'une hébergeant un plasmide). Ces modèles présentent deux avantages majeurs par rapport aux systèmes expérimentaux conventionnels (homme ou systèmes *in vitro* récents [15,.16, 224]) :

#### *Isolés et vivants*

(1) ces systèmes sont ISOLES de l'environnement bactérien, et donc à l'abri de toute contamination. Le changement du nombre de bactéries résistantes chez les animaux traités peut donc avec certitude être attribué à l'effet du traitement.

(2) ces systèmes sont VIVANTS, et les bactéries étudiées se trouvent donc dans des conditions écologiques physiologiques, par opposition aux études *in vitro* [94].

L'effort de toute la biologie est, à notre avis, d'isoler les systèmes vivants pour en permettre l'étude, sachant qu'un organisme isolé est de ce fait moins vivant, et qu'un être vivant ne peut jamais être complètement isolé, d'où d'ailleurs l'effort des écologistes qui étudient les vivants en relation avec leur milieu. Nous voulons citer les microcosmes, systèmes vivants et clos particulièrement ingénieux, où l'on cherche à reproduire des écosystèmes naturels à l'intérieur du laboratoire [6, 202]. Nous pensons que nos modèles, qui sont aussi des microcosmes [170], peuvent être améliorés: nous pourrions en particulier tenter de compléter les systèmes dixéniques par l'introduction d'une flore anaérobie "mimant" la flore de l'homme [27, 167].



### *La souris n'est pas l'homme*

Par contre, et c'est une critique qui nous est souvent faite, la **souris n'est pas l'homme**, et quelles que soient les qualités de nos modèles gnotoxéniques, il faut toujours *in fine*

- (i) soit revenir à l'expérimentation sur l'homme quand c'est possible,
- (ii) soit proposer des extrapolations un peu hasardeuses quand l'expérience directe est dangereuse pour l'homme.

C'est également le cas pour les rongeurs utilisés en toxicologie classique et en cancérologie, et pour tous les modèles où l'animal gnotoxénique remplace l'homme, que ce soit en pathologie ou en nutrition (13, 14, 27, 91, 142, 167]. Nous persistons à penser que les modèles expérimentaux sont utiles,

- (i) dans le premier cas en permettant de choisir précisément l'expérience intéressante à réaliser avec des volontaires,
- (ii) et dans le deuxième cas en fournissant les bases rationnelles et précises pour une évaluation du risque toxicologique.

Pour confirmer l'intérêt de ces modèles empiriques, voici ce qu'écrit Bruce Levin à propos de l'évaluation du risque dans un domaine différent, qui est celui du lâchage dans la nature de bactéries manipulées génétiquement. Nous pensons que l'on peut dire la même chose en ce qui concerne l'évaluation des risques de sélection de bactéries résistantes, avec les modèles animaux gnotoxéniques. :

" On nous a dit, de source sûre, que le monde des bactéries pourrait être plus complexe que de la gélose sur des lames de verre, ou même des flacons "Erlenmeyer" et des chémostats. Si c'est le cas, mais nous n'avons pas d'information de première main que ce le soit, alors on peut vraiment se demander l'intérêt de la détermination des taux de transfert *in vitro*.

Nous avons le sentiment que des *procédures standardisées* d'estimation du taux de transfert des plasmides *sont essentielles pour l'évaluation du risque*, à condition que cette estimation soit faite dans des conditions de transfert optimales. De cette façon, cela permettra la mesure des paramètres utiles à l'estimation du risque dans le pire des cas."

Bruce Levin, 1988 [226].

## C.2. Nous avons utilisé des modèles mathématiques

pour décrire de façon quantitative et synthétique les interactions entre bactéries, et l'effet des antibiotiques dans l'intestin. Ces modèles mathématiques ont, eux aussi, leurs détracteurs, dont les principales critiques sont que ces modèles

- (i) ne servent à rien, et
- (ii) ne représentent pas la réalité.

### *Utiles ?*

Nous pensons que l'intérêt de l'approche numérique n'est évidemment pas de remplacer l'expérience, ce qui serait dangereux et illusoire. La simulation mathématique a besoin de l'expérience pour confirmer ou infirmer ses prédictions, du moins dans quelques cas tests, afin de valider la qualité de l'approximation sous-jacente au modèle mathématique. En fait, la simulation sur ordinateur ne remplace pas l'expérimentation, mais lui est complémentaire, et peut apporter beaucoup à la compréhension. C'est ainsi qu'au chapitre VI, la simulation numérique des variations de populations bactériennes nous a apporté une explication plausible d'un phénomène difficilement explicable autrement. Mais comme nous l'écrivait Rolf Freter :

"Les microbiologistes modernes sont habitués à travailler en profondeur sur des paramètres **ou des mécanismes isolés**, pour d'excellentes raisons sûrement. Néanmoins, ces habitudes de travail rendent difficile l'appréciation du fait que les systèmes complexes ont des propriétés intrinsèques, qui ne sont pas nécessairement la simple somme des parties qui les composent"

Rolf Freter, lettre du 4 Février 1987.

### *Réels ?*

D'autre part, les modèles mathématiques utilisés en physique sont devenus tellement habituels, que tous les utilisent et que personne n'a conscience que ce sont des modèles. En biologie, il en va tout autrement, et nous pensons qu'il faudra encore du temps avant que des descriptions mathématiques des phénomènes soient utilisées en pratique courante. Le seul domaine où, à notre connaissance, ces modèles sont largement utilisés en micro-biologie, est celui des fermentations industrielles. Il est clair que le tractus digestif n'est pas un fermenteur, même si les équations qui décrivent l'un s'appliquent apparemment très bien à l'autre, et nous reprenons volontiers à notre compte ce qu'écrivait Monod en 1950 :

"La simplification du problème expérimental ne doit pas créer l'illusion que les phénomènes eux-mêmes soient simplifiés. Fut-il entièrement satisfaisant, le modèle théorique d'un processus de synthèse n'est qu'une représentation partielle d'une somme de phénomènes".

Jacques Monod [180]

Tout en gardant présent à l'esprit ces limites des modèles théoriques, nous pensons que, dans la mesure où ils permettent de simuler correctement et de prédire avec précision les expériences, ils permettent à l'homme d'approcher d'une certaine façon la réalité.

### *Réalisme ?*

L'existence même de **la réalité des choses** est source de questions : les physiciens modernes travaillent aujourd'hui sur le présupposé que cette réalité puisse ne pas exister aussi simplement que le sens commun l'admet: c'est le "**réalisme voilé**". Ces scientifiques sont souvent obligés par les résultats qu'ils obtiennent d'admettre que la compréhension qu'ils ont des phénomènes est plus liée à la façon dont travaillent leurs instruments de mesure et à la façon dont fonctionne leur cerveau qu'à la réalité des phénomènes eux-mêmes. Les physiciens en viennent à penser que leurs objets d'étude n'existent peut-être pas réellement d'une façon "objective", mais ils cherchent à trouver un consensus sur les résultats observés: si toute la communauté scientifique est d'accord sur le résultat "subjectif" d'une expérience, celle-ci sera considérée comme un fait pouvant être intégré dans une théorie, elle même représentation d'une hypothétique réalité.

Les biologistes sont très loin de ces questions, et travaillent encore avec unanimité à partir du **postulat que la nature existe indépendamment de nous**, et que nos objets d'études, êtres humains, animaux, plantes, bactéries, cellules et molécules sont des réalités authentiques.

Il nous semble qu'avec les modèles mathématiques, nous pouvons nous rendre compte que la compréhension que nous avons d'un phénomène complexe dépend au moins autant de nous-mêmes que du phénomène étudié. C'est ainsi qu'un système d'équations différentielles permettra à certains d'approcher de plus près le fonctionnement du vivant, parce que leur structure mentale y est adaptée, alors que ces équations seront pour beaucoup d'autres une mascarade voilant les faits.

" La chose en soi, c'est le néant de l'esprit"

Le Senne

"Nous ne pensons pas les choses, mais les rapports entre les choses"

Auguste Comte

## CONCLUSION FINALE

" Nouveau, vrai, important et compréhensible, tel doit être tout article scientifique. " [48]

Je me suis efforcé de choisir un thème **important**, d'y faire des **choses nouvelles**, et de présenter le plus **simple**ment possible des faits **avérés**. Ces buts sont-ils atteints ?

### *Nouveau ?*

Ce que j'ai fait n'était pas tellement nouveau, puisque j'ai repris le principe des modèles gnotoxéniques utilisés au Laboratoire d'Écologie Microbienne, mais c'était encore trop original il y a 5 ans pour être accepté dans les revues internationales.

### *Compréhensible ?*

Rendre compréhensible ses découvertes est déjà difficile quand on s'adresse à ses pairs, surtout quand on les sort de leur domaine (Ah les mat-hématiques ! ). C'est encore beaucoup plus difficile si l'on veut faire comprendre à tous ce que l'on fait. Cet effort de vulgarisation, si cher au coeur de Jean Rostand, devrait pourtant faire partie du souci de chaque chercheur. C'est dans cet esprit que j'ai rédigé le début et la fin de cette thèse, mais je trouve encore, en les relisant, ces textes bien difficiles.

### *Vrai ?*

" Dites toute la vérité, rien que la vérité " demande-t-on au témoin d'un procès. Le scientifique est un tel témoin, mais n'écrire que des choses vraies est une gageure, que je n'ai pu tenir absolument. Pour donner un exemple, combien de fois dans cette thèse affirmais-je avoir répété la même expérience, et combien de fois le protocole écrit ne décrit-il en fait que la "moyenne" de plusieurs expérimentations assez proches, sans être parfaite-ment identiques ? Il s'agit souvent de "*points de détail*", mais dont l'effet est peut-être, à notre insu, important. Et sans penser que les articles scientifiques que je rédige contiennent des fraudes caractérisées [17), je ne suis pas certain que tout ce qui y est écrit soit "absolument" vrai. Il est dommage que ces inexactitudes soient si difficiles à éviter, même par les chercheurs les plus honnêtes, car comme le dit le philosophe Alain :

" La morale consiste à se savoir esprit et, à ce titre, obligé absolument, car noblesse oblige."

### *Important ?*

Enfin je me rends compte *a posteriori* que le problème des bactéries résistantes est mineur par rapport à d'autres questions scientifiques touchant la santé ou l'économie. Bien plus, si pour Le Senne, "le problème de la connaissance est un problème moral", et si le Bouddha considérait la connaissance comme une vertu, la Science a-t-elle vraiment tant d'importance qu'elle puisse être le seul but d'une vie, quand nos contemporains manquent de pain, de liberté ou de travail, d'écoute et d'amour ?