

**ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT**

---

Année 2016

**ÉTUDE DU PORTAGE D'ENTÉROBACTÉRIES  
RÉSISTANTES AUX CÉPHALOSPORINES DE  
TROISIÈME GÉNÉRATION ET AUX  
CARBAPÉNÈMES CHEZ LES CARNIVORES  
DOMESTIQUES SAINS DU CHUVA**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant  
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le 01/12/2016

par

**Marine, Nicole, Gisèle, BOISSON**

Née le 19 janvier 1991 à Paris 12<sup>ème</sup>

JURY

**Président : Pr. SOUSSY**  
**Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL**

**Membres**

**Directeur : M. BOLOUOIS**

**Professeur de bactériologie à l'ENVA**

**Assesseur : Mme ENRIQUEZ**

**Professeure de pharmacologie à l'ENVA**

**Invités :**

**Mme MEDAILLE, directrice adjointe du CHUVA,**

**M. MADEC, Directeur de recherches et chef de l'unité Antibiorésistance  
et virulence bactériennes à l'Anses de Lyon,**

**Mme HAENNI, chef d'unité adjointe à l'Anses de Lyon**



**Liste des membres du corps enseignant****Directeur : M. le Professeur Gogny Marc**

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : Cotard Jean-Pierre, Mialot Jean-Paul, Moraillon Robert, Parodi André-Laurent, Pilet Charles, Toma Bernard.  
 Professeurs émérites : Mme et MM. : Bénet Jean-Jacques, Chermette René, Combrisson Hélène, Courreau Jean-François, Député Bertrand, Niebauer Gert, Paragon Bernard, Pouchelon Jean-Louis.

**Département d'élevage et de pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)****Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane**

|  |   |
|--|---|
| <b>Unité pédagogique de cardiologie</b>                | <b>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</b> |
| - Pr Chetboul Valérie*                                 | - Dr Cléro Delphine, Maître de conférences                    |
| - Dr Gkouni Vassiliki, Praticien hospitalier           | - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences                   |
| - Dr Séchi-Tréhiou Emilie, Praticien hospitalier       | - Pr Grandjean Dominique*                                     |
| <b>Unité pédagogique de clinique équine</b>            | - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier                   |
| - Pr Audigé Fabrice                                    | - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences                 |
| - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences              | <b>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</b>           |
| - Dr Bourzac Céline, Maître de conférences contractuel | - Pr Fallolle Pascal  |
| - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier            | - Dr Mailhac Jean-Marie, Maître de conférences                |
| - Pr Denoix Jean-Marie                                 | - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences                 |
| - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier *            | - Pr Moissonnier Pierre                                       |
| - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier           | - Pr Viateau-Duval Véronique*                                 |
| - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier  | - Dr Zilberman Luca, Maître de conférences                    |
| <b>Unité pédagogique de médecine interne</b>           | <b>Discipline : ophtalmologie</b>                             |
| - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences          | - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences                    |
| - Pr Blot Stéphane*                                    | <b>Discipline : Urgences - soins intensifs</b>                |
| - Dr Campos Miguel, Maître de conférences associé      | - Dr Steblaj Barbara, Praticien Hospitalier                   |
| - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier     | <b>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</b>             |
| - Dr Maurey-Guérec Christelle, Maître de conférences   | - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier                     |
| <b>Discipline : imagerie médicale</b>                  |   |
| - Dr Stambouli Fouzia, Praticien hospitalier           |   |

**Département des Productions Animales et de la Santé Publique (DPASP)****Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara**

|  |  |
|--|--|
| <b>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</b>         | <b>Unité pédagogique de reproduction animale</b>                           |
| - Pr Augustin Jean-Christophe  | - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences*                             |
| - Dr Bolnot François, Maître de conférences *                                | - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)         |
| - Pr Carlier Vincent   | - Dr El Bay Sarah, Praticien hospitalier                                   |
| <b>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</b> | - Dr Mauffré Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel |
| - Pr Dufour Barbara*   | - Dr Ribeiro Dos Santos Natalia, Maître de conférences contractuel         |
| - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia   | <b>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</b>                    |
| - Dr Praud Anne, Maître de conférences                                       | - Dr Arné Pascal, Maître de conférences                                    |
| - Dr Rivière Julie, Maître de conférences contractuel                        | - Pr Bossé Philippe*   |
| <b>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</b>             | - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences                           |
| - Pr Adjou Karim*  | - Pr Grimard-Ballif Bénédicte  |
| - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences                                 | - Dr Leroy-Barassis Isabelle, Maître de conférences                        |
| - Pr Millemann Yves  | - Pr Ponter Andrew   |
| - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences                        | - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier                                |
| - Dr Troitsky Karine, Praticien hospitalier                                  |  |

**Département des sciences biologiques et pharmaceutiques (DSBP)****Chef du département : Pr Chateau Henry - Adjoint : Dr Pilot-Storck Fanny**

|   |  |
|---|--|
| <b>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</b>       | <b>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</b>          |
| - Pr Chateau Henry  | - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais)                                    |
| - Pr Crevier-Denoix Nathalie                                      | - Dr Desquibet Loïc, Maître de conférences (Biostatistique, Épidémiologie) *         |
| - Pr Degueur Christophe   | - Dr Fournel Christelle, Maître de conférences contractuelle (Gestion et management) |
| - Pr Robert Céline*   | <b>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</b>                   |
| <b>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</b> | - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP)                           |
| - Pr Boulouis Henri-Jean*   | - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC)                |
| - Dr Le Poder Sophie, Maître de conférences                       | - Dr Darmon Céline, Maître de conférences contractuel (rattachée au DEPEC)           |
| - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences                      | - Pr Guillot Jacques*  |
| - Pr Quintin-Colonna Françoise                                    | - Dr Polack Bruno, Maître de conférences   |
| <b>Unité pédagogique de biochimie</b>                             | - Dr Risco-Castillo Véronica, Maître de conférences                                  |
| - Pr Bellier Sylvain*   | <b>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</b>                                 |
| - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier                     | - Pr Enriquez Brigitte,  |
| - Dr Michaux Jean-Michel, Maître de conférences                   | - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences *                                       |
| <b>Discipline : éducation physique et sportive</b>                | - Pr Tissier Renaud  |
| - M. Philips Pascal, Professeur certifié                          | <b>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</b>                        |
| <b>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</b>      | - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences contractuel (Génétique)                 |
| - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences            | - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie)        |
| - Pr Fontaine Jean-Jacques*                                       | - Dr Gilbert Caroline, Maître de conférences (Ethologie)                             |
| - Dr Laloy Eve, Maître de conférences                             | - Pr Panthier Jean-Jacques, (Génétique)  |
| - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences                   | - Dr Pilot-Storck Fanny, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) *        |
|   | - Pr Tiret Laurent, (Physiologie, Pharmacologie) *                                   |

\* responsable d'unité pédagogique



# REMERCIEMENTS

**Au professeur** de la faculté de Médecine de Créteil,  
qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
Hommage respectueux.

**À M. Henri-Jean Boulouis**, professeur de bactériologie à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
pour m'avoir proposé ce travail et pour l'avoir encadrer,  
pour sa gentillesse, ses conseils et ses paroles rassurantes,  
Sincères remerciements.

**À Mme Brigitte Enriquez**, professeure de pharmacologie à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
pour avoir accepté l'assessorat de cette thèse, pour son intérêts et son efficacité,  
Sincères remerciements.

**À Mme Christine Médaille**, directrice adjointe du CHUVA, pour avoir apporter sa collaboration à  
la réalisation de ce travail, pour son soutien et sa bienveillance,  
Sincères remerciements.

**À M. Jean-Yves Madec et Mme Haenni Marisa**, respectivement directeur de recherches et chef  
de l'unité Antibiorésistance et virulence bactériennes à l'Anses de Lyon et chef d'unité adjointe,  
pour avoir participé à la réalisation de ce travail, pour m'avoir chaleureusement accueillie dans leur  
laboratoire, et pour m'avoir apporté leur aide et leur savoir,  
Sincères remerciements.

**À l'unité de microbiologie du BioPôle de l'ENVA, notamment aux techniciennes Christelle  
Gandoïn et Corinne Bouillin**, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, pour avoir participé à  
l'ensemencement des écouvillons, pour leur aide et leur gentillesse,  
Sincères remerciements.

**Au service de Médecine Préventive du CHUVA, notamment au Dr Sophie Lepoder, Dr  
Cassandre Boogaert, Dr Bénédicte Le Corre, Dr Andrea Madera, et Dr Ionut Enache**,  
pour m'avoir permis de réaliser mes prélèvements en consultation de vaccination,  
pour leur aide et leur patience,  
Sincères remerciements.

**Au Dr Jean-Marie Mailhac**, responsable des chirurgies de convenance chez les chats,  
pour m'avoir permis de réaliser mes prélèvements durant les chirurgies de convenance de chats et  
pour ses conseils,  
Sincères remerciements.

**À Mme Zouina Thirion**, responsable de l'accueil des clients au service de chirurgie,  
pour son aide et son organisation dans la gestion de mes écouvillons et mes questionnaires,  
Sincères remerciements.

**À M. Loïc Desquillet**, maître de conférences en biostatistique et épidémiologie à l'ENVA,  
et à **Mme Muriel Conan**, professeure d'anglais à l'ENVA,  
pour leur disponibilité et leurs conseils,  
Sincères remerciements.

**À tous les internes et les étudiants** qui au cours de leurs rotations ont participé à mes  
prélèvements, pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté,  
Sincères remerciements.



À mes parents, pour leur soutien tout au long de ces années. Merci d'avoir toujours été là pour moi, et de m'avoir permis de réaliser mes rêves.

À ma famille, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes, pour ces souvenirs merveilleux que vous m'avez offerts, pour tout votre amour et votre aide. Merci à Anne et Jean-Marc pour m'avoir fait découvrir le métier de vétérinaire.

À mes cousins et mes frères, qui ont grandi à mes cotés. Merci pour tout ce que nous avons partagé, pour me faire rire, pour cette complicité incomparable que nous partageons.

À mes amis qui m'ont suivi depuis le lycée, et tout particulièrement Claire. Merci de m'avoir soutenue dans les moments difficiles, merci de votre patience, et de m'avoir permis de décompresser et de déconnecter du monde vétérinaire.

À Lucie, Augustin, Adélie, Pauline et Hélène, qui ont su rendre mes deux années de prépa merveilleuses. Merci pour votre soutien, votre petite dose de folie, et surtout votre bonne humeur.

À mes ANCIENNES, Dr FABRE et Dr LABRUYÈRE, pour m'avoir intégrée dans cette grande famille Alforienne, et pour m'avoir tout appris. Vous serez toujours un modèle à suivre.

Au groupe 1, avec qui j'ai partagé tous mes débuts de clinique, Céline, Manue, Amandine, Thomas, Olivier, Julien, Charles, Laura Heitz, Laura Gaitan, Paul, Marine et particulièrement Cindy et Alice, qui m'ont également accompagné pendant toute ma 4<sup>ème</sup> année. Merci pour tous ces moments ensembles, pour les soirées formidables que l'on a passées et pour avoir été le meilleur des groupes durant l'accueil ! Merci spécialement à ma co-poulotte et co-ANCIENNE Céline. Partager ces années avec vous fut un vrai bonheur.

À mes co-A5 d'équine, auprès de qui j'ai appris énormément de chose. Merci pour cette année chargée de bons souvenirs et de soirées bien arrosées.

À Annie, ma co-ASV, ma binôme de garde. Parce que personne ne me comprend aussi bien que toi. Merci pour les soirées passées ensembles, pour m'avoir intégrée parmi tes amies et ceux de Felix, pour être toujours là pour moi, merci tout simplement d'être celle que tu es.

À toutes mes autres rencontres Alforiennes, Marie la fille toujours souriante et pleine d'énergie, Clémence, Calypso et Sarah, avec qui j'ai partagé le plus merveilleux des stages, à tous ceux que j'ai appris à connaître durant les soirées rocks, et à tous ceux avec qui j'ai travaillé au CHUVA, merci d'avoir rendu ces moments si agréable.

À Charlène et Lucie, qui resteront toujours mes poulettes. Même si je ne suis plus sur Alfort, sachez que vous pourrez toujours compter sur moi.

À mes co-internes, Valérie, Mélanie et Léa, et à toute l'équipe de Dammarie, pour m'avoir si bien accueillie, pour savoir mettre de la bonne humeur dans nos journées de boulot, et pour toutes les soirées pizzas et japonais à venir !

À Faline, qui a rempli mon enfance de ronrons, et maintenant Jinnie, qui sait si bien m'apprendre mon métier. Et au nouveau dans la famille, Halexis, qui je l'espère me portera encore longtemps pour de longues randonnées sur son dos.



# TABLE DES MATIÈRES

|  |    |
|--|----|
| TABLE DES MATIÈRES.....  | 1  |
| INDEX DES FIGURES.....   | 5  |
| INDEX DES TABLEAUX.....  | 7  |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS.....  | 9  |
| INTRODUCTION.....  | 11 |
| PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIE.....   | 13 |
| I. LES ANTIBIOTIQUES : LES BÊTALACTAMINES.....   | 13 |
| I.A. Présentation de la famille.....   | 13 |
| I.A.1. Historique.....   | 13 |
| I.A.2. Définition et mécanisme.....  | 14 |
| I.B. Classification des bétalactamines.....  | 17 |
| I.B.1. Différentes classes de bétalactamines.....                                      | 17 |
| I.B.2. Particularité des céphalosporines.....  | 18 |
| I.B.2.a. Découverte.....   | 18 |
| I.B.2.b. Structure et propriétés des différentes céphalosporines.....                  | 19 |
| I.B.3. Particularité des carbapénèmes.....   | 21 |
| I.B.3.a. Découverte.....   | 21 |
| I.B.3.b. Structure et propriétés.....  | 21 |
| I.C. Utilisation en médecine humaine et vétérinaire.....                               | 22 |
| I.C.1. Répartition des antibiotiques utilisés.....                                     | 22 |
| I.C.2. De nouvelles recommandations pour diminuer la consommation d'antibiotiques..... | 23 |
| II. RÉSISTANCE AUX BÊTALACTAMINES.....   | 26 |
| II.A. Présentation du phénomène de résistance bactérienne.....                         | 26 |
| II.A.1. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....                 | 26 |
| II.A.1.a. Notion de concentration minimale inhibitrice (CMI).....                      | 26 |
| II.A.1.b. Définition de la résistance bactérienne.....                                 | 27 |
| II.A.1.c. Résistance naturelle ou acquise.....   | 28 |
| II.A.2. Mécanisme de résistance aux bétalactamines.....                                | 30 |
| II.A.2.a. Modification des PLPs.....   | 31 |
| II.A.2.b. Incapacité de l'antibiotique à pénétrer jusqu'au site d'action.....          | 31 |
| II.A.2.c. Production de bétalactamases.....  | 31 |
| II.A.3. Classification des bétalactamases.....   | 32 |
| II.B. Des supports génétiques permettant une forte dissémination.....                  | 36 |
| II.B.1. Supports génétiques.....   | 36 |
| II.B.2. Transmission des résistances.....  | 37 |
| II.B.2.a. Transfert vertical.....  | 37 |

|  |           |
|--|-----------|
| II.B.2.b. Transfert horizontal.....  | 38        |
| II.B.3. Une dissémination de résistance possible entre l'Homme et l'animal.....                                | 40        |
| II.B.3.a. Dissémination clonale de bactérie résistante.....  | 40        |
| II.B.3.b. Dissémination de plasmides de résistance.....  | 41        |
| II.C. Surveillance épidémiologique mise en place chez l'animal.....  | 42        |
| II.C.1. Moyens mis en œuvre pour le suivi.....   | 42        |
| II.C.1.a. Objectif du suivi.....   | 42        |
| II.C.1.b. Les différents réseaux de surveillance.....  | 42        |
| II.C.2. État actuel des résistances aux céphalosporines de troisième génération.....                           | 43        |
| II.C.3. État actuel des résistances aux carbapénèmes.....  | 45        |
| III. CONCLUSION ET PROJET DE THÈSE.....  | 46        |
| <b>DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....</b>  | <b>47</b> |
| I. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....  | 47        |
| I.A. Technique de prélèvement.....   | 47        |
| I.A.1. Animaux inclus dans l'étude.....  | 47        |
| I.A.2. Mise en place du questionnaire.....   | 47        |
| I.A.3. Prélèvement des échantillons.....   | 47        |
| I.B. Détection phénotypique par milieux de culture sélectifs.....  | 48        |
| I.C. Analyse au laboratoire de l'ANSES de Lyon.....  | 50        |
| I.C.1. Antibiogramme.....  | 50        |
| I.C.2. Détection moléculaire.....  | 53        |
| I.D. Analyse statistique.....  | 54        |
| I.D.1. Étude descriptive : études de prévalences.....  | 54        |
| I.D.2. Étude analytique : recherche d'éventuels facteurs de risque.....  | 54        |
| II. RÉSULTATS.....   | 55        |
| II.A. Effectifs.....   | 55        |
| II.B. Résultats épidémiologiques.....  | 55        |
| II.B.1. Questionnaire sur les chats.....   | 55        |
| II.B.2. Questionnaire sur les chiens.....  | 58        |
| II.C. Résultats descriptifs.....   | 60        |
| II.C.1. Prévalences des résistances sur la population des chats.....   | 60        |
| II.C.2. Prévalences des résistances sur la population des chiens.....  | 61        |
| II.D. Résultats analytiques.....   | 62        |
| II.D.1. Étude exploratoire chez les chats.....   | 62        |
| II.D.2. Étude exploratoire chez les chiens.....  | 63        |
| III. DISCUSSION.....   | 64        |
| III.A. Interprétation de nos résultats.....  | 64        |
| III.A.1. Prévalences du portage d'entérobactéries résistances aux céphalosporines de troisième génération..... | 64        |
| III.A.2. Recherche de facteurs de risque.....  | 65        |
| III.B. Enzymes de résistance trouvées et approfondissement de l'étude.....                                     | 65        |
| III.C. Présence d'une carbapénémase.....   | 66        |

|                    |    |
|--------------------|----|
| CONCLUSION.....    | 67 |
| ANNEXE.....        | 69 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 73 |



# INDEX DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Développement parallèle des antibiotiques et des résistances bactériennes.....  | 14 |
| Figure 2 : Représentation du noyau bétalactame.....  | 14 |
| Figure 3 : Représentation schématique d'un peptidoglycane pariétal.....  | 15 |
| Figure 4 : Réaction de transpeptidation.....   | 16 |
| Figure 5 : Les différentes classes de bétalactamines.....  | 18 |
| Figure 6 : Structure des céphalosporines.....  | 19 |
| Figure 7 : Structure des carbapénèmes.....   | 21 |
| Figure 8 : Méthode de détermination d'une CMI par dilution.....  | 26 |
| Figure 9 : Méthode de détermination de la CMI par diffusion.....   | 27 |
| Figure 10 : Classement d'une bactérie dans la catégorie "sensible", "intermédiaire", ou "résistante" en fonction de sa CMI.....  | 28 |
| Figure 11 : Les différentes stratégies de résistance bactérienne aux bétalactamines.....   | 30 |
| Figure 12 : Évolution du nombre de bétalactamases depuis 1970.....   | 32 |
| Figure 13 : Classification d'Ambler.....   | 33 |
| Figure 14 : Fonctionnement des intégrons.....  | 37 |
| Figure 15 : Mécanisme de la transformation.....  | 38 |
| Figure 16 : Mécanisme de la transduction.....  | 39 |
| Figure 17 : Mécanisme de la conjugaison.....   | 39 |
| Figure 18 : Prévalence de la résistance aux céphalosporines de troisième génération chez <i>Escherichia coli</i> dans les différents pays d'Europe en 2014, à partir de prélèvements sanguins et de liquides céphalo-rachidiens..... | 44 |
| Figure 19 : Évolution des proportions de souches d' <i>Escherichia coli</i> non-sensibles au ceftiofur (I+R) chez les carnivores domestiques (2009-2014).....  | 44 |
| Figure 20 : Prévalence de la résistance aux carbapénèmes chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> dans les différents pays d'Europe en 2014, à partir de prélèvements sanguins et de liquides céphalo-rachidiens.....                       | 45 |
| Figure 21 : Écouvillon double COPAN.....   | 48 |
| Figure 22 : Échantillon 181 - illustration d'une croissance de <i>E.coli</i> BLSE.....   | 49 |
| Figure 23 : Illustration d'une croissance de <i>E.coli</i> KPC (à gauche) et de <i>Klebsiella OXA-48</i> (à droite).....   | 49 |
| Figure 24 : Répartition des disques sur l'antibiogramme.....   | 51 |
| Figure 25 : Profil de résistance BLSE.....   | 52 |
| Figure 26 : Profil de résistance CHN.....  | 52 |
| Figure 27 : Profil de résistance ertaR.....  | 53 |
| Figure 28 : Mise en place d'une électrophorèse.....  | 54 |
| Figure 29 : Répartition en pourcentage des autres animaux possédés par les propriétaires dans l'échantillon de chats.....  | 56 |
| Figure 30 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'infection dans l'échantillon de chats.....   | 56 |
| Figure 31 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'hospitalisation dans l'échantillon de chats.....   | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 32 : Répartition des traitements antibiotiques lors d'infection du propriétaire ou d'un personne de son entourage, dans l'échantillon de chats..... | 58 |
| Figure 33 : Répartition en pourcentage des autres animaux possédés par les propriétaires dans l'échantillon de chiens.....                                 | 58 |
| Figure 34 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'infection dans l'échantillon de chiens.....  | 59 |
| Figure 35 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'hospitalisation dans l'échantillon de chiens.....                                      | 59 |

## **INDEX DES TABLEAUX**

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1 : Classification des quatre générations de céphalosporine.....                 | 20 |
| Tableau 2 : Liste des antibiotiques critiques publiés dans l'arrêté du 18 mars 2016..... | 25 |
| Tableau 3 : Résistance naturelle des entérobactéries.....                                | 29 |
| Tableau 4 : Classification fonctionnelle et moléculaire des bétalactamases.....          | 34 |
| Tableau 5 : Résultats des prélèvements sur les chats.....                                | 60 |
| Tableau 6 : Résultats des prélèvements sur les chiens.....                               | 61 |
| Tableau 7 : Calcul des OR bruts sur les différentes expositions chez les chats.....      | 62 |
| Tableau 8 : Calcul des OR bruts sur les différentes expositions chez les chiens.....     | 63 |



# **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ACT : AmpC Type

AM : Aminopénicillines

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique

AMX : Amoxicilline

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produit de santé

ATM : Aztréonam

BES : Brazil extended spectrum

BLSE : Bétalactamases à Spectre Étendu

C1G : Céphalosporines de première génération

C2G : Céphalosporines de deuxième génération

C3G : Céphalosporines de troisième génération

C4G : Céphalosporines de quatrième génération

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CAZ : Ceftazidime

CcrA : Cefoxitin and carbapenem resistant class A

CEC : Céfaclor

CepA : Chromosomal Cephalosporinase from *Bacteroides fragilis* belonging to Ambler class A

CF : Céfalotine

CHN : Céphalosporinases de haut niveau

CHUVA : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMY : Active on CephaMYcins

COL : Colistine + Polymyxine B

CTX : Céfotaxime

CTX-M : Active on CefoTaXime, first isolated at Munich

CXM : Céfuroxime

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

EARS-Net : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control

ertaR : Résistant à l'ertapénème

ETP : Ertapénème

FEC : Fecal *E. coli*

FEP : Céf épime

FOX : Céfoxitine

FT : Nitrofuranes.

GES : Guiana-extended spectrum

GM : Gentamicine

I.C. : Intervalle de Confiance

IMP : Active on ImiPenem

InVS : Institut de Veille Sanitaire

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

MA : Céfamandole

MIR : Discovered at MIRiam Hospital

NDM : New Delhi metallo beta-lactamase

ONERBA : Observatoire National de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

OR : Odd Ratio

OXA : Active on OXAcillin

PER : Bétalactamase nommée à partir des noms des personnes l'ayant découverte, Patrice, Esthel, et Roger

PC-1 : Souche PC-1 de *Staphylococcus aureus*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIP : Pipéracilline

PLP : Protéines Liants la Pénicilline

PSE : Pseudomonas-Specific Enzyme

Résapath : Réseau de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes

SARM : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méthicilline

SFO : Bétalactamase nommée à partir de *Serratia fonticola*

SHV : SulfHydryl reagent Variable

SME : *Serratia Marcescens*Enzyme

SPF : Santé Public France

TCC : Ticarcilline + acide clavulanique

TEM : Nom du patient TEMoneira

TET : Tétracyclines y compris la tigécycline

TIAC : Toxi-Infections Alimentaires Collectives

TIC : Ticarcilline

TLA : Bétalactamase nommée à partir de Tlahuicas Indians

TPZ : Pipéracilline + tazobactam

UDP : Uridine Diphosphate

VAC : Vacuum Assisted Closure

VEB : Vietnam extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

VIM : Verona Integron-encoded Metallo-bétalactamase

XNL : Ceftiofur

# INTRODUCTION

Depuis leur découverte en 1928 par Alexander Fleming, les antibiotiques ont été massivement utilisés dans le traitement des infections bactériennes, tant humaines qu'animales. Le développement des antibiotiques a révolutionné le traitement des maladies infectieuses et leur utilisation a permis de sauver régulièrement de nombreuses personnes. Cependant, l'utilisation des antibiotiques permet un phénomène de sélection de bactéries résistantes. Cette sélection s'est trouvée amplifiée du fait des hauts niveaux de consommation, en France, en Europe et au niveau mondial. Les bétalactamines sont des antibiotiques importants à la fois quantitativement et qualitativement en médecine humaine et vétérinaire. Les bactéries ont développé plusieurs mécanismes de résistances aux bétalactamines, notamment la production d'enzyme, les bétalactamases. Au cours des années, chaque nouvelle bétalactamine a vu l'apparition de nouvelles bétalactamases rendant les bactéries résistantes. Pendant longtemps, la menace de l'antibiorésistance a été sous-estimée : les antibiotiques devenus moins efficaces étaient remplacés par de nouvelles molécules régulièrement découvertes. Mais ces découvertes se faisant rares aujourd'hui, le phénomène d'antibiorésistance a pris une importance considérable. La maîtrise de la résistance aux antibiotiques est devenue un enjeu majeur de santé publique. Les études montrent que l'antibiorésistance se développe dans le réservoir humain, animal et environnemental. La question du transfert de gène de résistance entre ces différents réservoirs est préoccupante. Le passage de bactéries résistantes entre l'Homme et animal a été mis en évidence essentiellement lors d'infection alimentaire et d'exposition professionnelle. De nouvelles études s'intéressent désormais à la partie invisible des transferts : la dissémination de la résistance par des plasmides, au travers de la flore commensale, sans être associée à un tableau clinique d'un phénomène infectieux.

Cette thèse présente en première partie une revue bibliographique sur les connaissances actuelles concernant les bétalactamines et les résistances associées. Nous présenterons tout d'abord la famille des bétalactamines, notamment les céphalosporines et les carbapénèmes, et leur utilisation en médecine humaine et vétérinaire. Puis nous exposerons leurs mécanismes de résistance, leur support génétique et leur capacité de transfert et nous étudierons la situation épidémiologique actuelle. La deuxième partie de cette thèse présente une étude effectuée au CHUVA (Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort). Cette étude a deux objectifs : un premier objectif est d'établir des prévalences du portage des résistances aux céphalosporines de troisième génération et des résistances aux carbapénèmes dans la population des chats et des chiens de la région parisienne. Ensuite, nous essayerons de mettre en évidence des facteurs de risque à l'apparition de ces résistances, en étudiant l'historique médical de l'animal, mais aussi du propriétaire dans le cadre d'un transfert Homme – animal.



# PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIE

## I. LES ANTIBIOTIQUES : LES BÊTALACTAMINES

### I.A. Présentation de la famille

#### I.A.1. Historique

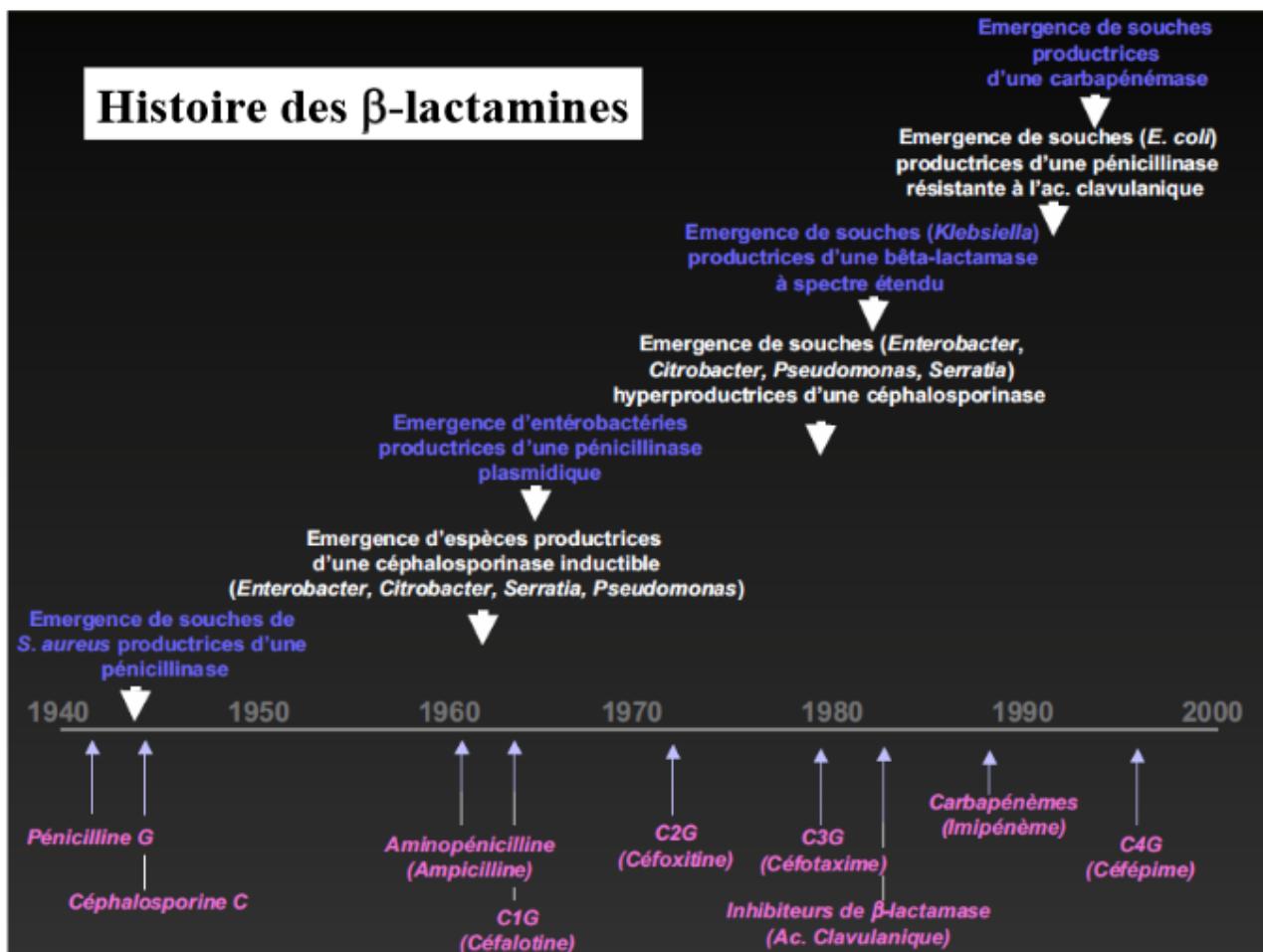
Le premier antibiotique fut découvert en 1928 par Alexander Fleming (Elhani, 2012). Il avait accidentellement laissé des boîtes de culture de staphylocoques, qui ont été recouvertes par un champignon, *Penicillium notatum*. Alexander Fleming se rend alors compte que ces staphylocoques ne se sont pas développés à certains endroits. C'est ainsi qu'il découvre la substance bactéricide produite par ce champignon et qu'il la nomme pénicilline (Dedet, 2007).

Il fallut encore attendre dix ans pour que Ernest Chain comprenne la portée de la découverte de Fleming et commence à travailler sur une utilisation thérapeutique de la pénicilline avec l'équipe d'Oxford, c'est-à-dire le chimiste Chain, le physiologiste Florey et deux biochimistes et bactériologues Edward Abraham et Norman Heatley (Elhani, 2012). La pénicilline fut le premier antibiotique de la famille des bêtalactamines. Depuis, plus de 40 pénicillines ont été identifiées. (Rivière et Papich, 2009).

En même temps que le développement des antibiotiques, le phénomène de résistance aux antibiotiques apparaît. Dès les premières utilisations cliniques de la pénicilline, l'équipe d'Oxford met en évidence des enzymes produites par *Escherichia coli* capables d'hydrolyser la pénicilline. D'abord appelées « pénicillinases », ces enzymes furent nommées bêtalactamases lorsque la structure du noyau bêtalactame fut comprise. (Abraham et Chain, 1988)

À partir de 1945, de nouvelles bêtalactamines sont découvertes : les céphalosporines. Elles furent mises en évidence à partir du champignon *Cephalosporium acremonium*. Avec l'utilisation de ces antibiotiques, plusieurs bêtalactamases sont sélectionnées et se propagent rapidement. La première bêtalactamase est étudiée dans les années 1960, il s'agit de TEM-1, capable d'hydrolyser l'ampicilline et les céphalosporines de première génération. Cette bêtalactamase a la particularité de se transmettre par un plasmide, ce qui favorise sa diffusion. De nouvelles bêtalactamines pouvant échapper à cette hydrolyse par les bêtalactamases ont été recherchées. Ainsi les céphalosporines de troisième génération ont apporté un net progrès thérapeutique en 1980. Puis se sont développés les inhibiteurs de bêtalactamases, les carbapénèmes et enfin les monobactames. Cependant, chaque nouvelle bêtalactamine a vu l'apparition de bêtalactamases rendant les bactéries résistantes. Pendant longtemps, la menace de l'antibiorésistance a été sous-estimée : les antibiotiques devenus moins efficaces étaient remplacés par de nouvelles molécules régulièrement découvertes. Mais ces découvertes se faisant rares aujourd'hui, le phénomène d'antibiorésistance a pris une importance considérable. Ce développement en parallèle de nouveaux antibiotiques et des résistances bactériennes est représenté sur la figure 1. (Comte et al., 2012 ; Elhani, 2012 ; Gootz, 1990 ; Madec, 2013)

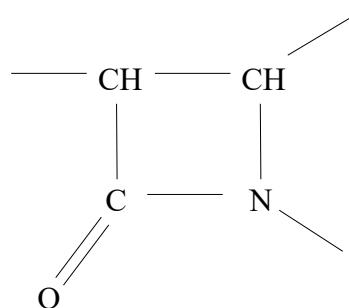
Figure 1 : Développement parallèle des antibiotiques et des résistances bactériennes (Archambaud, 2009)



### I.A.2. Définition et mécanisme

Les bêtalactamines sont des antibiotiques naturels ou semi-synthétiques caractérisés sur le plan chimique par la présence d'un noyau bêtalactame (représenté sur la figure 2) (Enriquez, 2010).

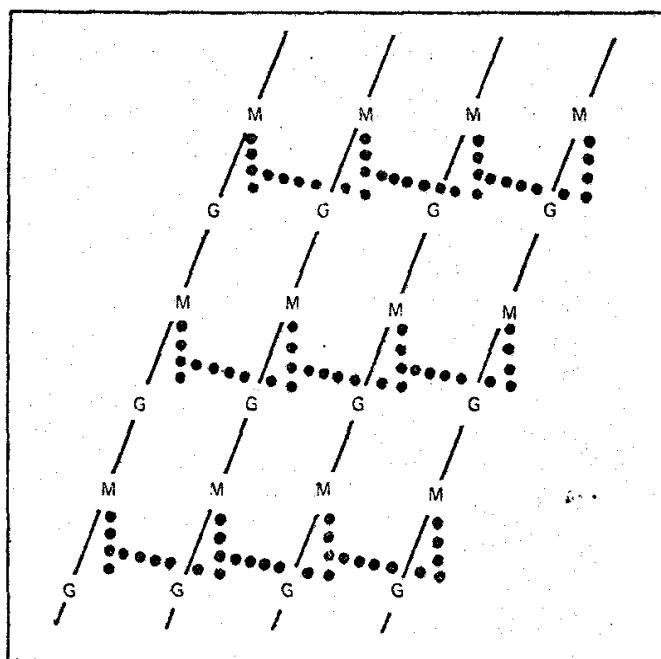
Figure 2 : Représentation du noyau bêtalactame (Enriquez, 2010)



Les bétalactamines sont des antibiotiques bactéricides. Ils empêchent la formation de la paroi bactérienne en interférant avec la réaction finale de synthèse du peptidoglycane. (Prescott, 2013a)

La paroi bactérienne est une structure vitale pour la bactérie. Elle participe au maintien de la forme de la bactérie et protège la membrane cytoplasmique des variations de la pression osmotique. Cette paroi est composé de peptidoglycane qui lui fournit sa stabilité et sa rigidité mécanique grâce à sa structure en treillis fortement entrecroisé. Ce treillis est formé de longs polymères (*N*-acétylglucosamine et acide *N*-acétylmuramique en alternance) reliés entre eux par des ponts interpeptidiques. (Mandell et Petri, 1996 ; Waxman et al., 1980)

*Figure 3 : Représentation schématique d'un peptidoglycane pariétal.*

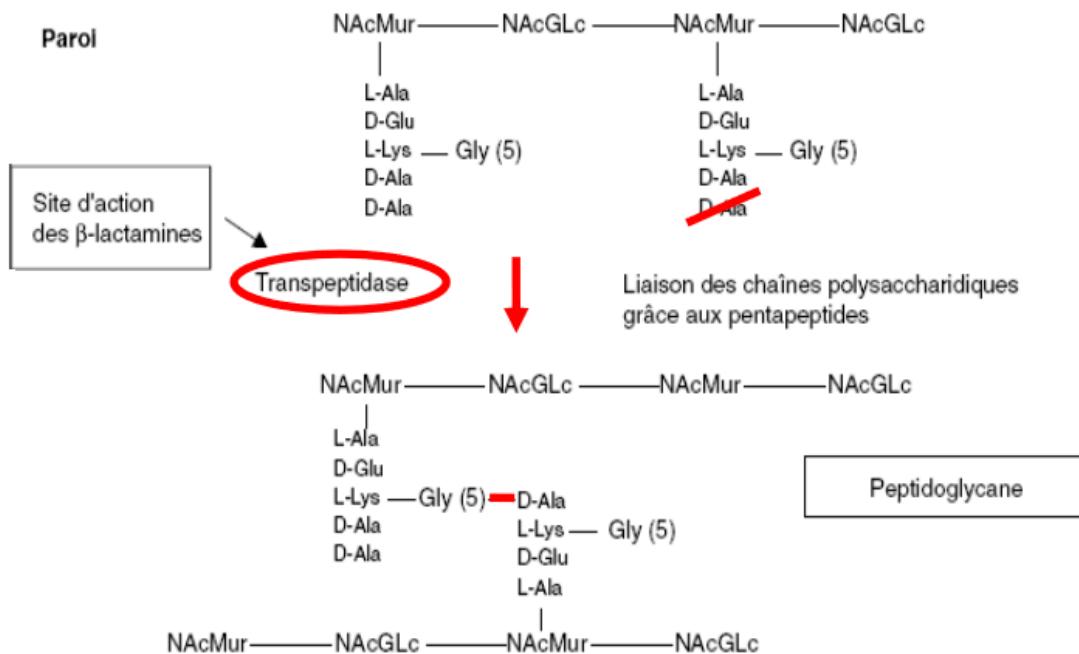


*Les chaînes de glycane sont composées de *N*-acétylglucosamine (G) et d'acide *N*-acétylmuramique (M). Les points verticaux partant de M représentent les unités tétrapéptidiques. Les points horizontaux représentent les ponts interpeptidiques. (Ghuysen, 1968)*

La biosynthèse du peptidoglycane fait intervenir environ 30 enzymes bactériennes et peut être envisagée selon plusieurs étapes. Tout d'abord il y a formation dans le cytoplasme d'un précurseur, UDP-acétylmuramyl-pentapeptide, appelé le nuclotide de Park. Ce précurseur va ensuite se lier à UDP-acétyl-glucosamine (avec libération d'uridine nucléotides) pour former le disaccharide-pentapeptide *N*-acétylglucosamine et acide *N*-acétylmuramique-pentapeptide. Il y a ensuite translocation de ce disaccharide-pentapeptide à travers la membrane bactérienne, qui va s'ajouter aux chaînes de peptidoglycane déjà existantes pour les allonger. Cette addition se fait par l'intervention d'enzymes : les transglycosylases, qui catalysent la formation de liaisons osidiques. On a alors de longues chaînes de peptidoglycane composées de *N*-acétylglucosamine (G) et d'acide *N*-acétylmuramique (M). La dernière réaction consiste à former un réseau entre ces chaînes de peptidoglycane par la création de liaison covalente : réaction de transpeptidation. Cette réaction met en jeu une transpeptidase qui agit sur une chaîne peptidique se terminant par deux molécules de D-

Alanine (voir figure 4). Les bétalactamines sont des analogues structuraux de la D-alanyl-D-alanine, elles sont donc capables de se fixer sur la transpeptidase et d'agir comme un inhibiteur compétitif, bloquant ainsi la synthèse de la paroi bactérienne. (Ghuysen, 1968 ; Mandell et Petri, 1996)

Figure 4 : Réaction de transpeptidation (Griton, 2009)



L'inhibition de la transpeptidation est une des principales voies d'action des bétalactamines, mais elles peuvent se lier à d'autres protéines, regroupées sous le terme de PLPs (Protéines Liant la Pénicilline). Toutes les bactéries ne possèdent pas le même nombre de PLPs : on sait par exemple que *Staphylococcus aureus* a quatre PLPs tandis qu'*Escherichia coli* en a au moins sept. (Mandell et Petri, 1996) Les PLPs sont désignées par ordre décroissant de poids moléculaire, les plus communes étant PLP-1, PLP-2 et PLP-3. La fixation sur PLP-1 cause la lyse de la bactérie, alors que la fixation sur PLP-2 ou PLP 3 entraîne la formation de bactéries dysmorphiques (respectivement circulaires et filamenteuses). La variation de l'activité des différentes bétalactamines est due à leur différence d'affinité pour les PLPs. Ainsi, les carbapénèmes ayant une forte affinité pour PLP-1 cause une lyse rapide. (Rivière et Papich, 2009) Cette lyse bactérienne met en jeu la propre machinerie enzymatique suicide de la bactérie : les peptidoglycane-hydrolases dites « autolysines ». L'inhibition des PLPs conduit à la rupture de l'équilibre dynamique entre la construction du peptidoglycane et son réarrangement par les autolysines. L'équilibre va se faire en faveur des autolysines et va entraîner la mort de la bactérie. (Charpentier et Novak, 2000 ; Prescott, 2013a)

Les bétalactamines agissent seulement sur les cellules en croissance, qui sont les cellules qui synthétisent activement du peptidoglycane. Elles agissent au bout d'un certain temps de latence, et leur efficacité est temps-dépendante et non pas concentration-dépendante (à l'exception des carbapénèmes qui ont une efficacité concentration-dépendante). Pour agir les bétalactamines doivent pénétrer dans l'espace périplasmique de la bactérie. Ceci est aisément chez les bactéries à Gram positif dont le peptidoglycane est perméable aux bétalactamines (qui sont hydrophiles), en revanche chez les bactéries Gram négatif les porines sont les seules voies d'entrée pour les bétalactamines. (Prescott, 2013a)

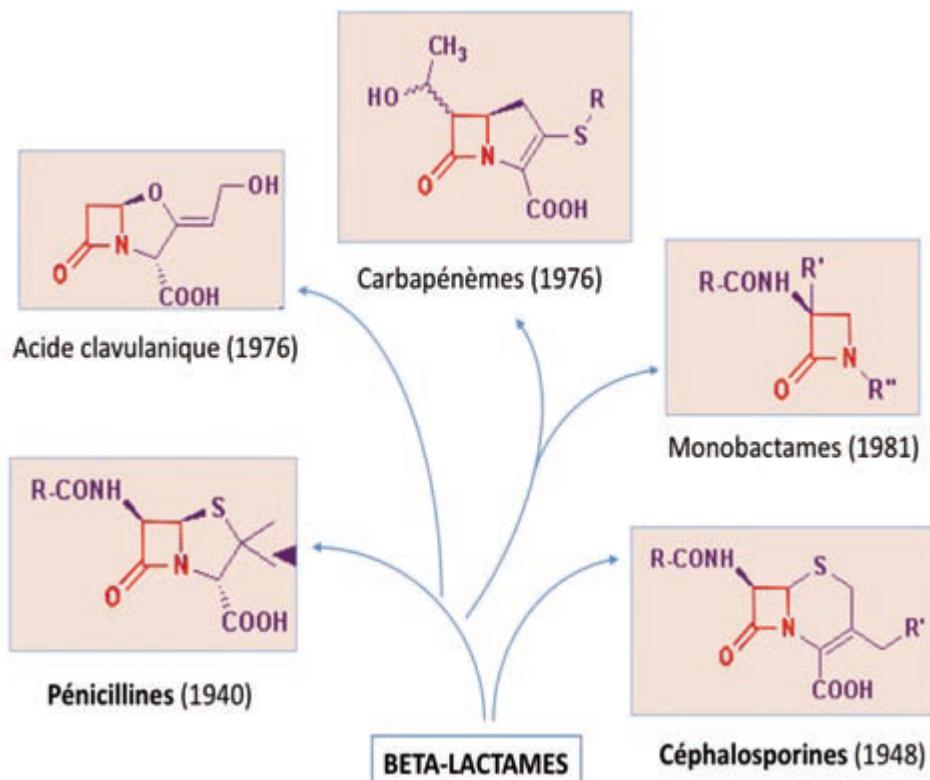
## I.B. Classification des bétalactamines

### I.B.1. Différentes classes de bétalactamines

Les bétalactamines constituent une famille d'antibiotique caractérisée par la présence d'un élément structural commun, l'azétidine-2-one ou noyau bétalactame, représenté précédemment dans la figure 2. Les bétalactamines se divisent en cinq classes selon leur structure de base : les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs des bétalactamases. Cette dernière classe a la particularité de ne pas avoir d'action anti-bactérienne propre, mais permet d'inhiber les bétalactamases et ainsi de potentialiser l'action d'une autre bétalactamine. Les inhibiteurs des bétalactamases sont donc toujours utilisés en association avec une autre molécule. Leur principal représentant est l'acide clavulanique. (Neuman, 1990)

Les structures de base des différentes classes sont représentées sur la figure 5. En dehors des monobactames, le noyau bétalactame est couplé à un autre cycle propre à chaque classe d'antibiotiques. Le noyau pénème des pénicillines est l'association du noyau bétalactame et d'un noyau thiazolidine. Le noyau céphène des céphalosporines est l'association du noyau bétalactame et d'un noyau dihydrothiazine. Enfin, les carbapénèmes ont une structure caractérisée par la présence d'une double liaison et l'absence d'atome de soufre dans le cycle. Au sein d'une classe d'antibiotiques, les chaînes latérales (R, R' et R'') permettent de distinguer les différentes molécules. (Comte et al., 2012 ; Prescott, 2013a)

Figure 5 : Les différentes classes de bétalactamines.  
(Comte et al., 2012)



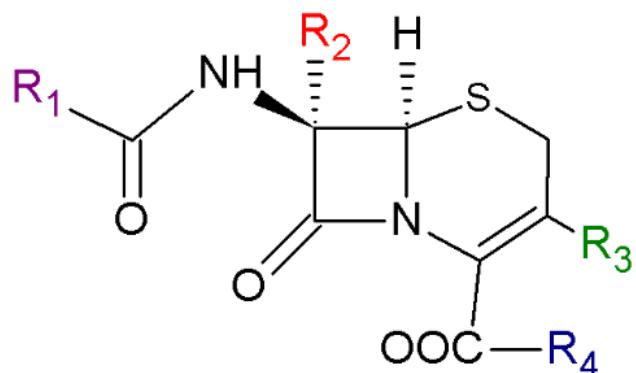
## I.B.2. Particularité des céphalosporines

### I.B.2.a. Découverte

La première source des céphalosporines, *Cephalosporium acremonium*, a été isolée par Brotzu en 1948. Les filtrats bruts de culture de ce champignon se révélèrent capables, *in vitro*, d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* et permirent d'obtenir trois antibiotiques : les céphalosporines P, N et C. En 1961, l'équipe d'Oxford réussit à analyser la structure de la céphalosporine C et à mettre en évidence le noyau actif : l'acide 7-aminocéphalosporanique. La céphalosporine C, seule céphalosporine naturelle, devint alors le point de départ de quatre générations successives de céphalosporines semi-synthétiques. Parmi les différentes classes de bétalactamines, les céphalosporines ont connu l'évolution la plus spectaculaire. (Dougherty et Pucci, 2011 ; Mandell et Petri, 1996 ; Neuman, 1990)

### I.B.2.b. Structure et propriétés des différentes céphalosporines

Figure 6 : Structure des céphalosporines (Neuman, 1990)



Les céphalosporines sont caractérisées par leur noyau céphène, association du noyau bétalactame et d'un noyau dihydrothiazine. Ce noyau de base peut rencontrer plusieurs substitutions qui vont agir sur l'activité antibactérienne et la pharmacocinétique de la molécule. La substitution en R<sub>1</sub> confère à la céphalosporine son activité anti-bactérienne et sa résistance aux bétalactamases. En R<sub>2</sub>, on trouve le plus souvent un atome d'hydrogène. Cependant les céphamycines possèdent ici une substitution 7-alpha-méthoxy responsable d'une meilleure résistance à l'hydrolyse par les bétalactamases et d'une activité sur les bactéries anaérobies. Les substitutions en R<sub>3</sub> sont surtout responsables de la pharmacocinétique de la céphalosporine. Enfin, une estérification du groupe carboxyle est possible (R<sub>4</sub>) pour donner à la molécule une meilleure biodisponibilité per-os. (Neuman, 1990)

Les céphalosporines sont classées en différentes générations. Chaque génération est caractérisée par son spectre bactérien et sa capacité de résistance aux bétalactamases. (Neuman, 1990)

Tableau 1 : Classification des quatre générations de céphalosporine  
 (Limbert et al., 1991 ; Neuman, 1990 ; Prescott, 2013c)

| Groupe                                  | Activité antibactérienne |   | Exemples   |
|---|--------------------------|---|--|
| Céphalosporines de première génération  | Gram +                   | Activité contre les Streptocoques<br>Activité contre les Staphylocoques, sauf ceux résistants à la méthicilline   | Administration parentérale : Céphacetrile, Céphaloradine, Céphalothine, Céphapirine, Céphazoline<br><br>Administration orale : Céfadroxyl, Céphradine, Céphalexine |
|   | Gram -                   | Activité modérée contre <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Pasteurella sp.</i> , <i>Actinobacillus sp.</i> et <i>Haemophilus influenzae</i>   |  |
| Céphalosporines de deuxième génération  | Gram +                   | Spectre similaire aux céphalosporines de première génération  | Administration parentérale : Céfotétan, Céfoxitine, Céfuroxime, Céfamandole  |
|   | Gram -                   | Amélioration de l'activité sur les bactéries sensibles aux céphalosporines de première génération<br>De plus, certaines sont actives contre <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Proteus sp.</i> et <i>Bacteroides fragilis</i>  |  |
| Céphalosporines de troisième génération | Gram +                   | Spectre similaire aux céphalosporines de première génération  | Administration parentérale : Cefotaxime, Ceftiofur, Ceftriaxone, Latamoxef<br><br>Administration orale : Céfixime, Cefpodoxime                                     |
|   | Gram -                   | Très bonne amélioration de l'activité sur les bactéries sensibles aux céphalosporines de première génération.<br>Présente moins de résistances dues à des bétalactamases.<br>S'ajoutent au spectre <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , et <i>Proteus sp.</i> |  |
|   |                          | Active aussi contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Administration parentérale : Cefoperazone, Cefovécin, Cefsulodin, Ceftazidime  |
| Céphalosporines de quatrième génération | Gram +                   | Très bonne activité sur toutes les bactéries Gram +, également les Staphylocoques résistants à la méthicilline  | Administration parentérale : Cefepime, Cefquinome, Cefpirome   |
|   | Gram -                   | Activité similaire aux céphalosporines de troisième génération  |  |

Les céphalosporines ont été une grande avancée car chaque nouvelle génération apportait une meilleure activité anti-bactérienne. Les céphalosporines de troisième génération ont notamment marqué un net progrès thérapeutique car elles permettaient d'échapper à la plupart des bétalactamases et ont été très utilisées dans les hôpitaux pour traiter les pathogènes multi-résistants. Cependant, leur utilisation s'est accompagné de l'émergence de nouvelles causes de résistances : les BLSE (Bétalactamases à Spectre Étendu). (Elhani, 2012)

### I.B.3. Particularité des carbapénèmes

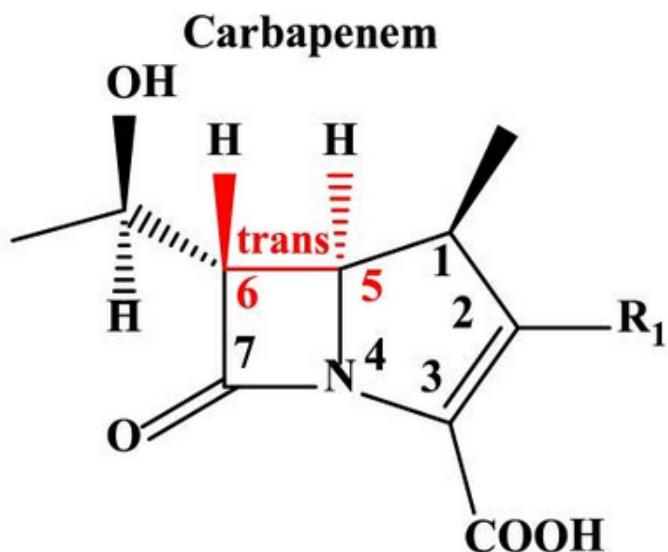
#### I.B.3.a. Découverte

Le premier carbapénème a été découverte en 1976. Il s'agit de la thiénamycine, extraite à partir de *Streptomyces cattleya*. L'instabilité chimique de ce produit a mené à de nombreuses recherches pour trouver des dérivés stables. Le premier a été le N-formimidoyl-thiénamycine, appelé imipénème, puis d'autres carbapénèmes ont été identifiés comme le panipénème, le méropénème, le biapénème, l'ertapénème et le doripénème. (Papp-Wallace et al., 2011)

#### I.B.3.b. Structure et propriétés

Les carbapénèmes sont caractérisés par une structure semblable à celle des pénicillines, avec une double liaison entre les carbones C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>, et la substitution de l'atome de soufre par un atome de carbone (C<sub>1</sub>). Cette structure est représentée sur la figure 7. Le carbone en position C<sub>1</sub> a un rôle majeur dans leur spectre d'action et dans leur stabilité envers les bétalactamases. Il a aussi été montré que le groupement hydroxyethyl en C<sub>6</sub> confère aux carbapénèmes une résistance à l'hydrolyse des bétalactamases. Enfin, la configuration trans entre C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub> dans le noyau bétalactame améliorerait encore la stabilité de la molécule vis à vis des bétalactamases. (Papp-Wallace et al., 2011)

Figure 7 : Structure des carbapénèmes (Papp-Wallace et al., 2011)



Les carbapénèmes ont un spectre d'action extrêmement large, le plus étendu parmi les bétalactamines et possèdent aussi une résistance très élevée à l'hydrolyse des bétalactamases bactériennes. C'est pourquoi ce sont des molécules précieuses, utilisées uniquement en dernier recourt et réservées au milieu hospitalier humain. Elles sont très efficaces contre la plupart des bactéries Gram positif, y compris les entérocoques et contre les bactéries anaérobies comme *Bacteroides fragilis*. Ce sont les bétalactamines les plus efficaces contre les bactéries Gram négatif. Les carbapénèmes sont notamment actifs contre les entérobactéries et résistent à la grande majorité des bétalactamases. (Prescott, 2013b)

Les carbapénèmes exercent une activité vis-à-vis de la plupart des germes Gram positif (à l'exception des staphylocoques résistants à la méthicilline) et Gram négatif, y compris les anaérobies. Ils sont également actifs sur des germes Gram négatif qui, en raison de la présence de bétalactamases à spectre étendu (BLSE) peuvent être résistants aux pénicillines et aux céphalosporines. Les carbapénèmes ne sont pas absorbés lors d'administration orale, et sont surtout utilisés par voie intraveineuse ou intramusculaire. Ils diffusent largement dans le liquide extracellulaire, atteignent des concentrations thérapeutiques dans la plupart des tissus puis sont éliminés par voie rénale. L'imipénème a la particularité de subir au niveau rénal une inactivation métabolique par des déhydropeptidases rénales. Non seulement l'antibiotique est inactivé, mais cela libère des métabolites néphrotoxiques. L'imipénème est donc systématiquement associé à un inhibiteur des déhydropeptidases, la cilastine. (Neuman, 1990 ; Prescott, 2013b)

## I.C. Utilisation en médecine humaine et vétérinaire

Le développement des antibiotiques a révolutionné le traitement des maladies infectieuses et leur utilisation a permis de sauver régulièrement de nombreuses personnes. Parmi les pays européens, la France était celui qui consommait le plus d'antibiotiques : au début des années 2000, elle comptait environ 100 millions de prescriptions par an, dont 80% en ville. En parallèle de l'utilisation des antibiotiques, un phénomène de sélection de bactéries résistantes s'est développé. Ce processus, inévitable, s'est trouvé amplifié du fait des hauts niveaux de consommation, en France, en Europe et au niveau mondial. Certaines pratiques ont participé à favoriser la diffusion de mécanismes bactériens d'antibiorésistance, comme des prescriptions non justifiées, le recours inapproprié à une automédication par les patients ou encore, l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans le domaine vétérinaire. Cette dernière pratique, beaucoup utilisée en 1975 où de l'avoparcine (famille des glycopeptides) était utilisée comme additif alimentaire, a été totalement interdite dans l'Union Européenne à partir de 1997. L'arrêt de son utilisation a été corrélé à une décroissance de la prévalence des souches résistantes à la vancomycine. Le développement du phénomène d'antibiorésistance étant préoccupant, la consommation des antibiotiques en médecine vétérinaire et humaine est surveillée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produit de santé (ANSM) depuis 1999, afin de mettre en place des mesures pour diminuer cette consommation. (Madec, 2013 ; Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, 2011)

### I.C.1. Répartition des antibiotiques utilisés

D'un point de vue quantitatif le tonnage d'antibiotique vendu est beaucoup plus important en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine. Au cours d'une étude, Moulin a montré que 1320 tonnes d'antibiotiques avaient été vendues en médecine vétérinaire durant l'année 2005, et 760 tonnes en médecine humaine. Cependant cette importante différence est due à la biomasse plus élevée des animaux comparée à celle des humains. Au cours de son étude de 1995 à 2005, Moulin a montré que la quantité d'antibiotique vendue en milligramme d'antibiotique par kilogramme traité par an était d'environ 220 mg/kg/an pour l'Homme et d'environ 80 mg/kg/an pour les animaux. Les humains recevraient donc potentiellement presque trois fois plus d'antibiotiques que les animaux. (Moulin et al., 2008) La quantité d'antibiotiques consommés ces dernières années a cependant bien

diminué, autant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. En médecine vétérinaire, le total d'antibiotiques vendu a diminué de 43 % entre 2000 et 2014, et notamment de 23 % sur les cinq dernières années. (ANSES, 2015) En médecine humaine, la consommation totale d'antibiotiques en France a diminué de 10,7% entre 2000 et 2013, avec une légère tendance à la reprise depuis 2010 (augmentation de 5,9%). (ANSM, 2014)

D'un point de vue qualitatif, les différentes familles d'antibiotiques ne sont pas également représentées en médecine humaine et vétérinaire. La famille des bétalactamines représente plus de 61,2 % de la consommation d'antibiotiques en 2013 en médecine humaine, alors qu'en médecine vétérinaire, c'est plutôt la famille des tetracyclines qui est la plus représentée (39 % du tonnage des ventes d'antibiotiques en 2014). (ANSES, 2015 ; ANSM, 2014)

Les céphalosporines de troisième et quatrième génération et les fluoroquinolones sont considérées comme des antibiotiques particulièrement importants en médecine humaine car elles constituent l'alternative ou une des seules alternatives pour le traitement de certaines maladies infectieuses chez l'homme. Ces deux classes de molécules sont disponibles en médecine vétérinaire depuis une quinzaine d'année, mais ce sont des molécules qui doivent être réservées au traitement curatif en deuxième intention. Pour les céphalosporines de troisième et quatrième génération, quatre principes actifs sont disponibles aujourd'hui en médecine vétérinaire : céfovécine, céfopérazone, cefquinome et ceftiofur. Les tonnages utilisés en médecine vétérinaire sont faibles (0,1 % du tonnage de matière active vendu en 1999 et 0,3 % du tonnage vendu en 2014), mais une expression des ventes en poids vif traité révèle une utilisation non négligeable de cette famille (1,4 % du poids vif traité en 1999 et 2,8 % du poids vif traité en 2014). Les céphalosporines ont été particulièrement utilisées dans le domaine de la lutte contre les mammites avec l'utilisation de pommade intramammaire comme le Pathozone® (Céfopérazone) et le Cobactan® (Cefquinome). Toutes espèces confondues, on constate une stabilisation de l'exposition entre 2010 et 2012 et une diminution importante depuis 2012 (moins 20,8 % entre 2012 et 2014). (ANSES, 2015)

La résistance aux antibiotiques est un danger pour la santé publique. Afin de conserver un arsenal thérapeutique efficace en médecine humaine, certains antibiotiques sont interdits en médecine vétérinaire. Cette réserve d'antibiotique a été renforcée depuis le premier avril 2016, plus de 50 substances antibiotiques sont à présent interdites ou leur utilisation restreinte. C'est le cas par exemple des carbapénèmes, des monobactames, des carboxypénicillines, des uréidopénicillines, des kétolides et des glycopeptides. (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2016a ; Moulin et al., 2008)

### **I.C.2. De nouvelles recommandations pour diminuer la consommation d'antibiotiques**

La question de l'utilisation massive des antibiotiques et de ses conséquences s'est posée dès le début des années 2000. La Recommandation 2002/77/CE du Conseil de l'Union européenne relative à l'utilisation prudente des agents antimicrobiens en médecine humaine a été adoptée en novembre 2001. Cette démarche s'est notamment traduite en France par l'élaboration et la mise en œuvre du plan d'action pluriannuel 2001-2005, prolongé et complété par le plan 2007-2010. Tous les deux avaient pour objectifs de maîtriser et de rationaliser la prescription des antibiotiques pour en préserver l'efficacité.

Dans la continuité de ces deux plans nationaux, le plan national d'alerte sur les antibiotiques 2011-2016 a pour objectif de lutter contre le développement des résistances aux antibiotiques et contre le nombre croissant de situations d'impasse thérapeutique rencontrées.

Dans cette perspective, ce troisième plan vise à mobiliser l'ensemble des acteurs impliqués dans le cycle de vie des antibiotiques : la population, les patients et leurs proches, les prescripteurs de ville, l'ensemble des acteurs de soins, les établissements de santé et médico-sociaux, les organismes chargés de définir les programmes de formation des professionnels de santé, les chercheurs, les laboratoires pharmaceutiques, les experts, les agences régionales de santé, les institutions, etc. Préconisé par les experts, un objectif de réduction de 25 % de la consommation d'antibiotiques est envisagé sur cinq ans. L'atteinte de cet objectif doit résulter de la mise en œuvre d'une stratégie de juste utilisation des antibiotiques, basée sur trois axes : améliorer l'efficacité de la prise en charge des patients, préserver l'efficacité des antibiotiques et promouvoir la recherche. (Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, 2011)

Des mesures ont aussi été prises concernant spécifiquement les vétérinaires. La Direction générale de l'alimentation (DGAL) a mis en place le 18 novembre 2011 le plan Ecoantibio. L'objectif du plan d'action est double. Il vise d'une part à diminuer la contribution des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire à la résistance bactérienne, et d'autre part à préserver sur le long terme les moyens thérapeutiques, d'autant plus que la perspective de développement de nouveaux antibiotiques est réduite en médecine vétérinaire. L'objectif chiffré défini en 2011 est la réduction de 25% de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire en 5 ans, en développant les alternatives permettant de préserver la santé animale tout en évitant de recourir à certaines molécules. Mais au-delà de l'aspect quantitatif, une prise de conscience est nécessaire pour que chacun évolue de manière coordonnée dans ses pratiques. Les 40 mesures du plan d'action déclinent en cinq axes : (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2012)

- ➔ Axe 1 : Promouvoir les bonnes pratiques et sensibiliser les acteurs aux risques liés à l'antibiorésistance et à la nécessité de préserver l'efficacité des antibiotiques, par des actions de formation notamment.
- ➔ Axe 2 : Développer les alternatives permettant d'éviter les recours aux antibiotiques en favorisant notamment les mesures d'hygiène et de biosécurité et le recours à la vaccination en élevage et pour les animaux de compagnie.
- ➔ Axe 3 : Renforcer l'encadrement des pratiques commerciales et des règles de prescription, et réduire les pratiques à risque, en faisant évoluer les réglementations nationale et européenne.
- ➔ Axe 4 : Conforter le dispositif de suivi de la consommation des antibiotiques et de l'antibiorésistance.
- ➔ Axe 5 : Promouvoir les approches européennes et les initiatives internationales car le problème de l'antibiorésistance ne connaît pas de frontières.

Dans le but de diminuer l'usage des antibiotiques critiques en médecine vétérinaire, le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt a publié un décret le 16 mars 2016 encadrant la prescription et la délivrance des médicaments contenant un ou plusieurs antibiotiques critiques avec une entrée en vigueur le 1<sup>er</sup> avril 2016. En complément, un arrêté fixant la liste des antibiotiques critiques a été publié le 18 mars 2016 (voir tableau 2).

*Tableau 2 : Liste des antibiotiques critiques publiés dans l'arrêté du 18 mars 2016*

(Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2016a)

| FAMILLE D'APPARTENANCE DE LA SUBSTANCE  | NOM DE LA SUBSTANCE | NOM DE SPÉCIALITÉ VÉTÉRINAIRE   |
|---|---------------------|---|
| Céphalosporines de troisième génération | Céfopérazone        | Pathozone® (intra-mammaire, bovin)  |
|   | Ceftiofur           | Naxcel® (suspension injectable, bovin)<br>Excenel® (suspension injectable, bovin)   |
|   | Céfovécine          | Convenia® (solution injectable, chat)   |
| Céphalosporines de quatrième génération | Cefquinome          | Cobactan® (intra-mammaire ou suspension injectable, bovin)<br>Virbactan® (pommade intra-mammaire, bovin)  |
| Fluoroquinolones                        | Danofloxacine       | A180® (solution injectable, bovin)<br>Advocine® (solution injectable, bovin)  |
|   | Enrofloxacine       | Baytril® (solution injectable ou solution buvable)  |
|   | Marbofloxacine      | Marbocyl® (solution injectable ou comprimé)<br>Forcyl® (solution injectable, bovin)<br>Aurizon® (suspension pour instillation auriculaire, chien) |
|   | Orbifloxacine       | Posatex® (suspension pour instillation auriculaire, chien)  |
|   | Pradofloxacine      | Veraflox® (comprimé ou solution buvable, chien et chat)   |

Selon cette nouvelle réglementation, ces molécules sont interdites en traitement préventif. Avant de pouvoir utiliser un antibiotique critique, le vétérinaire doit désormais réaliser des prélèvements pour analyse microbiologique avec antibiogramme, sous réserve que la localisation de l'infection, le type d'infection ou l'état général du ou des animaux permettent le prélèvement d'échantillon. L'antibiotique critique ne pourra être prescrit que si l'antibiogramme montre que la souche bactérienne est sensible à cet antibiotique critique, et résistante à tout autre antibiotique non-critique. Une dérogation existe : le vétérinaire peut prescrire un médicament contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique avant connaissance des résultats des examens complémentaires lorsqu'il s'agit d'un cas aigu d'infection bactérienne pour laquelle un traitement avec d'autres familles d'antibiotiques serait insuffisamment efficace. Dans un délai de quatre jours après la prescription, le vétérinaire adapte le traitement en fonction de l'évolution du contexte clinique et épidémiologique et des résultats des examens complémentaires portés à sa connaissance. En élevage, un traitement métaphylactique est possible avec un antibiotique critique si le vétérinaire suspecte une maladie présentant un taux élevé de mortalité ou de morbidité pour laquelle, en l'absence de traitement précoce, une propagation rapide à l'ensemble des animaux est inévitable. Le vétérinaire doit justifier ce traitement par un examen clinique ou nécropsique, et le traitement prescrit ne peut pas excéder un mois. (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2016a, 2016b)

## II. RÉSISTANCE AUX BÊTALACTAMINES

### II.A. Présentation du phénomène de résistance bactérienne

#### II.A.1. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques

##### II.A.1.a. Notion de concentration minimale inhibitrice (CMI)

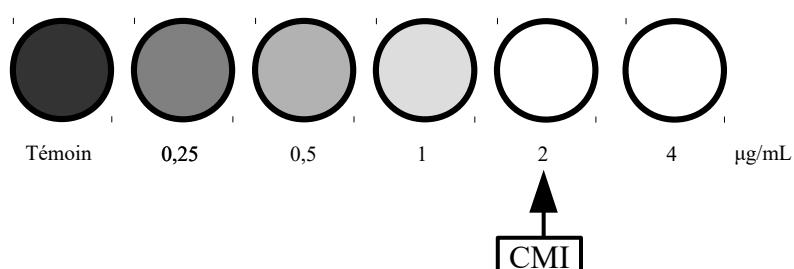
La définition de la notion d'antibiorésistance nécessite au préalable d'expliquer ce qu'est la Concentration Minimale Inhibitrice. Afin de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique, la souche bactérienne considérée est mise en présence d'un gradient de concentration de l'antibiotique en milieu de culture. Aux plus faibles concentrations, la croissance bactérienne est quasi normale alors qu'elle est progressivement inhibée par des concentrations plus élevées. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est alors la première concentration inhibant visuellement la croissance bactérienne. (Enriquez, 2010)

La CMI peut être déterminée par différentes méthodes : (Enriquez, 2010 ; Rubin, 2013)

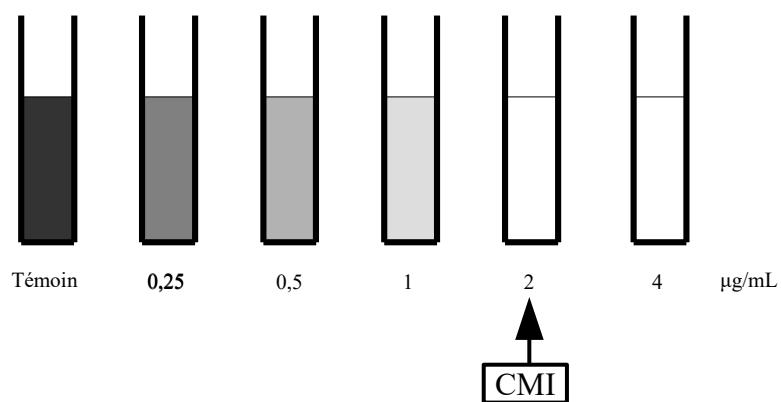
- méthodes par dilution, illustrées en figure 8 : une série de dilutions d'un antibiotique donné est réalisée, soit en milieu liquide, soit en milieu gélosé, avec une quantité connue de la bactérie à étudier. Après incubation, la CMI correspond au premier tube, ou à la première gélose, dans lequel aucune croissance bactérienne n'est visible.

Figure 8 : Méthode de détermination d'une CMI par dilution (Enriquez, 2010)

Calcul d'une CMI en milieu gélosé :

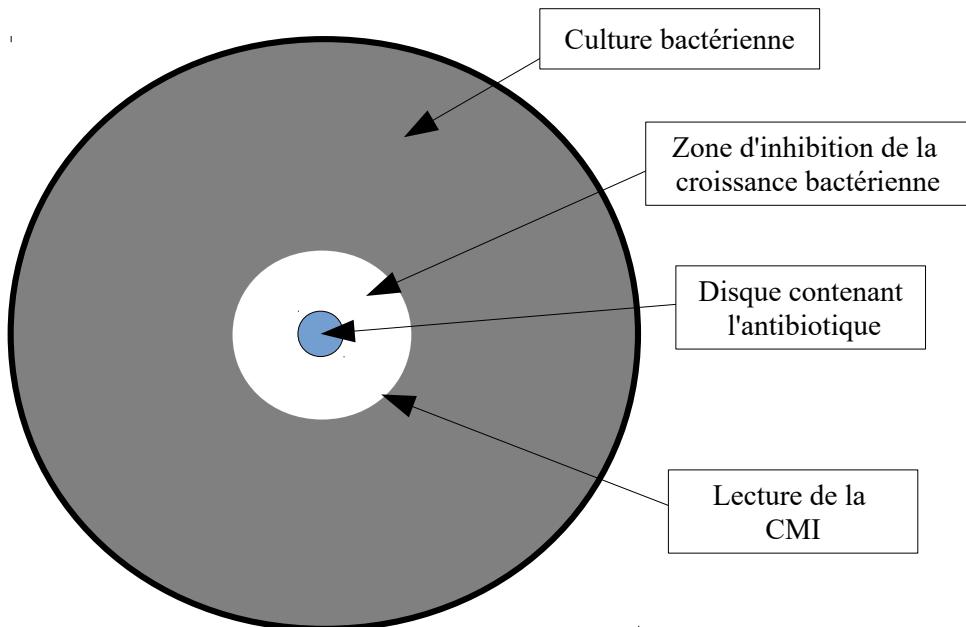


Calcul d'une CMI en milieu liquide :



➔ méthodes par diffusion : on dépose un disque imprégné d'une concentration connue en antibiotique sur un milieu gélosé. L'antibiotique diffuse et crée un gradient de concentration autour du disque. La croissance bactérienne ne se fait donc qu'au-delà d'un certain rayon autour du disque. C'est au niveau de la limite ainsi dessinée que la concentration de l'antibiotique correspond à la CMI. Cette méthode est illustrée figure 9. Il existe aussi des bandelettes Etest graduée en concentration. Cette dernière permet de lire immédiatement la CMI mais est peu utilisée en médecine vétérinaire du fait de son prix.

*Figure 9 : Méthode de détermination de la CMI par diffusion*



#### II.A.1.b. Définition de la résistance bactérienne

La résistance aux antibiotiques peut être définie selon différents points de vue. (AFSSA, 2006)

- Pour le clinicien, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace.
- Pour le pharmacologue, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action sont inférieures à la CMI.
- Pour le microbiogiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la CMI.
- Pour l'épidémiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle a une CMI significativement supérieure de celles de la population normale.

Afin d'avoir une définition générale de la notion de bactérie résistante, des experts ont établi des seuils critiques sur la base des informations cliniques, pharmacologiques, microbiologiques et épidémiologiques, permettant de classer les bactéries en trois catégories : sensibles, intermédiaires, ou résistantes. En France, ces seuils critiques sont définis par le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2015).

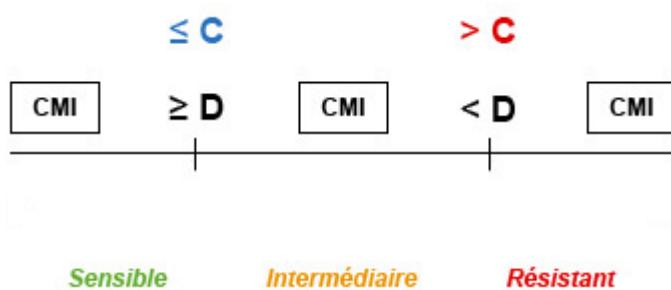
Les souches catégorisées sensibles sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.

Les souches catégorisées résistantes sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

Les souches catégorisées intermédiaires sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches peuvent soit présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, mais qui peuvent apparaître résistante au traitement *in vivo*, soit présenter un mécanisme de résistance suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions d'utilisation (fortes concentrations locales ou posologies accrues). (AFSSA, 2006)

En pratique, on compare la CMI trouvée avec les valeurs seuils, exprimées en concentration (mg/L) ou en diamètre (mm). Cela est représenté sur la figure 10.

*Figure 10 : Classement d'une bactérie dans la catégorie "sensible", "intermédiaire", ou "résistante" en fonction de sa CMI ("Laboratoire d'analyse le palais des Pyrénées - Détermination de la CMI - Antibiogramme et CMI," n.d.)*



#### II.A.1.c. Résistance naturelle ou acquise

Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques a été longuement étudié. Deux types de résistance doivent être différenciés : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle est caractéristique d'une espèce bactérienne. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification des bactéries. On parle d'espèces bactériennes naturellement résistantes et de mécanismes de résistance intrinsèque. Ceci peut être dû à l'absence de la cible (comme l'absence de paroi chez les mycoplasmes les rendant insensibles aux bétalactamines) ou encore à l'absence de pénétration de l'antibiotique (rôle de la membrane externe par exemple chez les bactéries Gram négatif avec la vancomycine). (AFSSA, 2006 ; CA-SFM, 2015)

Le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie répertorie les résistances naturelles de toutes les espèces bactériennes. Le tableau 3 présente les résistances naturelles chez les entérobactéries.

Tableau 3 : Résistance naturelle des entérobactéries (CA-SFM, 2015)

| Espèces                        | AM | AMC | TIC/<br>PIP | C1G | FOX | MA | CXM | GM | TET | COL | FT |
|--------------------------------|----|-----|-------------|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|----|
| <i>Klebsiella spp.</i>         | R  |     | R           |     |     |    |     |    |     |     |    |
| <i>E. hermanii</i>             | R  |     | R           |     |     |    |     |    |     |     |    |
| <i>C. koseri</i>               | R  |     | R           |     |     |    |     |    |     |     |    |
| <i>C. freundii</i>             | R  | R   |             | R   | R   |    |     |    |     |     |    |
| <i>E. cloacae</i>              | R  | R   |             | R   | R   |    |     |    |     |     |    |
| <i>E. aerogenes</i>            | R  | R   |             | R   | R   |    |     |    |     |     |    |
| <i>H. alvei</i>                | R  | R   |             | R   |     |    |     |    |     |     |    |
| <i>S. marcescens</i>           | R  | R   |             | R   |     | R  | R   |    |     | R   |    |
| <i>P. mirabilis</i>            |    |     |             |     |     | R  | R   |    | R   | R   | R  |
| <i>P. vulgaris, P. penneri</i> | R  |     |             | R   |     | R  | R   |    | R   | R   | R  |
| <i>M. morganii</i>             | R  | R   |             | R   |     |    | R   |    | R   | R   | R  |
| <i>P. stuartii</i>             | R  | R   |             | R   |     |    |     |    | R   | R   | R  |
| <i>P. rettgeri</i>             | R  | R   |             | R   |     |    |     |    | R   | R   | R  |
| <i>Y. enterocolitica</i>       | R  | R   | R           | R   | R   | R  | R   |    |     |     |    |

R : résistance naturelle

TIC : ticarcilline

FOX : céfoxitine

GM : gentamicine

COL : colistine, polymyxine B

AM : aminopénicillines

PIP : pipéracilline

MA : céfamandole

TET : tétracyclines y compris la tigécycline

FT : nitrofuranes

AMC : amoxicilline + acide clavulanique

C1G : céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération

CXM : céfuroxime

Les bactéries peuvent également acquérir une résistance à un antibiotique. Dans ce cas, la résistance acquise est due à une modification du capital génétique de la bactérie, elle est donc présente seulement dans certaines souches de l'espèce. Cela peut résulter d'une modification génétique par mutation ou de l'acquisition d'un matériel génétique étranger par transfert horizontal. Ce transfert se fait y compris entre espèces éloignées phylogénétiquement et correspond à des mécanismes bien connus : transformation, conjugaison et transduction. Les mutations génétiques aboutissant à une résistance sont rares (fréquence de  $10^{-6}$  à  $10^{-10}$ ). L'utilisation d'antibiotiques ne va pas favoriser l'apparition de ces résistances par mutation, mais va exercer une pression de sélection qui va sélectionner les mutants devenus résistants. (AFSSA, 2006 ; Chopra et al., 2003)

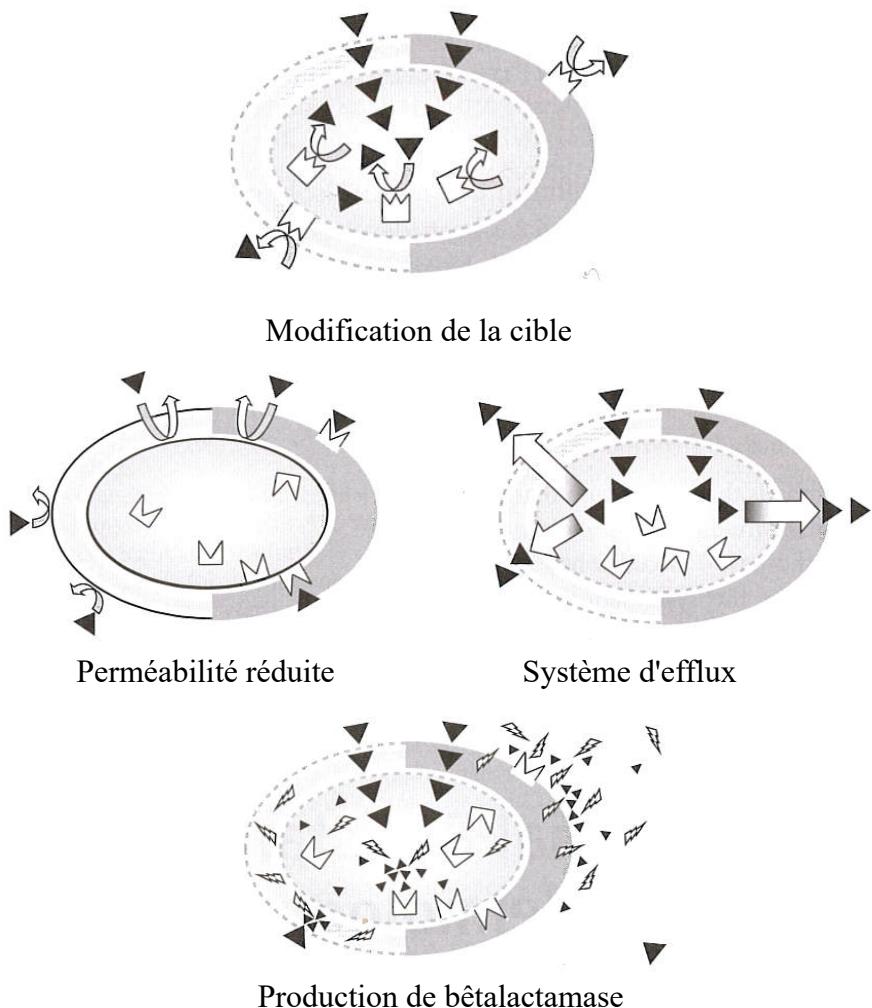
C'est le développement de ces résistances acquises qui est devenu préoccupant aujourd'hui, et c'est dans ce sens là que le terme d'antibiorésistance sera utilisé dans toute la thèse.

## II.A.2. Mécanisme de résistance aux bétalactamines

Il existe trois grands mécanismes de résistances aux bétalactamines : la modification de la cible de l'antibiotique (les PLPs), une incapacité des bétalactamines à pénétrer jusqu'au site d'action, par une diminution de la perméabilité membranaire ou par la formation d'efflux actif, ou la production d'enzymes hydrolysant les bétalactamines : les bétalactamases. Ces différents mécanismes de résistance sont illustrés dans la figure 11 et développés ci-après. (Boerlin et White, 2013 ; Lozniewski et Rabaud, 2010)

*Figure 11 : Les différentes stratégies de résistance bactérienne aux bétalactamines*

(Boerlin et White, 2013)



### II.A.2.a. Modification des PLPs

Certaines bactéries ont développé une modification de la cible des bétalactamines, les PLPs. Trois mécanismes ont été mis en évidence :

- une diminution de l'affinité des PLPs pour les bétalactamines. On retrouve ce mécanisme chez *Streptococcus pneumoniae*.
- une augmentation de la synthèse des PLPs : le nombre élevé de PLPs disponibles conduit à une impossibilité pour une même dose de bétalactamines de toutes les bloquer. On retrouve ce mécanisme chez *Enterococcus spp.*
- la synthèse de PLPs insensibles aux bétalactamines. On retrouve ce mécanisme chez *Staphylococcus aureus*. L'acquisition et l'intégration dans le chromosome du gène *mecA*, d'origine mal connue, lui a permis d'assurer une résistance à toutes les bétalactamines. (Lozniewski et Rabaud, 2010)

### II.A.2.b. Incapacité de l'antibiotique à pénétrer jusqu'au site d'action

Pour agir, les bétalactamines doivent arriver jusqu'aux PLPs. Deux mécanismes de résistance existent chez les bactéries, permettant d'empêcher les bétalactamines d'arriver aux PLPs :

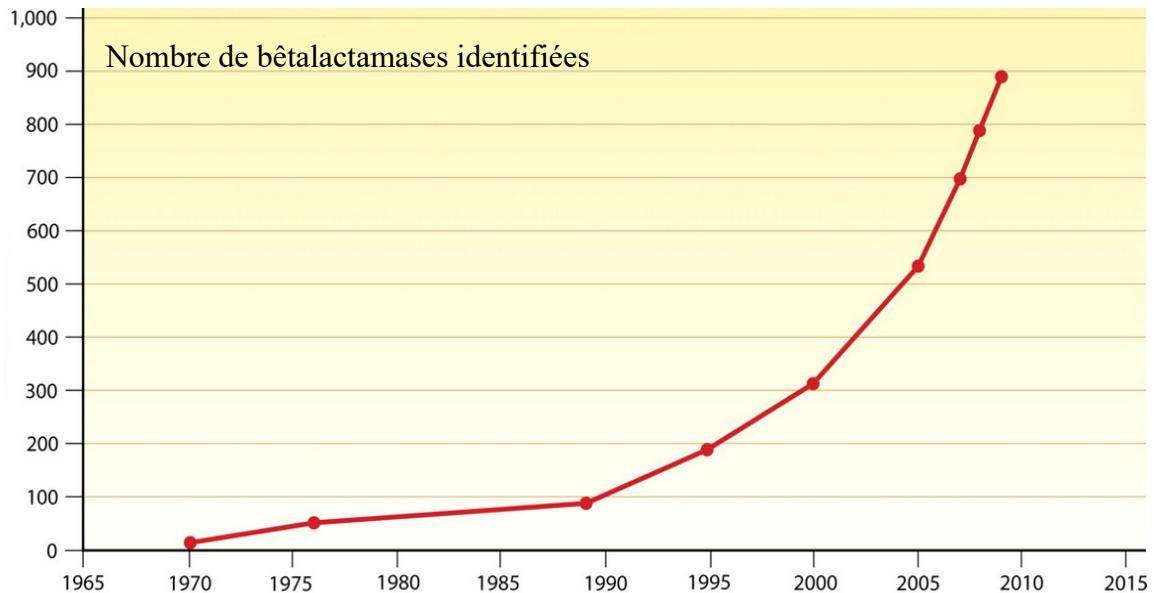
- une diminution de la perméabilité membranaire des bactéries. Chez les bactéries Gram positif, les bétalactamines traversent aisément le peptidoglycane, mais chez les bactéries Gram négatif, leur membrane externe est imperméable aux bétalactamines. Celles-ci rentrent dans l'espace périplasmique par des porines. Ainsi, une modification génétique affectant la structure des porines, ou diminuant leur nombre, entraînera une résistance de la bactérie aux bétalactamines. (Boerlin et White, 2013 ; Lozniewski et Rabaud, 2010)
- une augmentation de l'efflux actif des bétalactamines, permettant de diminuer leur concentration au site d'action. Cet efflux repose sur un transporteur capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie. Ce mécanisme c'est pas possible chez les bactéries Gram positif, car les cibles des bétalactamines (les PLPs) sont situées directement sur la face externe de la membre cytoplasmique. Chez les bactéries Gram négatif, il existe de nombreux transporteur capable d'éjecter les bétalactamines en dehors de l'espace périplasmique. On trouve par exemple chez *Escherichia coli* les transporteurs AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, MexAB-OprM et MexCD-OprJ. (Mesaros et al., 2005)

### II.A.2.c. Production de bétalactamases

La production de bétalactamases est le mécanisme de résistance le plus efficace et surtout le plus répandu. Ces enzymes sont capables de se lier aux bétalactamines afin d'hydrolyser le pont amide du noyau bétalactame. L'antibiotique est ainsi transformé de façon irréversible en acylenzyme qui sera dégradé en acide inactif. Chez les bactéries Gram positif, les bétalactamases sont exportées dans l'espace extracellulaire. Chez les bactéries Gram négatif, on les retrouve généralement dans l'espace périplasmique, mais elle peuvent aussi être dans l'espace extracellulaire. Elles se lient aux

bêtalactamines et les inactivent avant que celles-ci aient pu atteindre les PLPs. Il existe un très grand nombre de bêtalactamases, qui ont fait l'objet de nombreuses études. Ce nombre est en constante augmentation depuis 1970, et atteint près de 900 bêtalactamases différentes en 2009 (voir figure 12). Ce mécanisme de résistance important à la fois qualitativement et quantitativement est un des plus préoccupant aujourd'hui. (Bush et Jacoby, 2010 ; Elhani, 2012 ; Prescott, 2013b)

*Figure 12 : Évolution du nombre de bêtalactamases depuis 1970  
(Davies et Davies, 2010)*



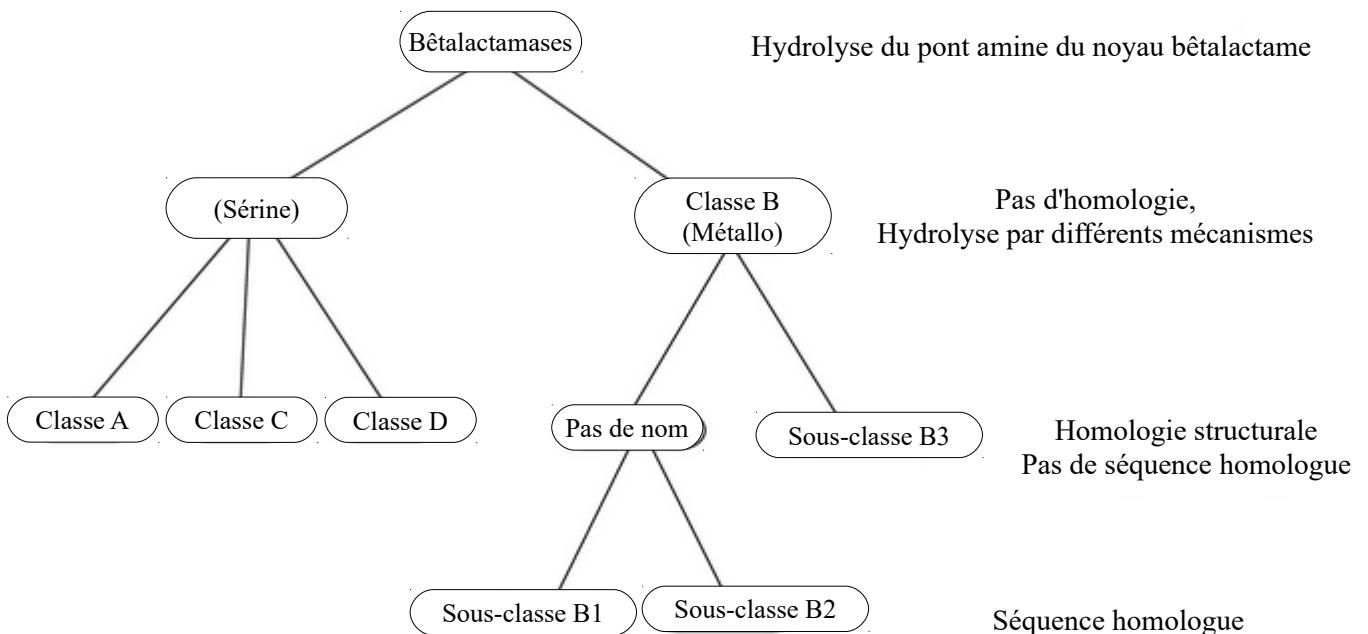
### II.A.3. Classification des bêtalactamases

La première bêtalactamase a été mise en évidence dans les années 1960 en Grèce. Elle fut trouvée chez une souche d'*Escherichia coli* isolée d'un patient nommé Temoniera et appelée TEM-1 en mémoire de ce patient. Depuis, plusieurs centaines de bêtalactamases ont été découvertes. Elles sont nommées par trois lettres majuscules, suivant les propriétés biochimiques du substrat, l'endroit où elles ont été décrites pour la première fois ou le nom du patient chez qui elles ont été isolées. Ces bêtalactamases n'ont pas toutes les mêmes propriétés. Elles se différencient notamment par des substrats différents, ou par leur sensibilité plus ou moins grande aux inhibiteurs des bêtalactamases. (Bradford, 2001 ; Elhani, 2012)

Il existe deux classifications permettant de décrire ces bétalactamases :

- classification d'Ambler : elle est fondée sur la structure primaire des bétalactamases et les répartit en quatre classes (A, B, C ou D). À l'origine Ambler avait réparti les bétalactamases en deux classes : la classe A, contenant un résidu sérine actif, qui leur permet d'hydrolyser leur substrat en formant un acylenzyme ; et la classe B, appelée métallo-bétalactamase, dont le site actif comprend un ion Zinc. La classe C, représentée notamment par les bétalactamases AmpC, fut décrite en 1981 par Jaurin et Grundstrom. Elle comprend aussi un site actif avec une sérine, mais possède des séquences différentes de la classe A. (Jaurin et Grundström, 1981) Une autre classe de sérine-bétalactamases fut décrite en 1987 comme la classe D, aussi connue sous le nom de bétalactamases OXA. (Ouellette et al., 1987) Enfin, la classe B fut séparé en trois sous-classes : B1, B2 et B3. Ces différentes classes et sous-classes sont représentées dans la figure 13.

*Figure 13 : Classification d'Ambler  
(Hall et Barlow, 2005)*



- classification de Bush et Jacoby : elle est fonctionnelle, axée sur les substrats des enzymes et leur sensibilité aux inhibiteurs. Elle répartit les bétalactamases en quatre groupes (1, 2, 3 ou 4), décrits dans le tableau 4. (Bush et Jacoby, 2010)

Tableau 4 : Classification fonctionnelle et moléculaire des bétalactamases  
(Bush et Jacoby, 2010 ; Prescott, 2013b)

| Groupe (Bush-Jacoby) | Classe (Ambler) | Type d'enzyme   | Sensibilité à l'acide clavulanique ou au tazobactam | Exemple d'enzyme           |
|----------------------|-----------------|---|---|----------------------------|
| 1                    | C               | Céphalosporinase (C1G et C2G)<br>Faible activité sur les benzylpénicillines | non   | AmpCs, CMY-2, ACT-1, MIR-1 |
| 1e                   | C               | Céphalosporinase, activité augmentée sur les C3G                            | non   | CMY-37                     |
| 2a                   | A               | Forte résistance aux pénicillines   | oui   | PC 1                       |
| 2b                   | A               | Bétalactamases à larges spectres (Pénicillines et C1G/C2G)                  | oui   | TEM-1, SHV-1, TEM-2        |
| 2be                  | A               | BLSE (Pénicillines, Céphalosporines dont C3G)<br>Monobactames               | oui   | SHV-2, TEM-10, CTX-Ms      |
| 2ber                 | A               | BLSE (Pénicillines, Céphalosporines dont C3G)<br>Monobactames               | non   | TEM-50                     |
| 2br                  | A               | Bétalactamases à larges spectres (Pénicillines et C1G/C2G)                  | non   | TEM-30, SHV-10             |
| 2c                   | A               | Hydrolysant la carbénicilline   | oui   | PSE-1                      |
| 2d                   | D               | Hydrolysant l'oxacilline  | variable  | OXA-10, OXA-1              |
| 2de                  | D               | BLSE (Pénicillines, Céphalosporines dont C3G)                               | variable  | OXA-11, OXA-15             |
| 2df                  | D               | Carbapénémases  | variable  | OXA-23, OXA-48             |
| 2e                   | A               | Céphalosporinases   | oui   | CepA                       |
| 2f                   | A               | Carbapénémases  | variable  | KPC-1, SME-1               |
| 3                    | B               | Carbapénémases  | non   | IMP-1, VIM-1, Ccr A        |
| 4                    |                 | Enzymes diverses  |   |                            |

Légende : (Jacoby, 2006)

| Nom de l'enzyme | Signification du sigle  |
|-----------------|---|
| ACT             | <b>AmpC Type</b>  |
| CcrA            | Cefoxitin and carbapenem resistant class A  |
| CepA            | Chromosomal Cephalosporinase from <i>Bacteroides fragilis</i> belonging to Ambler class A |
| CMY             | Active on CephaMYcins   |
| CTX-M           | Active on CefoTaXime, first isolated at Munich  |
| IMP             | Active on IMIPenem  |
| KPC             | <i>K. pneumoniae</i> Carbapenemase  |
| MIR             | Discovered at MIRiam Hospital   |

| Nom de l'enzyme | Signification du sigle                        |
|-----------------|---|
| OXA             | Active on OXAcillin                           |
| PC-1            | Souche PC-1 de <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| PSE             | <i>Pseudomonas</i> -Specific Enzyme           |
| SHV             | SulfHydryl reagent Variable                   |
| SME             | <i>Serratia</i> Marcescens Enzyme             |
| TEM             | nom du patient TEMoneira                      |
| VIM             | Verona Integron-encoded Metallo-bétalactamase |

Dans notre étude, nous nous intéresserons particulièrement aux CHN, aux BLSE et aux carbapénémases, qui confèrent aux bactéries une résistance aux antibiotiques critiques.

Les CHN, ou « Céphalosporinases de haut niveau » font partie du groupe 1 de la classification Bush-Jacoby. Il s'agit d'une hyperproduction constitutive d'AmpC. Ce phénomène est la conséquence de mutations affectant des gènes de régulation d'AmpC. Il contribue à rendre les souches bactériennes résistantes à l'aztréonam, aux céphamycines et aux céphalosporines de troisième génération. Les céphalosporines de quatrième génération restent en général actives. Ce phénotype, appelé « céphalosporinase de haut niveau », se caractérise également par le fait que la résistance aux céphalosporines de troisième génération peut être inhibée par la cloxacilline, mais pas par les inhibiteurs des bétalactamases. Chez *E.coli*, ce phénotype peut résulter de mutations du promoteur, d'un gène atténuateur ou de duplications du gène de structure. Le phénotype CHN peut aussi avoir un support plasmidique. Il s'agit alors de plasmides souvent conjugatifs qui possèdent des gènes AmpC (CMY, FOX...) qui diffusent au sein de nombreuses espèces d'entérobactéries, notamment *Escherichia coli*. (Chassagne, 2012)

Les BLSE, bétalactamases à spectre étendu, sont très étudiées aujourd'hui car leur importance quantitative et qualitative évolue rapidement. Il n'y a aucun consensus sur la définition précise des BLSE. Une définition généralement utilisée est que les BLSE sont caractérisées par une résistance marquée aux pénicillines et aux céphalosporines de première et deuxième génération, et une diminution plus ou moins franche de l'activité des céphalosporines de troisième et quatrième génération et de l'aztréonam. Elles sont sensibles aux inhibiteurs des bétalactamases comme l'acide clavulanique et n'ont pas d'activité contre les céphamycines et les carbapénèmes. (Elhani, 2012 ; Paterson et Bonomo, 2005) Les BLSE font partie des groupes 1e, 2be, 2ber et 2e de la classification fonctionnelle de Bush et Jacoby. (Prescott, 2013b) Il existe aujourd'hui de très nombreuses BLSE, réparties dans 11 familles d'enzymes selon leur séquence en acides aminés : TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA. Jusqu'à la fin des années 1990, la majorité des BLSE détectées étaient des dérivés de TEM-1 et TEM-2 et de SHV-1, ayant subi des mutations ponctuelles leur donnant un spectre étendu. Les BLSE étaient souvent retrouvées chez *K.pneumoniae* et associées à des épidémies nosocomiales. À partir de 1995, la situation épidémiologique a changé avec l'émergence et la diffusion massive des CTX-M chez les entérobactéries. La plupart des souches productrices de BLSE sont maintenant des *Escherichia coli* exprimant des BLSE de type CTX-M responsables d'infections aussi bien communautaires que hospitalières. Les gènes des BLSE sont principalement situés sur les plasmides et diffusent rapidement parmi les bactéries. (Bradford, 2001 ; Cattoir, 2008 ; Elhani, 2012)

Les carbapénémases sont des bétalactamases ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. Les plus fréquentes sont KPC (classe A d'Ambler), VIM, IMP, NDM (classe B), OXA-48 et OXA-23 (classe D). Ces enzymes font partie des groupes 2df, 2f et 3 de la classification de Bush et Jacoby. Elles sont retrouvées dans une grande variété d'espèces bactériennes (entérobactéries, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*). Les carbapénémases ont une distribution géographique mondiale, mais certains pays semblent plus spécifiquement touchés. (Grall et al., 2011)

## II.B. Des supports génétiques permettant une forte dissémination

### II.B.1. Supports génétiques

Les gènes de résistance aux bétalactamines sont nommés les gènes *bla* (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, ...) La pression de sélection due à l'utilisation d'antibiotiques favorise la survie des bactéries résistantes et élimine celles sensibles. L'écosystème s'enrichit donc en gènes de résistance. Ces gènes peuvent être chromosomique ou plasmidique.

Le chromosome constitue l'essentiel du matériel génétique de la bactérie. Il s'agit d'une double hélice d'ADN circulaire, qui ne sort pas de l'enveloppe bactérienne. Ainsi les gènes de résistance localisés sur le chromosome ont peu de chance d'être échangés avec d'autres bactéries. Ils sont surtout transmis verticalement, comme expliqué dans le paragraphe II.B.2.a. (Madec, 2014)

A côté du chromosome, support de l'hérédité, la bactérie peut contenir des éléments génétiques appelés plasmides. Ce sont des molécules d'ADN bicaténaires souvent circulaires, indépendantes du chromosome et capables d'autoréplication. Les plasmides portent des gènes qui ne sont pas indispensables à la vie de la bactérie dans les conditions habituelles de croissance, mais qui leur donne un avantage pour survivre dans un environnement particulier. On y trouve notamment des gènes de résistance aux antibiotiques. Les plasmides sont des éléments mobiles, qui vont permettre aux gènes de résistance de diffuser rapidement par transfert horizontal, notamment par conjugaison (voir paragraphe II.B.2.b). Il existe différents types de plasmides :

- les plasmides conjuguatifs. Ils possèdent l'information génétique nécessaire à leur réplication et leur transfert à une bactérie receveuse via un pilus sexuel. (Bennett, 2008)

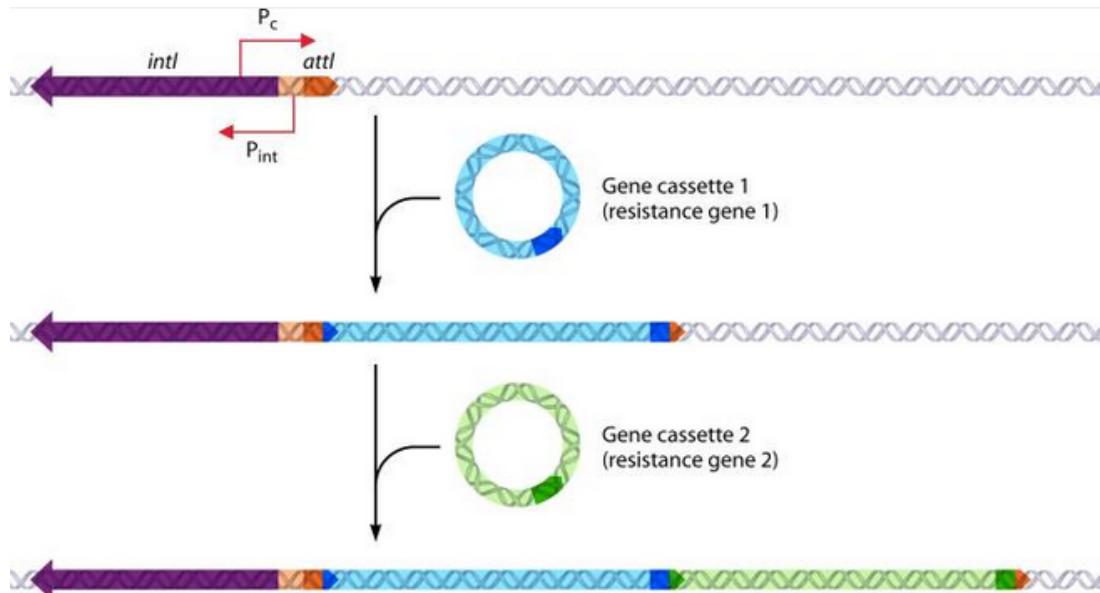
- les plasmides non conjuguatifs. Ces plasmides peuvent être mobilisables s'ils contiennent une origine de transfert, qui leur permet d'être mobilisés par un autre plasmide conjuguatif et transférés par conjugaison à une bactérie receveuse. Dans le cas contraire, ils sont non-mobilisables, et ne pourront être transférés qu'après intégration à un plasmide conjuguatif. (Bennett, 2008)

Le chromosome et les plasmides sont également le support de diverses structures génétiques capables de véhiculer les gènes de résistance : les transposons et les intégrons. Les transposons sont des fragments d'ADN dotés d'une très grande mobilité. Grâce à un gène pour une transposase, ils possèdent la capacité de se mouvoir d'un site d'ADN à un autre, par exemple d'un plasmide à un autre, ou d'un plasmide au chromosome bactérien, et inversement. Ce mécanisme ne requiert pas de site d'insertion particulier. Il a été montré que les transposons pouvaient s'insérer dans des sites très aléatoires. (Bennett, 2008) Il existe différents types de transposons : composites, non-composites, mobilisables et conjuguatifs. Ces derniers jouent un rôle important dans la diffusion des gènes de résistance car ils possèdent l'information génétique nécessaire pour se transférer d'une bactérie à une autre par conjugaison. (Roberts et al., 2008)

Un autre élément génétique véhiculant des gènes de résistance est l'intégron. Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Les gènes-cassettes sont des petites molécules d'ADN double brin, circulaires et incapables de se répliquer. L'intégron possède un gène *int* codant pour une intégrase, capable de capturer le gène-cassette et de l'insérer dans la séquence de l'intégron, comme le montre la figure 14. Les gènes-cassettes peuvent s'insérer les uns après les autres sur l'intégron, formant un intégron doté d'une importante ressource

génétique pour la bactérie et aussi appelé super intégron. Ces gènes cassettes peuvent être des gènes de résistance, comme  $bla_{IMP}$  et  $bla_{VIM}$ , et on a alors le risque de la formation d'intégron avec des résistances multiples. Ces intégrons sont situés sur le chromosome bactérien ou sur un plasmide. Ils sont incapables d'auto-réPLICATION, mais peuvent être véhiculé par le plasmide ou par un transposon.

*Figure 14 : Fonctionnement des intégrons (Davies et Davies, 2010)*



## II.B.2. Transmission des résistances

### II.B.2.a. Transfert vertical

On parle de transfert vertical lorsque la bactérie transmet le gène de résistance à sa descendance. Les bactéries se reproduisent de façon asexuée par scission binaire. Le matériel génétique est tout d'abord dupliqué, puis la bactérie s'allonge, se contracte en son milieu et se divise, formant ainsi deux cellules filles identiques à la cellule mère. Le matériel génétique de la bactérie est donc transmis aux cellules filles, puis à toute la colonie bactérienne descendant de la division clonale de ces bactéries. On parle de dissémination clonale de la résistance. On est alors face à une résistance qui s'installe au sein de clones bactériens donnés, que l'on est capable d'identifier par des techniques de bactériologie conventionnelle. Ces souches bactériennes peuvent être associées à une pathologie, avec un tableau clinique connu et des informations épidémiologiques accessibles (foyer initial, vitesse de diffusion, population atteinte...). La transmission de l'antibiorésistance est donc visible et généralement bien documentée. (Madec, 2014)

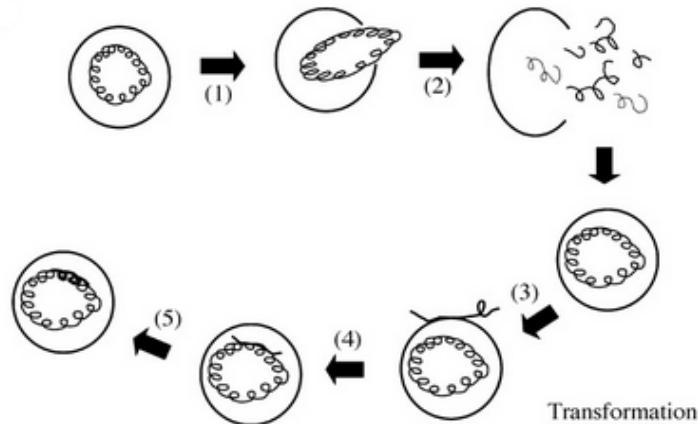
## II.B.2.b. Transfert horizontal

La diffusion de la résistance peut aussi se faire par transfert horizontal, c'est à dire transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre, qui ne sont pas nécessairement de la même espèce. Il existe trois mécanismes de transfert horizontal :

- la transformation :

Ce transfert d'ADN bactérien existe chez seulement quelques espèces (environ une cinquantaine), telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae*. Le mécanisme est expliqué dans la figure 15. À la mort d'une bactérie donneuse, celle-ci libère son ADN (1) qui se fragmente (2). Les petits fragments d'ADN vont alors pouvoir se lier à la surface d'une bactérie receveuse, dite compétente, de la même espèce ou d'une espèce proche (3). Ce fragment d'ADN est incorporé dans la cellule (4), puis recombiné dans le génome bactérien (5). Toutefois, la transformation a ses limites. En effet, outre le peu d'espèces naturellement compétentes, l'ADN exogène doit présenter une séquence très similaire avec l'ADN de la cellule réceptrice pour s'intégrer dans le génome. Dans le cas contraire, l'ADN nu sera rapidement dégradé. De ce fait, la transformation jouerait un rôle limité dans le transfert horizontal de gènes de résistances (Bennett et al., 2004 ; Dutta et Pan, 2002)

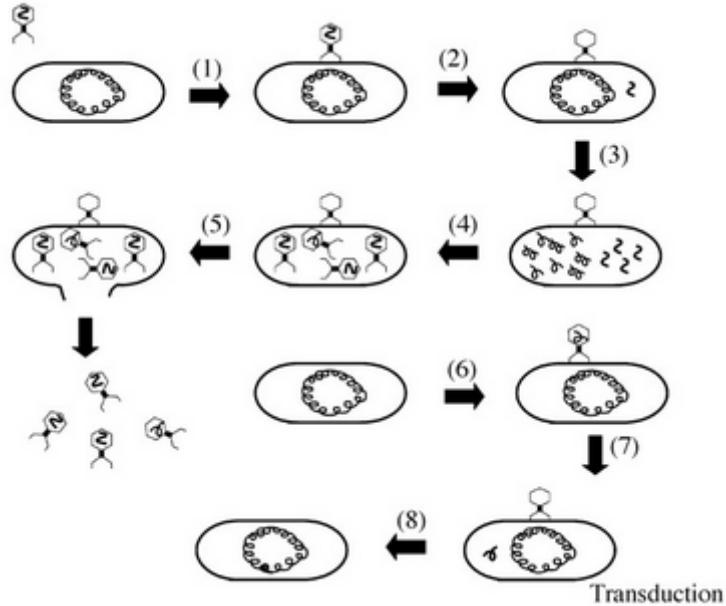
*Figure 15 : Mécanisme de la transformation (Bennett et al., 2004)*



- la transduction :

Le mécanisme de la transduction généralisée, le seul éventuellement impliqué dans des transferts de gènes de résistance, est décrit dans la figure 16. Il implique un virus appelé bactériophage, qui va se lier à la surface de la bactérie (1). Son ADN est ensuite injecté dans la bactérie (2), puis répliqué, et l'ADN de la bactérie hôte est fragmenté (3). De nouveaux bactériophages sont alors assemblés. Les fragments d'ADN bactériens peuvent être intégrés dans une capsidé (4), qui sera libérée lors de la lyse de la bactérie (5). Celle-ci est alors capable de se fixer à une autre bactérie (6). Les fragments d'ADN seront libérés dans cette nouvelle bactérie (7) et intégrés à son chromosome (8). (Bennett et al., 2004) Les phages ont été décrits chez plusieurs bactéries, comme *Staphylococcus aureus*, et sont capables de se fixer seulement sur un spectre étroit de bactéries. Le transfert de gène de résistance via la transduction est possible *in vitro*, mais il est très improbable *in vivo*. (Lacey, 1975)

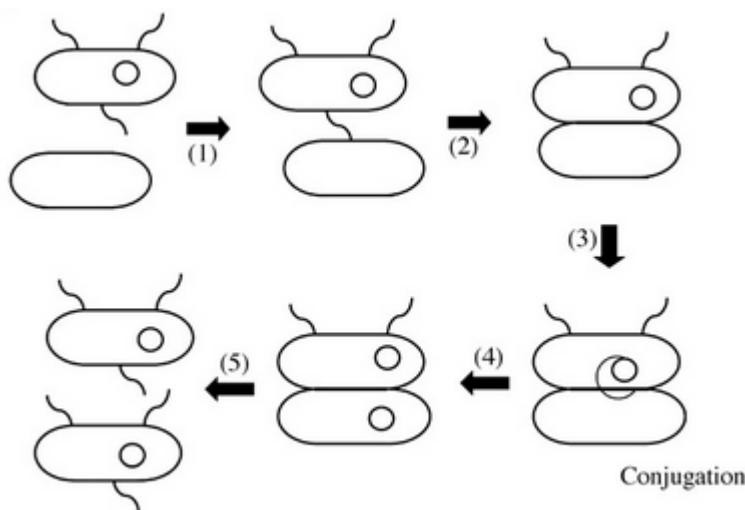
Figure 16 : Mécanisme de la transduction (Bennett et al., 2004)



- la conjugaison :

Ce mécanisme est décrit dans la figure 17. La bactérie donneuse possède un plasmide conjugal ou un transposon conjugal qui contient toute l'information génétique nécessaire pour déclencher la conjugaison. Elle va tout d'abord créer un pilus sexuel la reliant à la bactérie receveuse (1), pour former un pont cytoplasmique entre les deux bactéries (2). Le plasmide est alors répliqué, transféré progressivement à la bactérie receveuse (3), et convertit en ADN circulaire. Les deux bactéries se séparent et la bactérie receveuse est à son tour capable de transmettre ce matériel génétique à une autre bactérie par conjugaison. (Bennett et al., 2004)

Figure 17 : Mécanisme de la conjugaison (Bennett et al., 2004)



Il s'agit du mécanisme de transmission le plus important et le plus fréquemment rencontré. La conjugaison est un processus par lequel l'ADN est transféré d'une bactérie à une autre via un contact cellule-cellule. Contrairement aux deux mécanismes précédents, la conjugaison permet l'échange de matériel génétique entre deux bactéries pouvant être éloignées phylogénétiquement. Il a même été montré que ce transfert était possible entre une bactérie et un végétal, entre une bactérie et une levure et entre une bactérie et une cellule mammifère. (Bennett et al., 2004 ; Dutta et Pan, 2002) Il existe ainsi des flux majeurs de plasmides de résistance entre les bactéries, plus particulièrement chez les entérobactéries. Cette transmission est plus difficile à identifier que la diffusion clonale. Les plasmides ne confèrent pas de maladie particulière, ils se transmettent donc de façon inapparente entre les bactéries et leur dissémination est généralement constatée bien après qu'elle ait commencé. C'est en partie pour cette difficulté de suivi et de maîtrise que les plasmides sont considérés comme un enjeu majeur en antibiorésistance. (Madec, 2014)

### II.B.3. Une dissémination de résistance possible entre l'Homme et l'animal

Le transfert possible de la résistance aux antibiotiques entre l'Homme et l'animal constitue une question majeure pour la santé publique. Deux situations se présentent : il peut y avoir dissémination de bactéries pathogènes dotées d'une résistance, associée à un risque zoonotique ; mais aussi dissémination de plasmides de résistance, qui serait un enjeu majeur pour la santé publique.

#### II.B.3.a. Dissémination clonale de bactérie résistante

Ce transfert entre l'Homme et l'animal a surtout été documenté pour les animaux d'élevage. En effet, la voie alimentaire est indiscutablement une passerelle de transmission entre l'animal et l'Homme. Les bactéries présentent dans certains aliments peuvent contaminer l'Homme. Parmi ces bactéries, on trouve *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* ou *Salmonella enterica*. Ces infections sont le plus souvent des anadémies (cas groupés, infectés à partir d'une même source) et sont appelées toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Si la souche bactérienne en cause de la TIAC présente la particularité d'être résistante à des antibiotiques, le passage de l'antibiorésistance entre l'Homme et l'animal est alors clairement mis en évidence. (Madec, 2013) Un exemple est la diffusion de *Salmonella typhimurium* sérotype DT104, penta-résistante (résistance à l'ampicilline, la streptomycine, le chloramphénicol, les sulfamides et les tétracyclines). Cette bactérie s'est d'abord largement répandue parmi le bétail aux Royaume-Uni dans les années 1990 avant l'apparition de cas humains. En Angleterre et au Pays de Galles, cette salmonelle penta-résistante a été isolée sur environ 200 cas humains en 1990, puis plus de 4000 en 1996, avant de diminuer significativement à partir de 1998. Ces infections humaines ont alors été associées à la consommation de poulet, de bœuf et de porc, et dans une moindre mesure au contact professionnel avec du bétail infecté. (Threlfall, 2000)

Une autre passerelle de transmission entre l'Homme et l'animal est le contact direct. La plupart des cas documentés concernent les animaux de production avec un contact professionnel, comme vu précédemment avec l'exemple de *Salmonella typhimurium* sérotype DT104. Cependant, la proximité entre les animaux de compagnie et les humains offre des conditions favorables pour la transmission de bactéries par contact direct. Les chiens et les chats sont des sources potentielles de plusieurs agents de zoonose bactérienne pouvant être transmis notamment par voie oro-fécale ou par

morsures. (Guardabassi et al., 2004) À la différence des anadémies provoquées par les TIAC, ces zoonoses sont des cas isolés. N'étant pas associées à des crises sanitaires, peu d'études ont cherché à explorer l'hypothèse d'une transmission de l'antibiorésistance par contact entre l'Homme et l'animal. Il a néanmoins été montré que l'Homme et son animal de compagnie pouvaient être porteurs des mêmes souches bactériennes résistantes, même si le sens de la transmission reste souvent inconnu. Cela a été mis en évidence par des études menées hors de France sur des SARM (*Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline). (Madec, 2012a, 2013) Par exemple, aux États-Unis, un patient atteint de diabète avait des infections récidivantes de la jambe par un SARM, et sa femme présentait elle aussi des infections de la peau par ce même SARM. Finalement, ce SARM fut retrouvé sur une culture d'écouillon nasal de leur chien. Les infections récidivantes de ces patients n'ont pu être stoppées qu'une fois le chien traité et devenu non-porteur du SARM. (Manian, 2003) Un autre cas de transmission de SARM de l'Homme à l'animal a été rapporté aux Pays-Bas. Suite à une épidémie nosocomiale, une infirmière a eu une infection par un SARM, qui récidivait malgré les traitements. Ce SARM alors fut retrouvé chez sa fille et son chien, qui ont eux aussi été traités. (Van Duijkeren et al., 2004)

On est ici face à la dissémination d'une résistance au sein de clones bactériens donnés, que l'on est capable d'identifier par des techniques de bactériologie conventionnelle. Ces souches bactériennes peuvent être associées à une pathologie. La transmission de l'antibiorésistance est donc visible, associée à un tableau clinique connu et des informations épidémiologiques accessibles (foyer initial, vitesse de diffusion, population atteinte...). La diffusion de plasmide de résistance au sein de la flore commensale à la fois animale et humaine est plus préoccupante. Cette diffusion se fait de façon inapparente, et est difficile à suivre et à évaluer. (Madec, 2014)

#### II.B.3.b. Dissémination de plasmides de résistance

Un des principaux enjeux de la lutte contre l'antibiorésistance concerne actuellement les entérobactéries, notamment *Escherichia coli*, présentes dans la flore commensale de tous les mammifères. Il a été montré que les clones bactériens présents dans la flore commensale de l'Homme et de l'animal étaient très souvent différents : les données scientifiques sont donc plutôt en faveur de deux réservoirs bactériens distincts entre l'Homme et l'animal. Cependant, des plasmides identiques contenant des gènes de résistance BLSE ont été retrouvés chez l'Homme et chez l'animal. Ce seraient ces plasmides, plutôt que les bactéries elles-mêmes, qui constituerait un véritable réservoir d'antibiorésistance. Ils diffuseraient au sein de souches bactériennes commensales, d'un hôte à l'autre, Homme ou animal, et pourraient se transmettre également à des souches pathogènes. Plusieurs plasmides contenant des gènes de résistance BLSE circulent actuellement parmi les entérobactéries, et leurs prévalences augmentent de façon préoccupante à la fois chez l'Homme et chez l'animal. (Guardabassi et al., 2004 ; Madec, 2013, 2012b)

## **II.C. Surveillance épidémiologique mise en place chez l'animal**

### **II.C.1. Moyens mis en œuvre pour le suivi**

#### **II.C.1.a. Objectif du suivi**

Le phénomène d'antibiorésistance étant préoccupant, aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, plusieurs programmes de surveillance ont été mis en place. Cette surveillance a pour objectif tout d'abord de faire un état de la situation actuelle, en récoltant des données concernant la prévalence des résistances chez l'Homme et chez l'animal et concernant le taux de résistance chez les différentes espèces bactériennes. Aussi, la comparaison de ces chiffres au fil des années permet de mettre en évidence l'évolution de ces résistances au cours de temps. L'analyse de ces données permet alors de détecter rapidement l'apparition de nouvelles formes de résistances, de surveiller et contrôler une épidémie, d'étudier les différences entre plusieurs pays et d'étudier les liens entre les données animales et humaines. (AFSSA, 2006 ; “Contexte, enjeux et dispositif de surveillance,” n.d.)

#### **II.C.1.b. Les différents réseaux de surveillance**

La surveillance de la résistance bactérienne se fait à différents niveaux.

- À l'échelle nationale :**

En France, la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques repose sur de nombreux partenaires et réseaux de surveillance dont la coordination est placée sous l'égide de Santé Public France (SPF), anciennement Institut de veille sanitaire (InVS). Ces réseaux sont multiples et ont des modalités de fonctionnement variées.

Dans le cadre de la surveillance de la résistance des entérobactéries productrices de BLSE ou de carbapénémases, trois réseaux vont nous intéresser :

- le réseau BMR-Raisin, créé en 2002, qui surveille chez l'Homme l'incidence d'infections bactériennes résistantes nosocomiales en étudiant les SARM et les entérobactéries productrices de BLSE.

- l'ONERBA (Réseaux de l'Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques) qui permet la mise en commun de données de résistance bactérienne. Créé en 1997, l'ONERBA fédère actuellement 16 réseaux de surveillance de la résistance bactérienne. (“Contexte, enjeux et dispositif de surveillance,” n.d.)

- le réseau Résapath qui contribue à la surveillance de la résistance chez l'animal. Ce réseau a été créé en 1982 sous le nom de Résabo, et était alors limité aux bactéries d'origine bovine. Depuis Résapath a étendu sa surveillance aux porcs et aux volailles en 2001, puis aux chiens, aux chats, et aux chevaux en 2007. Le travail de Résapath est animé par deux laboratoires de l'Anses (Laboratoire de Lyon et Laboratoire de Ploufragan-Plouzané). Ces deux entités coordonnent les activités des laboratoires départementaux adhérents (69 en 2014) avec pour objectifs de collecter l'ensemble des résultats d'antibiogrammes réalisés afin de suivre la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes animales. Résapath est le seul réseau vétérinaire membre de l'ONERBA, ce qui lui permet de confronter ces données de résistance chez l'animal à celles collectées chez l'Homme.

Enfin, le panel de souches bactériennes collectées est conservé et utilisé pour l'étude des mécanismes d'antibiorésistance et l'évolution du référentiel vétérinaire au CA-SFM. (Jarrige et al., 2015 ; "Le réseau Résapath - Anses," n.d.)

- À l'échelle Européenne :

L'*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) est le principal système de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en Europe. Crée en 1998, ce réseau est un atout important pour étudier l'évolution à la fois temporelle et géographique de la résistance bactérienne en Europe. Il est depuis 2010 coordonné par l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Les bactéries cibles de cette surveillance sont *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* depuis 1999, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* depuis 2001, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* depuis 2005, *Acinetobacter spp.* depuis 2012. Cette surveillance cible les souches invasives isolées d'hémoculture ou de prélèvement de liquide céphalo-rachidien (hémoculture seule pour les staphylocoques et les entérocoques). (ECDC, 2015)

## II.C.2. État actuel des résistances aux céphalosporines de troisième génération

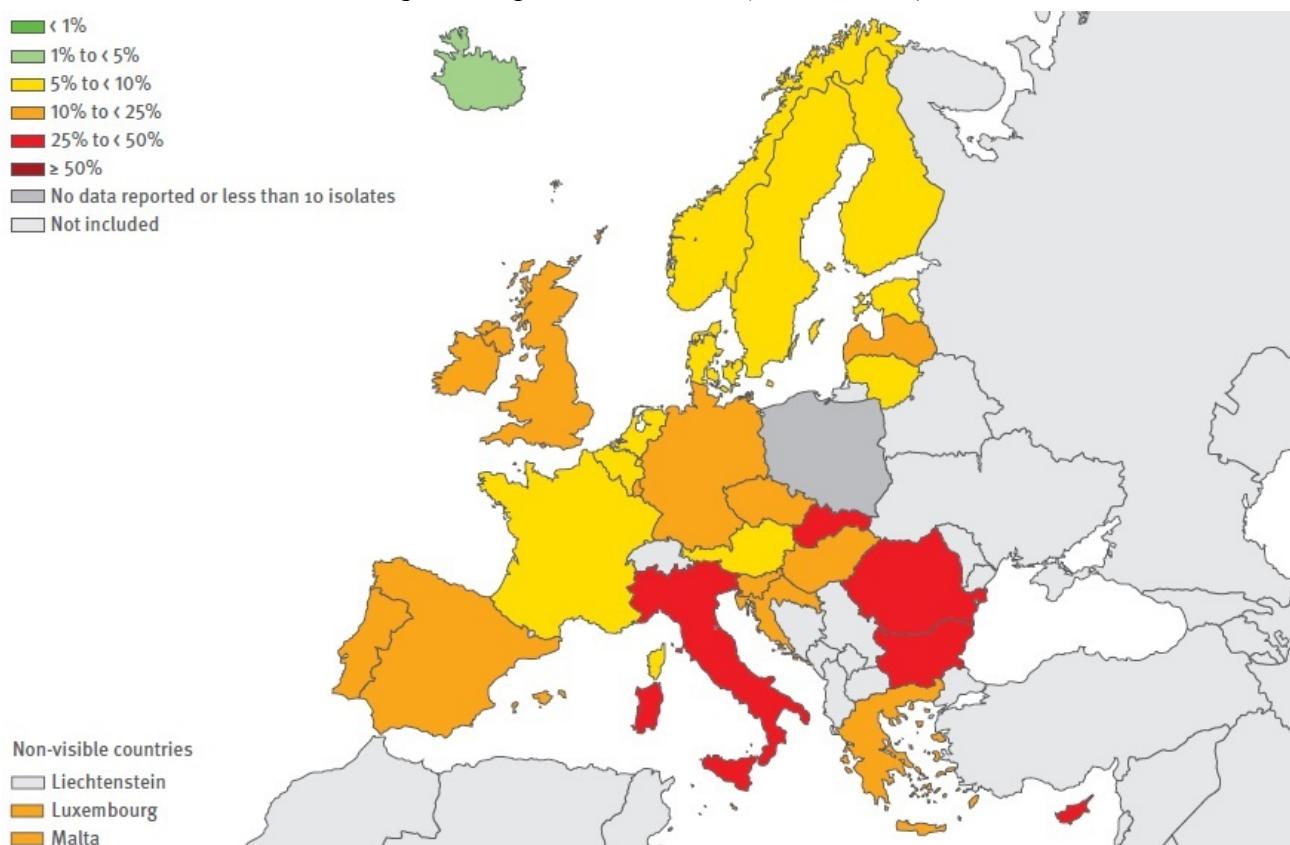
Les premières BLSE ont d'abord été très représentées chez *Klebsiella pneumoniae*, puis la répartition des bactéries productrices de BLSE a changé. C'est à présent *Escherichia coli* qui est le plus souvent trouvée productrice de BLSE (57,5 % de l'ensemble des bactéries productrices de BLSE en 2013). Ce changement est dû principalement à la diffusion du gène CTX-M chez cette espèce. Pour cette raison, nous nous intéresserons aux données de prévalence concernant *Escherichia coli*. (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA), 2015)

Le rapport de l'ECDC présente les prévalences en Europe de la résistance aux céphalosporines de troisième génération chez *Escherichia coli* en 2014, à partir de prélèvements sanguins ou de liquide céphalo-rachidien (voir figure 18). La moyenne en Europe est de 12,0 %, avec des prévalences allant de 3,3 % en Islande à 40,4 % en Bulgarie. Dans la majorité des pays, plus de 90 % de ces bactéries résistantes étaient productrices de BLSE. (ECDC, 2015)

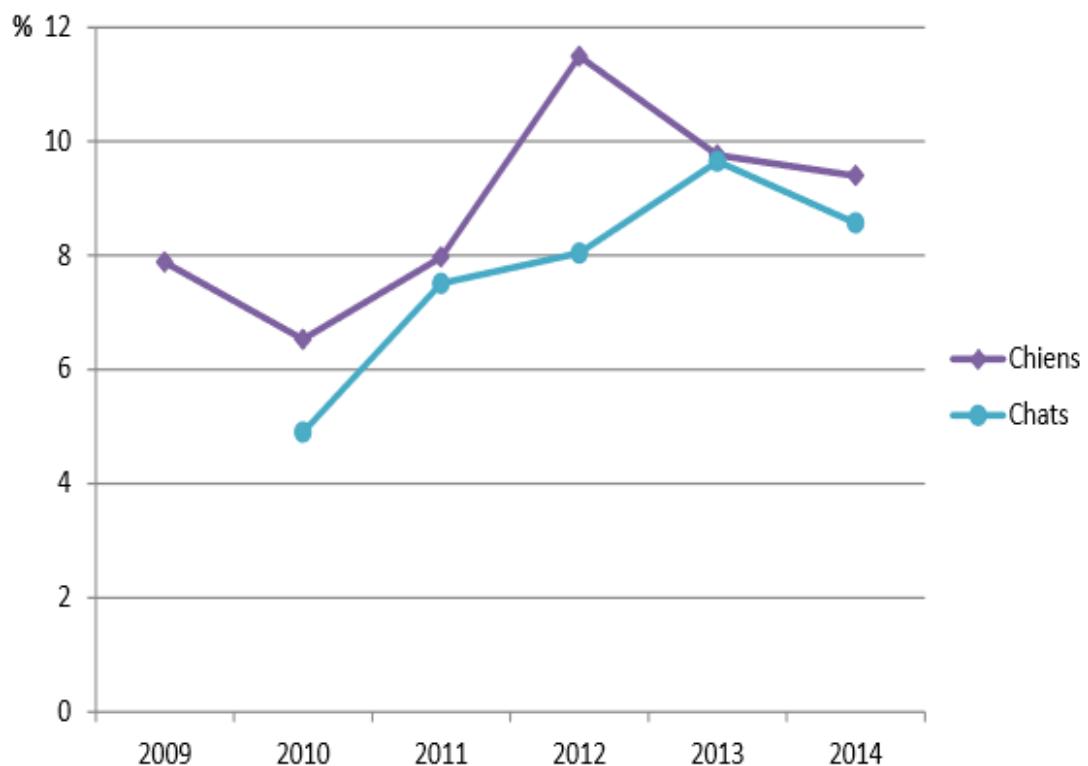
En France, d'après les données de l'ECDC sur l'année 2014, la prévalence de la résistance aux céphalosporines de troisième génération est de 9,9 % et 78,5 % de ces bactéries sont productrices de BLSE. (ECDC, 2015) Cette prévalence augmente progressivement au cours des années, en corrélation avec la diffusion de BLSE, notamment du gène CTX-M.

Chez nos carnivores domestiques, le réseau Resapath a publié son dernier rapport en novembre 2015, dans lequel il présente les données de l'année 2014 à partir de 7002 antibiogrammes de chiens et 1926 antibiogrammes de chats. Une baisse de la prévalence de souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération chez le chien et chez le chat est observée, et ce pour la deuxième année consécutive chez le chien (voir figure 19). La prévalence reste néanmoins assez voisine de celle trouvée chez l'Homme. Une confirmation de cette tendance à la baisse est attendue dans les prochaines années. (Jarrige et al., 2015)

*Figure 18 : Prévalence de la résistance aux céphalosporines de troisième génération chez Escherichia coli dans les différents pays d'Europe en 2014, à partir de prélèvements sanguins et de liquides céphalo-rachidiens (ECDC, 2015)*



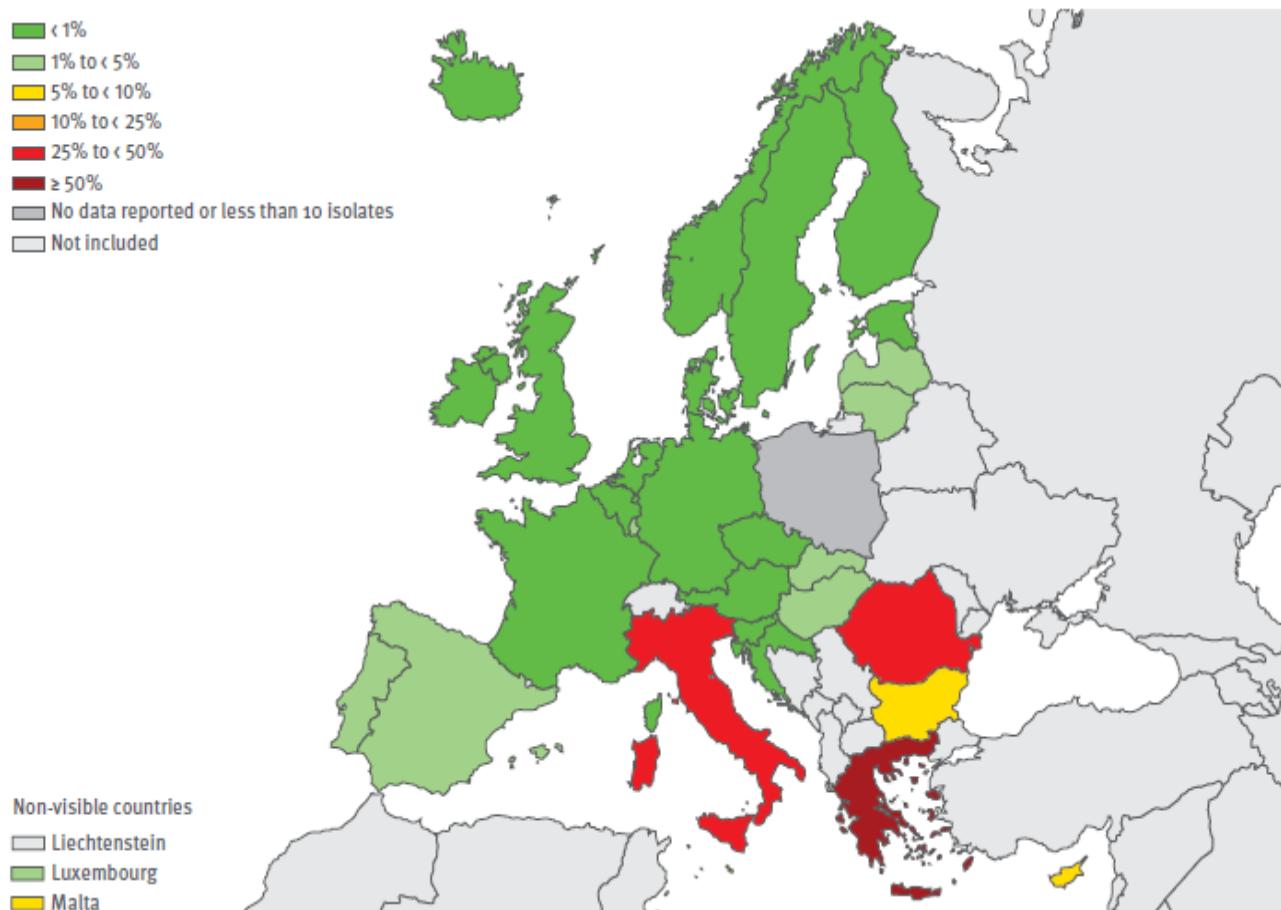
*Figure 19 : Évolution des proportions de souches d'Escherichia coli non-sensibles au ceftiofur (I+R) chez les carnivores domestiques (2009-2014) (Jarrige et al., 2015)*



### II.C.3. Etat actuel des résistances aux carbapénèmes

Les carbapénémases sont de plus en plus répandues en Europe. La prévalence de la résistance aux carbapénèmes chez *Escherichia coli* reste faible, inférieure à 1 % depuis 2011 dans tous les pays d'Europe, sauf une prévalence de 1,2 % en Grèce. La situation est beaucoup plus préoccupante chez *Klebsiella pneumoniae* où on atteint des prévalences de résistance très élevées en Italie (32,9%), en Roumanie (31,5%) et en Grèce (62,3%). (ECDC, 2015)

*Figure 20 : Prévalence de la résistance aux carbapénèmes chez Klebsiella pneumoniae dans les différents pays d'Europe en 2014, à partir de prélèvements sanguins et de liquides céphalo-rachidiens (ECDC, 2015)*



L'usage des carbapénèmes étant strictement réservé à la médecine hospitalière humaine, peu d'observateurs s'attendaient à identifier des gènes de résistance à ces antibiotiques chez l'animal. Cependant, la présence de carbapénémases chez l'animal a été décrite dans plusieurs cas, aussi bien en élevage (avec l'exemple de souche d'*Escherichia coli* productrice de VIM-1 dans un élevage de porcs allemands en mars 2012) que chez nos carnivores domestiques (enzyme NDM-1 retrouvée chez une souche d'*Escherichia coli* de chien aux Etats-Unis en juin 2013). L'émergence de ces résistances chez l'animal est surveillée car elle pourrait représenter un risque pour l'Homme. Certaines carbapénémases multirésistantes, notamment VIM-1, peuvent être co-sélectionnées une fois présentes chez l'animal, par l'usage d'anciennes molécules antibiotiques vétérinaires comme la tétracycline. (Madec, 2013)

### **III. CONCLUSION ET PROJET DE THÈSE**

Pendant de nombreuses années, la découverte successive de nouveaux antibiotiques a occulté le problème de l'antibiorésistance. Aujourd'hui, les nouvelles molécules sont rares et la maîtrise de la résistance aux antibiotiques est devenue un enjeu majeur de santé publique. L'antibiorésistance se développe aussi bien dans le réservoir humain qu'animal, il est donc clair que des efforts pour réduire la consommation d'antibiotiques doivent être faits aussi bien chez les médecins que chez les vétérinaires. Le passage animal – Homme de bactéries résistantes est quantitativement faible à ce jour, et repose en grande partie sur des infections alimentaires et des expositions professionnelles. La vraie question concerne maintenant la partie invisible des transferts : la dissémination de la résistance par des plasmides, au travers de la flore commensale, sans être associée à un tableau clinique d'un phénomène infectieux. Les préoccupations se portent notamment sur la diffusion importante de plasmides porteurs de gènes BLSE parmi les entérobactéries, ainsi que l'augmentation des carbapénémases et leur émergence chez les animaux. Concernant les gènes BLSE, les données présentées par le réseau Résopath donnent une bonne estimation de leur prévalence chez les chiens et les chats malades. Ces données proviennent d'isolats bactériens dits « cliniques », c'est-à-dire prélevés chez un animal malade et à partir d'un organe relié à la maladie. Il est raisonnable de penser que les souches isolées dans ce contexte puissent présenter des niveaux de résistance élevés, en lien avec l'administration récente d'un antibiotique. Afin d'avoir une meilleure idée de l'étendue de la diffusion des gènes BLSE parmi nos carnivores domestiques, une étude de la prévalence du portage de ces gènes, c'est à dire la recherche de souches antibiorésistantes chez les animaux sains, est plus appropriée. Ce type d'étude est rare, on peut noter cependant une étude effectuée en 2011 sur 368 chiens, admis en consultation pour d'autres causes qu'une maladie bactérienne dans une clinique de références à Paris. Cette étude a montré une prévalence de 18,5 % de *Escherichia coli* résistante aux céphalosporines de troisième génération. (Haenni et al., 2014) Ce taux élevé peut être expliqué par le fait que la clinique accueille de nombreux cas références, ce qui peut suggérer que ces chiens aient reçu des traitements antibiotiques préalables dans d'autres cabinets vétérinaires. La question du portage de plasmides d'antibiorésistance par nos carnivores domestiques mérite donc d'être approfondie par de nouvelles études.

Cette thèse présente l'étude du portage de l'antibiorésistance parmi la flore commensale digestive des chiens et des chats. Un premier objectif est d'établir les prévalences du portage des résistances aux céphalosporines de troisième génération et des résistances aux carbapénèmes dans la population des chats et des chiens de la région parisienne. Ensuite, nous essayerons de mettre en évidence des facteurs de risque à l'apparition de ces résistances, en étudiant l'historique médical de l'animal, mais aussi du propriétaire dans le cadre d'un transfert Homme – animal.

# **DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**

## **I. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **I.A. Technique de prélèvement**

#### **I.A.1. Animaux inclus dans l'étude**

Tous les animaux participants à l'étude ont été prélevés par écouvillons rectaux après obtention d'un consentement de leur propriétaire. Les chiens inclus dans l'étude étaient présentés au CHUVA au service de médecine préventive pour vaccination. Les chats inclus dans l'étude étaient présentés au CHUVA au service de chirurgie de convenance (castration et stérilisation). Le prélèvement pouvait ainsi se faire durant l'anesthésie générale. Les animaux dont l'état général était dégradé ou sous traitement antibiotique ont été exclus de l'étude.

#### **I.A.2. Mise en place du questionnaire**

Chaque prélèvement s'accompagnait d'un questionnaire détaillé à remplir par le propriétaire de l'animal. Ce questionnaire (voir Annexe) nous permettait d'avoir des informations sur :

- l'état de santé actuel de l'animal et l'existence d'un traitement par des antibiotiques.
- les antécédents d'infections et d'hospitalisations de l'animal durant les douze mois précédents le prélèvement, et les traitements antibiotiques associés.
- le contact avec le milieu hospitalier du propriétaire et de son entourage
- les antécédents de voyages du propriétaire durant les douze mois précédents le prélèvement et leurs destinations.
- les antécédents d'infections et d'hospitalisations du propriétaire durant les douze mois précédents le prélèvement, et les traitements antibiotiques associés.

Les propriétaires ne se souvenant pas toujours du nom des traitements antibiotiques, si les animaux étaient entièrement suivis au CHUVA, leur dossier était étudié afin d'avoir des informations exactes.

#### **I.A.3. Prélèvement des échantillons**

Les échantillons étaient prélevés par écouvillons rectaux. Ces écouvillons ont été effectués vigile sur les chiens, et sous anesthésie générale sur les chats afin de garantir un maximum de sécurité pour la personne effectuant le prélèvement.

Les écouvillons utilisés étaient des écouvillons doubles COPAN. Ils sont stériles et sont associés à un milieu de transport : le Amies gélosé (composé de chlorure de sodium, chlorure de potassium, chlorure de calcium, chlorure de magnésium, phosphate monopotassique, phosphate disodique, thioglycholate de sodium, eau distillée). Ce milieu de transport permet la viabilité des germes aérobies et anaérobies pendant 48h à température ambiante, 4°C à 21°C (Standard M40) (“Fiche technique écouvillons COPAN,” n.d.)

*Figure 21 : Écouvillon double COPAN*



## I.B. Détection phénotypique par milieux de culture sélectifs

Chaque prélèvement a été ensemencé sur deux géloses : une gélose chromID ESBL (fournisseur : Biomérieux, France) et une gélose chromID CARBA SMART (fournisseur : Biomérieux, France), puis mis en culture 48 heures dans une étuve à 37°C. Un écouvillon était utilisé pour la gélose BLSE, l'autre pour la gélose CARBA SMART en ensemencant d'abord le compartiment CARB, puis le compartiment OXA en retournant l'écouvillon de 180°.

La gélose chromID ESBL est un milieu chromogène sélectif destiné au dépistage des entérobactéries productrices de BLSE. Elle est constituée d'une base nutritive riche associant différentes peptones. Elle contient :

- un mélange d'antibiotiques, dont le cefpodoxime, permettant la croissance sélective des entérobactéries productrices de BLSE. Les entérobactéries productrices de CHN peuvent aussi pousser sur ces géloses.
- deux substrats chromogènes et un substrat naturel permettant l'identification directe des entérobactéries productrices de BLSE les plus fréquemment isolées :
  - *Escherichia coli* : coloration spontanée (rose à bordeaux) des souches productrices de  $\beta$ -glucuronidase.
  - *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* : coloration spontanée verte, brun-vert ou bleue des souches exprimant une  $\beta$ -glucosidase.
  - *Proteae (Proteus, Providencia, Morganella)* : coloration spontanée brune à marron des souches exprimant une désaminase. (Biomérieux, 2010)

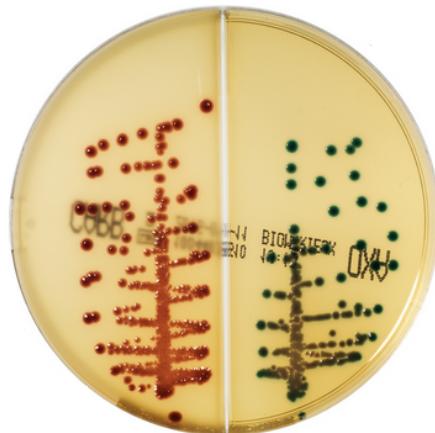
Figure 22 : Échantillon 181 - illustration d'une croissance de E.coli BLSE



La gélose chromID CARBA SMART est composée de deux milieux de culture chromogènes sélectifs répartis dans une même boîte de Petri compartimentée (CARB/OXA). Elle est destinée au dépistage des entérobactéries productrices de carbapénémases. Elle est constituée d'une base nutritive riche associant différentes peptones. Elle contient :

- un mélange d'antibiotiques permettant la croissance sélective des bactéries exprimant :
- des carbapénémases de type KPC et metallocarbapénémase, principalement, pour le milieu CARB.
- des carbapénémases de type OXA-48 pour le milieu OXA.
  
- trois substrats chromogènes permettant d'identifier les bactéries exprimant des carbapénémases les plus fréquemment isolées :
  - *Escherichia coli* : coloration spontanée (rose à bordeaux) des souches productrices de  $\beta$ -glucuronidase ou  $\beta$ -galactosidase.
  - *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter* : coloration spontanée bleu-vert à bleu-gris ou violette des souches exprimant une  $\beta$ -glucosidase. (Biomérieux, 2013)

Figure 23 : Illustration d'une croissance de *E.coli* KPC (à gauche) et de *Klebsiella* OXA-48 (à droite) (“bioMérieux - Culture Media | product - chromIDTM CARBA SMART,” n.d.)



Ces géloses sélectives présentent une bonne sensibilité et une bonne spécificité. La gélose BLSE présente à 48h une sensibilité de 94 % et une spécificité de 90,5 % (Réglier-Poupet et al., 2008). La double gélose CARBA-SMART présente à 24h une sensibilité combinée (c'est à dire en ensemençant sur les deux géloses) de 95,9 % et une spécificité combinée de 96,6 % (Biomérieux, 2013).

Le laboratoire de l'ENVA n'utilisant pas fréquemment ces géloses, il a été décidé d'envoyer à l'ANSES de Lyon toutes les géloses sur lesquelles une croissance bactérienne était visible afin qu'elles puissent être interprétées par un personnel ayant l'habitude de l'utilisation de ces géloses. Beaucoup de souches bactériennes ont été envoyées alors qu'elles n'étaient pas positives. Il s'agit de souches bactériennes pouvant pousser sur les géloses sélectives par des mécanismes de résistance naturelle, qui ne prennent alors aucune coloration sur les géloses. C'est notamment le cas des *Pseudomonas*, qui poussent bien sur les boîtes BLSE et CARBA-SMART. La première étape au laboratoire de l'ANSES a donc été d'identifier les « vrais positifs ».

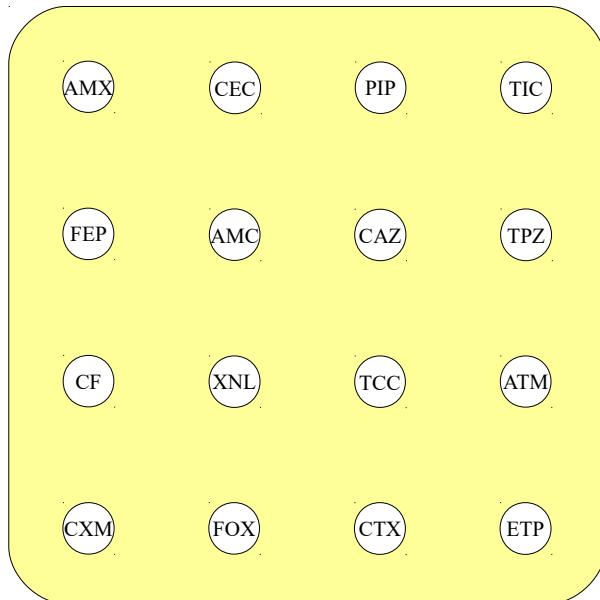
## I.C. Analyse au laboratoire de l'ANSES de Lyon

### I.C.1. Antibiogramme

Pour chaque souche étudiée, une identification est menée grâce à un spectromètre de masse MALDI-TOF. Dans le processus, l'échantillon à analyser est mélangé avec une substance dénommée « matrice ». Le mélange est déposé sur une lame qui est placée dans l'instrument et illuminée par un laser. La matrice absorbe la lumière du laser, s'évapore avec l'échantillon, et gagne au passage une charge électrique (ionisation). Les champs électriques guident les ions dans le spectromètre de masse qui les séparera en fonction de leur masse et donnera des résultats sous forme d'une série de pics (spectre) correspondant aux différents fragments issus de la molécule originale. L'appareil compare alors le spectre de l'échantillon avec une banque de spectres incluant un grand nombre de bactéries enregistrées pour permettre une identification précise de la bactérie présente.

Une fois les « vrais positifs » déterminés, un antibiogramme est réalisé sur chaque souche. Les souches sont ensemencées sur une gélose de type Müller-Hinton (milieu de culture adapté à la réalisation d'antibiogramme), puis les disques contenant différents antibiotiques sont ajoutés sur la gélose. La répartition des différents disques est indiquée sur la figure 24.

Figure 24 : Répartition des disques sur l'antibiogramme



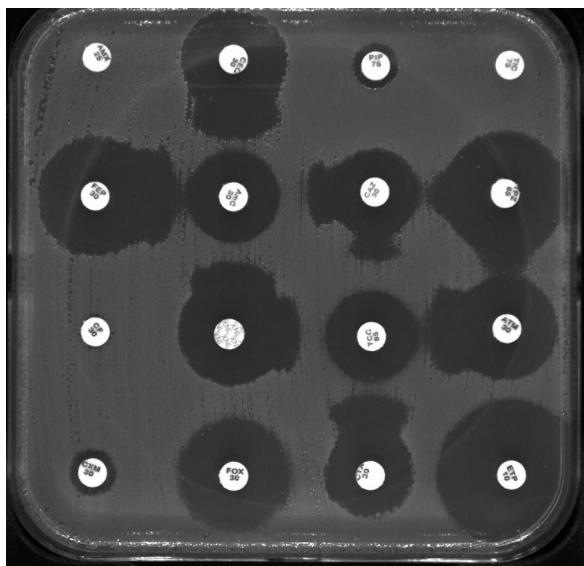
Légende :

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| AMX : Amoxicilline<br>(aminopénicilline) | CEC : Céfaclor (C1G)   | PIP : Pipéracilline<br>(uréidopénicilline)   | TIC : Ticarcilline<br>(carboxypénicilline)   |
| FEP : Céfèpime (C3G)                     | AMC : Amoxicilline +<br>Acide clavulanique<br>(aminopénicilline +<br>inhibiteur des<br>bétalactamases) | CAZ : Ceftazidime (C3G)  | TPZ : Pipéracilline +<br>tazobactam<br>(uréidopénicilline +<br>inhibiteur des<br>bétalactamases) |
| CF : Céfalotine (C3G)                    | XNL : Ceftiofur (C3G)  | TCC : Ticarcilline + acide<br>clavulanique<br>(carboxypénicilline +<br>inhibiteur des<br>bétalactamases) | ATM : Aztréonam<br>(monobactame)   |
| CXM : Céfuroxime (C2G)                   | FOX : Céfoxitine (C2G)   | CTX : Céfotaxime (C3G)   | ETP : Ertapénème<br>(carbapénème)  |

À l'aide de ces antibiogrammes, trois phénotypes de résistance sont différenciés : BLSE, CHN et une carbapénémase, aussi appelée ertA-R.

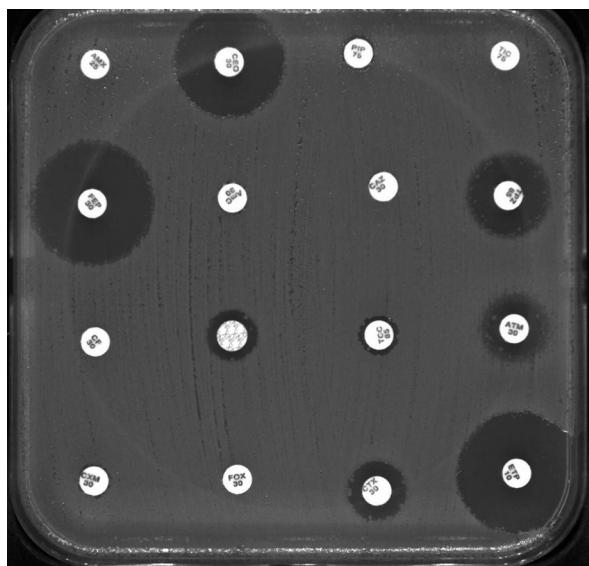
La production de BLSE est mise en évidence par la présence d'une réaction de synergie entre un disque imprégné d'inhibiteur de bétalactamases et un disque imprégné d'une céphalosporine, notamment de troisième et quatrième génération. Cette réaction se manifeste par une image dite « en bouchon de champagne » sur l'antibiogramme, comme le montre la figure 25.

*Figure 25 : Profil de résistance BLSE  
(photographie réalisée par le laboratoire de l'ANSES de Lyon)*



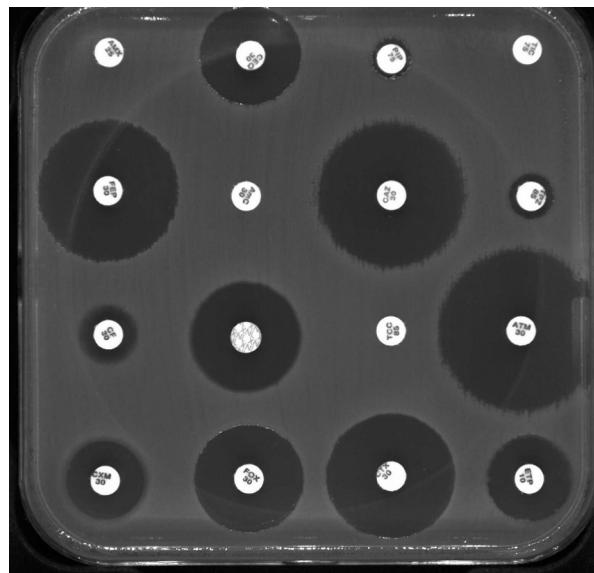
La résistance seule aux céphalosporines de dernière génération sur l'antibiogramme n'est pas suffisante pour parler de BLSE, il peut s'agir aussi de céphalosporinases non BLSE, notamment les CHN. Celles-ci sont insensibles aux inhibiteurs de bétalactamase et ne produiront pas d'image de synergie. Elles sont caractérisées par une résistance à l'aztreonam, aux céphamycines et aux céphalosporines de troisième génération, comme le montre la figure 26.

*Figure 26 : Profil de résistance CHN  
(photographie réalisée par le laboratoire de l'ANSES de Lyon)*



Enfin, les carbapénèmases sont caractérisées par leur résistance à l'ertapénème. Le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité. L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des carbapénèmases, ainsi toute souche possédant une diminution de sensibilité à l'ertapénème (CMI supérieure à 0,5 mg/L ou un diamètre d'inhibition inférieur à 25 mm) est à considérer comme suspecte de carbapénèmases. (CA-SFM, 2015) La figure 27 montre une souche résistante à l'ertapénème.

*Figure 27 : Profil de résistance ertaR  
(photographie réalisée par le laboratoire de l'ANSES de Lyon)*



### I.C.2. Détection moléculaire

Pour chaque souche bactérienne étudiée, nous avons recherché l'enzyme à l'origine de la résistance. Les enzymes de résistance les plus courantes sont recherchées, c'est à dire :

- pour les BLSE : CTX-M et SHV
- pour les CHN : CMY
- pour les carbapénèmases : KPC, OXA-48 et NDM

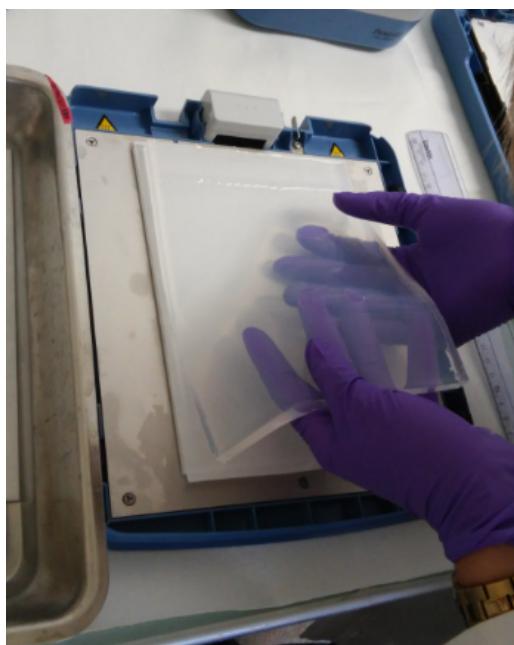
Pour cela, le gène codant pour l'enzyme est recherché par la technique de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR). Cette technique consiste à faire subir des cycles de changement de température à une solution contenant l'ADN bactérien étudié, une Taq polymérase, les amorces spécifiques du fragment d'ADN que l'on veut amplifier, et un mélange contenant les nucléotides nécessaires à la polymérisation. La PCR comprend une trentaine de cycles, chacun constitué de trois phases :

1) la dénaturation : la solution est chauffée (95°C) afin de dénaturer la double hélice de l'ADN bactérien. Les deux brins d'ADN sont séparés.

2) l'hybridation : la température est abaissée (entre 50°C et 60°C selon l'amorce utilisée) afin de permettre à l'amorce de s'associer, mais pas suffisamment pour que les deux brins d'ADN se réassocient entre eux.

3) l'élargissement : la température de la solution est à nouveau augmentée ( $72^{\circ}\text{C}$ ) afin d'activer la Taq polymérase, qui va alors amplifier les fragments d'ADN.

*Figure 28 : Mise en place d'une électrophorèse  
Photo prise lors de mon stage au laboratoire de  
l'ANSES de Lyon*



Suite à cette PCR, les produits de l'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel. Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur. Du bromure d'éthidium est utilisé pour la révélation du résultat.

## I.D. Analyse statistique

### I.D.1. Étude descriptive : études de prévalences

Une analyse descriptive est d'abord réalisée sur les deux échantillons. Les prévalences du portage de bactéries résistantes aux céphalosporines et aux carbapénèmes sont calculées, ainsi que leur intervalle de confiance.

### I.D.2. Étude analytique : recherche d'éventuels facteurs de risque

Dans les deux échantillons une étude exploratoire est réalisée afin de chercher des facteurs de risques à avoir un animal porteur de résistance. Plusieurs caractères sont testés :

- L'animal a eu une infection au cours des 12 derniers mois.
- L'animal a été hospitalisé au cours des 12 derniers mois.
- Le propriétaire ou une personne de son entourage est en contact avec le milieu hospitalier.
- Le propriétaire ou une personne de son entourage a voyagé dans les 12 derniers mois.
- Le propriétaire ou une personne de son entourage a été hospitalisé dans les 12 derniers mois.
- Le propriétaire ou une personne de son entourage a eu une infection dans les 12 derniers mois.

Étant donné que six caractères sont testés sur le même échantillon, le risque de première espèce  $\alpha$  est supérieur à 5 %.

Compte-tenu de la faiblesse des effectifs, les résultats ont été analysés au moyen du test exact de Fisher.

## **II. RÉSULTATS**

### **II.A. Effectifs**

Les prélèvements sur les chats ont été effectués de mars 2015 à juillet 2015, sur un total de 227 chats sains. Les chats de notre échantillon ont entre 6 mois et 9 ans, avec une médiane de 10 mois. Il y a 91 % de chats européens, équitablement répartis entre les mâles et les femelles (48 % de mâles et 52 % de femelles).

Les prélèvements sur les chiens ont été effectués de mars 2015 à novembre 2015, sur un total de 166 chiens sains. Les chiens de notre échantillon ont entre 6 mois et 16 ans, avec une médiane de 4 ans. Ils sont de races variées, équitablement répartis entre les mâles et les femelles (49 % de mâles et 51 % de femelles).

### **II.B. Résultats épidémiologiques**

Les questions du questionnaires ont obtenu un taux de réponses satisfaisant : entre 82 % et 100 % de réponses selon la question.

Les questions concernant le type d'antibiotique reçu par l'animal ou le propriétaire ont cependant souvent été incomplètes : le propriétaire ne se souvient plus s'il y a eu un traitement antibiotique ou ne se souvient plus du nom de l'antibiotique. Concernant les chats, les informations étaient incomplètes dans 41 % des chats ayant eu une infection (9 sur 22) et dans 50 % des chats ayant été hospitalisés (4 sur 8). Concernant les chiens, les informations étaient incomplètes dans 25 % des chiens ayant eu une infection (9 sur 36) et dans 10 % des chiens ayant été hospitalisés (2 sur 21). Parmi les propriétaires (chiens et chats confondus), 93 % des personnes savent s'ils ont été traités par un antibiotique (132 sur 142), mais seul 27 % se souviennent du nom de cet antibiotique (16 sur 60).

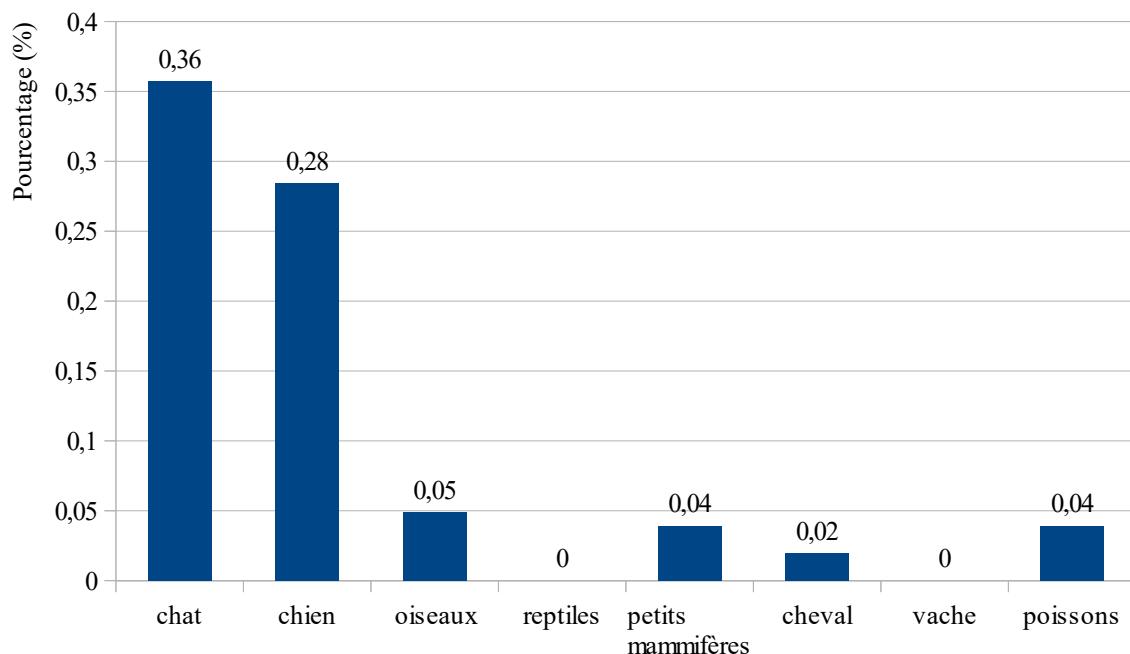
#### **II.B.1. Questionnaire sur les chats**

- Possession d'un autre animal (224 réponses soit 98,7%) :

122 personnes soit 54,5 % ne possèdent pas d'autre animal.

102 personnes soit 45,5 % possèdent un ou plusieurs autres animaux.

*Figure 29 : Répartition en pourcentage des autres animaux possédés par les propriétaires dans l'échantillon de chats*

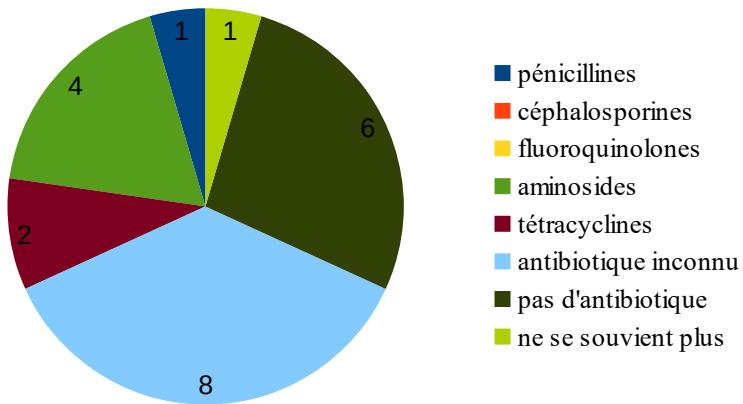


- Infections de l'animal au cours des 12 derniers mois (223 réponses soit 98,2%) :

201 chats soit 90,1 % n'ont pas eu d'infection durant les 12 derniers mois.

22 chats soit 9,9 % ont déclaré une infection au cours des 12 derniers mois, dont 15 ont été traités par antibiotique soit 68,2 %.

*Figure 30 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'infection dans l'échantillon de chats*

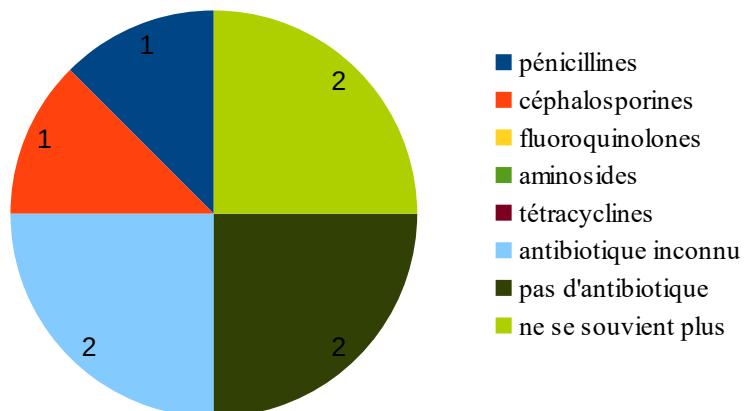


- Hospitalisations de l'animal au cours des 12 derniers mois (225 réponses soit 99,1%) :

217 chats soit 96,4 % n'ont pas été hospitalisés durant les 12 derniers mois.

8 chats soit 3,6 % ont été hospitalisés au cours des 12 derniers mois, dont 4 ont été traités par antibiotiques soit 50 %.

Figure 31 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'hospitalisation dans l'échantillon de chats



- Contact du propriétaire ou d'une personne de son entourage avec le milieu hospitalier (213 réponses soit 90,6%) :

159 personnes soit 74,6 % ne sont pas en contact avec le milieu hospitalier

54 personnes soit 25,4 % sont en contact avec le milieu hospitalier. Parmi eux, 19 soit 35 % travaillent en milieu hospitalier, 36 soit 66 % ont une personne de l'entourage qui travaille en milieu hospitalier, et 6 soit 11 % effectuent des soins à domicile.

- Voyage du propriétaire ou d'une personne de son entourage durant les 12 derniers mois (217 réponses soit 92,3%) :

116 personnes soit 53,5 % n'ont pas voyagé.

101 personnes soit 46,5 % ont voyagé, dont une personne hospitalisée en service de médecine durant son séjour.

- Hospitalisation du propriétaire ou d'une personne de son entourage durant les 12 derniers mois (208 réponses soit 88,51%) :

162 personnes soit 77,9 % n'ont pas été hospitalisées durant les 12 derniers mois.

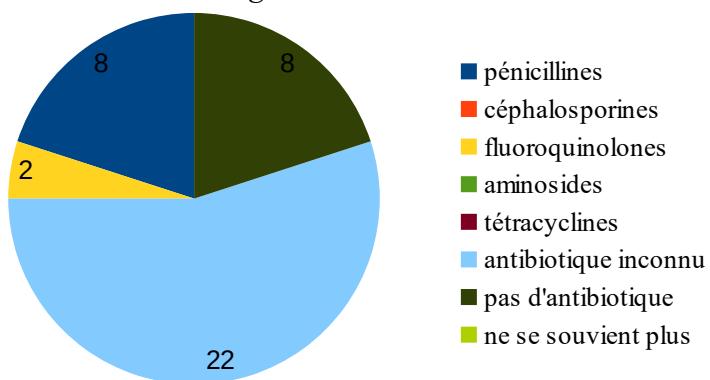
46 personnes soit 21,1 % ont été hospitalisées au cours des 12 derniers mois, dont 4 ont déclaré avoir reçu des antibiotiques soit 8,7 %. Aucun ne se souvient du nom de l'antibiotique.

- Infection du propriétaire ou d'une personne de son entourage durant les 12 derniers mois (193 réponses soit 82,1%)

151 personnes soit 78,2 % n'ont pas eu d'infection durant les 12 derniers mois

42 personnes soit 21,8 % ont déclaré une infection au cours des 12 derniers mois, dont 33 ont déclaré avoir été traité par antibiotique soit 78,6 %.

*Figure 32 : Répartition des traitements antibiotiques lors d'infection du propriétaire ou d'un personne de son entourage, dans l'échantillon de chats*



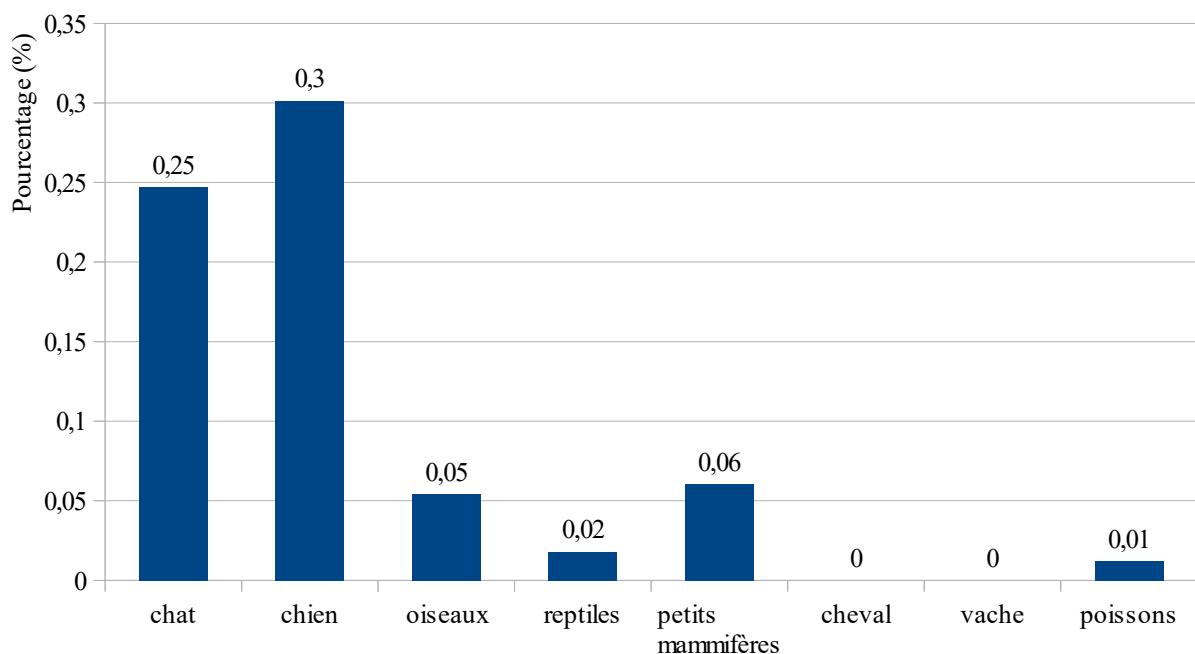
## II.B.2. Questionnaire sur les chiens

- Possession d'un autre animal (159 réponses soit 95,8%) :

75 personnes soit 47,2 % ne possèdent pas d'autre animal.

84 personnes soit 52,8 % possèdent un ou plusieurs autres animaux.

*Figure 33 : Répartition en pourcentage des autres animaux possédés par les propriétaires dans l'échantillon de chiens*

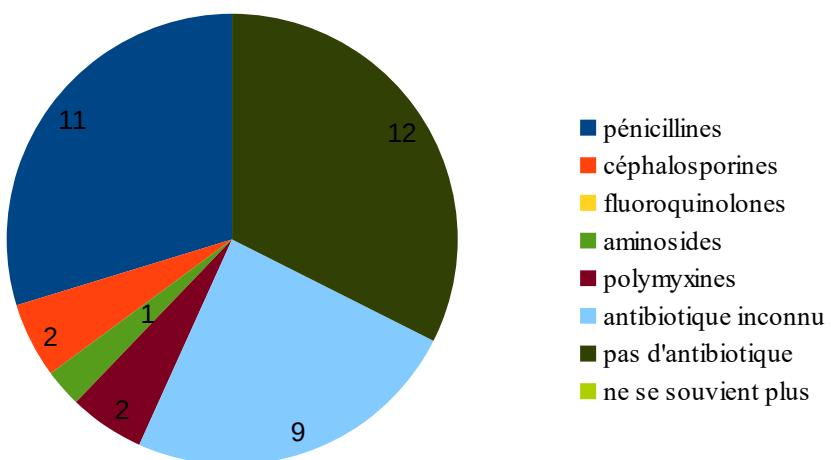


- Infections de l'animal au cours des 12 derniers mois (161 réponses soit 97,0 %) :

125 chiens soit 77,6 % n'ont pas eu d'infection durant les 12 derniers mois.

36 chiens soit 22,3 % ont déclaré une infection au cours des 12 derniers mois, dont 26 ont été traités par antibiotique soit 72,2 %.

Figure 34 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'infection dans l'échantillon de chiens

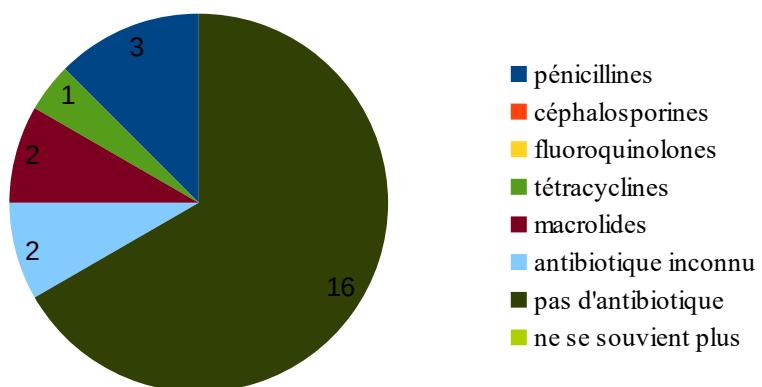


- Hospitalisations de l'animal au cours des 12 derniers mois (160 réponses soit 96,4%) :

139 chiens soit 83,7 % n'ont pas été hospitalisés durant les 12 derniers mois.

21 chiens soit 12,6 % ont été hospitalisés au cours des 12 derniers mois, dont 8 ont été traités par antibiotiques soit 38 %.

Figure 35 : Répartition des traitements antibiotiques donnés lors d'hospitalisation dans l'échantillon de chiens



- Contact du propriétaire ou d'une personne de son entourage avec le milieu hospitalier (154 réponses soit 92,8%) :

111 personnes soit 72,1 % ne sont pas en contact avec le milieu hospitalier.

43 personnes soit 27,9 % sont en contact avec le milieu hospitalier. Parmi eux, 23 soit 53 % travaillent en milieu hospitalier, 33 soit 77 % ont une personne de l'entourage qui travaille en milieu hospitalier, et aucun n'effectue des soins à domicile.

- Voyage du propriétaire ou d'une personne de son entourage durant les 12 derniers mois (157 réponses soit 94,6%) :

71 personnes soit 45,2 % n'ont pas voyagé

86 personnes soit 54,8 % ont voyagé, dont 2 personnes hospitalisés durant leur séjour.

- Hospitalisation du propriétaire ou d'une personne de son entourage durant les 12 derniers mois (140 réponses soit 84,3%) :

106 soit 75,7 % n'ont pas été hospitalisées

34 soit 24,3 % ont été hospitalisées, dont 9 ont déclaré avoir reçu des antibiotiques soit 26,5 %. Seuls 2 personnes se souviennent du nom de leur traitement : pénicillines et imidazolés.

- Infection du propriétaire ou d'une personne de son entourage durant les 12 derniers mois (140 réponses soit 84,3%)

133 personnes soit 80,7 % n'ont pas eu d'infections durant les 12 derniers mois.

27 personnes soit 19,3 % ont déclaré une infection au cours des 12 derniers mois, dont 14 ont déclaré avoir été traitée par antibiotique soit 51,9 %. Seuls 3 personnes se souviennent du nom de leur traitement : pénicillines.

## II.C. Résultats descriptifs

### II.C.1. Prévalences des résistances sur la population des chats

Les cultures à partir des prélèvements de chats se sont révélées positives sur 10 géloses BLSE, 7 géloses CARB et 3 géloses OXA positives.

Après envoi et analyse à l'ANSES, seules trois souches d'*Escherichia coli* ont pu être identifiées porteuses de BLSE. Les résistances sont dues à des enzymes de type CTX-M. (voir tableau 5). Les autres souches étaient des souches bactériennes pouvant pousser sur les géloses sélectives par des mécanismes de résistance naturelle.

*Tableau 5 : Résultats des prélèvements sur les chats*

| Numéro | Identification Clovis | BLSE | CARB | OXA | BLSE                           | CARB | OXA |
|--------|-----------------------|------|------|-----|--------------------------------|------|-----|
| 7      | A14-11793             | -    | -    | +   | -                              | -    | -   |
| 23     | A15-1067              | +    | +    | -   | -                              | -    | -   |
| 31     | A14-13910             | -    | +    | -   | -                              | -    | -   |
| 43     | A14-14618             | +    | -    | -   | E.coli BLSE<br>Gène non trouvé | -    | -   |
| 140    | A15-5792              | +    | +    | -   | -                              | -    | -   |
| 143    | A15-5793              | +    | -    | -   | -                              | -    | -   |
| 147    | A15-5859              | +    | +    | +   | -                              | -    | -   |
| 148    | A15-5863              | +    | +    | +   | -                              | -    | -   |
| 174    | A15-6647              | +    | +    | -   | -                              | -    | -   |
| 181    | A15-6802              | +    | -    | -   | E.coli BLSE<br>CTX-M-14        | -    | -   |
| 253    | A15-4826              | +    | +    | -   | -                              | -    | -   |
| 286    | A15-8499              | +    | -    | -   | E.coli BLSE<br>CTX-M-15        | -    | -   |

Dans notre échantillon de chats, nous avons 1,3 % d'*E.coli* BLSE. Ainsi, dans l'hypothèse d'absence de biais, la prévalence des chats porteurs d'*E.coli* BLSE a 95 % de chance d'être comprise entre 0,3 % et 3,8 %.

### **II.C.2. Prévalences des résistances sur la population des chiens**

Les cultures à partir des prélèvements de chiens se sont révélées positives sur 20 géloses BLSE, 5 géloses CARB et 3 géloses OXA.

Après envoi et analyse à l'ANSES, quatre souches porteuses de résistances d'intérêt ont été identifiées : une souche d'*Escherichia coli* porteuse de BLSE, deux souches d'*Escherichia coli* porteuses de CHN et une souche d'*Escherichia coli* résistante aux carbapénèmes (ertaR). Les résistances sont dues à des enzymes de type CMY pour les CHN, CTX-M pour la BLSE et OXA-48 pour la carbapénémase. (voir tableau 6). Les autres souches étaient des souches bactériennes pouvant pousser sur les géloses sélectives par des mécanismes de résistance naturelle.

*Tableau 6 : Résultats des prélèvements sur les chiens*

| Boites envoyées |                       | Résultat sur les boites |      |     | Résultat ANSES          |      |                        |
|-----------------|-----------------------|-------------------------|------|-----|-------------------------|------|------------------------|
| Numéro          | Identification Clovis | BLSE                    | CARB | OXA | BLSE                    | CARB | OXA                    |
| 24              | A15-2020              | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 52              | A12-7046              | +                       | +    | -   | -                       | -    | -                      |
| 53              | A12-7044              | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 74              | A12-15311             | +                       | -    | -   | E.coli CHN<br>CMY-2     | -    | -                      |
| 85              | A12-8449              | -                       | -    | +   | -                       | -    | E.coli ertaR<br>Oxa-48 |
| 88              | A15-4284              | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 108             | A14-7437              | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 111             | A05-2835              | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 205             | A11-319               | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 303             | A15-12346             | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 311             | A04-13146             | -                       | -    | +   | -                       | -    | -                      |
| 322             | A11-12318             | +                       | +    | -   | -                       | -    | -                      |
| 324             | A11-15019             | +                       | -    | -   | E.coli BLSE<br>CTX-M-15 | -    | -                      |
| 362             | A15-13222             | +                       | +    | -   | -                       | -    | -                      |
| 363             | A15-1800              | +                       | +    | -   | -                       | -    | -                      |
| 368             | A14-3184              | +                       | -    | -   | E.coli CHN<br>CMY-2     | -    | -                      |
| 374             | A08-11809             | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 376             | A15-13400             | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 383             | A15-13451             | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 394             | A14-14519             | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 396             | A15-13667             | +                       | -    | -   | -                       | -    | -                      |
| 404             | A14-13960             | +                       | +    | +   | -                       | -    | -                      |

Dans notre échantillon de chiens, nous avons 1,8 % de *E.coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération (BLSE ou CHN) et 0,6 % de *E.coli* résistantes aux carbapénèmes. Ainsi, dans l'hypothèse d'absence de biais, la prévalence des chiens porteurs d'*E.coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération (BLSE ou CHN) a 95 % de chance d'être comprise entre 0,4 % et 5,2 % et la prévalence des chiens porteurs d'*E.coli* résistante aux carbapénèmes a 95 % de chance d'être comprise entre 0 % et 3,3 %.

## II.D. Résultats analytiques

### II.D.1. Étude exploratoire chez les chats

Nous avons étudié l'influence des différentes expositions sur la probabilité que l'animal soit porteur d'*E.coli* BLSE.

*Tableau 7 : Calcul des OR bruts sur les différentes expositions chez les chats*

| Exposition  | OR brut | p<br>(Fisher exact) |
|---|---------|---------------------|
| L'animal a eu une infection au cours des 12 derniers mois                                     | 4,73    | 0,26                |
| L'animal a été hospitalisé au cours des 12 derniers mois                                      | 15,3    | 0,1                 |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage est en contact avec le milieu hospitalier    | (a)     |                     |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage a voyagé dans les 12 derniers mois           | (a)     |                     |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage a été hospitalisé dans les 12 derniers mois  | (a)     |                     |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage a eu une infection dans les 12 derniers mois | (a)     |                     |

(a) : OR impossible à calculer, le faible effectif de positif créant des cases vides

Dans l'échantillon de chats, il existe une association entre le fait que le chat soit porteur d'*E.coli* avec des gènes de résistance BLSE et le fait que le chat ait eu une infection dans les 12 derniers mois. Les chats ayant eu une infection présentent une prévalence plus élevée de souches porteuses de BLSE que ceux n'ayant pas eu d'infection. Il existe aussi une association entre le fait que le chat soit porteur de *E.coli* avec des gènes de résistance BLSE et le fait que le chat ait été hospitalisé dans les 12 derniers mois. Les chats ayant été hospitalisés présentent une prévalence plus élevée de souches porteuses de BLSE que ceux n'ayant pas été hospitalisés. Ces résultats n'étant pas significatifs par manque de puissance statistique, d'autant plus qu'il s'agit d'une étude exploratoire sur plusieurs expositions, ils ne peuvent pas être extrapolés à la population des chats de la région parisienne.

## II.D.2. Étude exploratoire chez les chiens

Afin d'augmenter le nombre d'animaux porteurs de bactéries résistantes, nous avons regroupé les types de résistance trouvés, et étudié l'influence des différentes expositions sur la probabilité que l'animal soit porteur de bactéries résistantes (BLSE ou CHN ou ertaR).

*Tableau 8 : Calcul des OR bruts sur les différentes expositions chez les chiens*

| Exposition  | OR brut | p<br>(Fisher exact) |
|---|---------|---------------------|
| L'animal a eu une infection au cours des 12 derniers mois                                     | 1,16    | 0,64                |
| L'animal a été hospitalisé au cours des 12 derniers mois                                      | 2,27    | 0,53                |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage est en contact avec le milieu hospitalier    | 1,29    | 0,62                |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage a voyagé dans les 12 derniers mois           | 0,82    | 0,61                |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage a été hospitalisé dans les 12 derniers mois  | 3,25    | 0,24                |
| Le propriétaire ou une personne de son entourage a eu une infection dans les 12 derniers mois | 8,9     | 0,09                |

Dans l'échantillon des chiens, trois associations sont mises en évidence :

- une association entre le fait que le chien soit porteur de *E.coli* avec des gènes de résistance BLSE, CHN ou ertaR et le fait que le chien ait été hospitalisé dans les 12 derniers mois. Les chiens ayant été hospitalisés présentent une prévalence plus élevée de souches résistantes que ceux n'ayant pas été hospitalisés.

- une association entre le fait que le chien soit porteur de *E.coli* avec des gènes de résistance BLSE, CHN ou ertaR et le fait que le propriétaire ou une personne de l'entourage ait été hospitalisé dans les 12 derniers mois. Les chiens dont le propriétaire ou une personne de l'entourage a été hospitalisé présentent une prévalence plus élevée de souches résistantes.

- une association entre le fait que le chien soit porteur de *E.coli* avec des gènes de résistance BLSE, CHN ou ertaR et le fait que le propriétaire ou une personne de l'entourage ait eu une infection dans les 12 derniers mois. Les chiens dont le propriétaire ou une personne de l'entourage a été hospitalisé présentent une prévalence plus élevée de souches résistantes.

Ces résultats n'étant pas significatif par manque de puissance statistique, d'autant plus qu'il s'agit d'une étude exploratoire sur plusieurs expositions, ils ne peuvent pas être extrapolés à la population des chiens de la région parisienne.

### **III. DISCUSSION**

#### **III.A. Interprétation de nos résultats**

##### **III.A.1. Prévalences du portage d'entérobactéries résistances aux céphalosporines de troisième génération**

Le principal résultat de cette étude est la détermination de prévalences du portage d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération et aux carbapénèmes. Concernant les céphalosporines de troisième génération, nous avons déterminé que 1,3 % des chats (I.C. 0,3 % - 3,8 %) et 1,8 % des chiens (I.C. 0,4 % - 5,2 %) sont porteurs d'*Escherichia coli* résistante aux céphalosporines de troisième génération.

Les prévalences obtenues sont plutôt faibles en comparaison à celles trouvées dans d'autres études. Nous avons vu que la surveillance effectuée par le réseau RESAPATH évalue une prévalence de résistance aux céphalosporines de troisième génération d'environ 10 % chez nos carnivores domestiques. Une étude effectuée en 2011 sur 368 chiens dans une clinique de référés à Paris a montré une prévalence de 18,5 % d'*Escherichia coli* BLSE (Haenni et al., 2014). Ce taux était étonnamment élevé, probablement dû au fait que la clinique accueillait de nombreux cas référés, ce qui peut suggérer que ces chiens aient reçu des traitements antibiotiques préalables dans d'autres cabinets vétérinaires. En humaine, une étude menée sur une population d'adultes jeunes asymptomatiques non hospitalisés (des militaires) en France a montré une prévalence du portage fécal d'entérobactérie BLSE de 0 % à 2,1 % entre 1999 et 2009. (Janvier et al., 2011) Cette prévalence est plus proche de celles que nous avons trouvées.

Dans notre étude, les prévalences obtenues peuvent être sous-estimées par des biais d'échantillonnage et de mesure. Nos échantillons sont constitués d'animaux jeunes, particulièrement l'échantillon de chats (médiane d'âge à 10 mois). Or il a été montré chez l'Homme que le risque d'infection par des bactéries avec des résistances BLSE était plus élevé chez les personnes âgées. (Colodner et al., 2004) Par conséquent, il est raisonnable de penser que chez nos carnivores domestiques, le risque d'avoir été exposé aux bactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération augmente avec l'âge. Il est donc possible que notre prévalence soit sous-estimée. L'échantillon des chiens a une meilleure représentativité, mais reste jeune (médiane d'âge à 4 ans). Il est possible aussi que les prévalences soit légèrement sous-estimées.

Un autre biais d'échantillonnage est possible. Les deux échantillons contiennent uniquement des animaux suivi par un vétérinaire. Ils ont donc plus de chance d'avoir déjà été en contact avec des antibiotiques que la population des chats et de chiens de la région parisienne, comprenant les animaux errants ou non suivis par des vétérinaires. Les prévalences auraient pu être surestimées. Cependant, les animaux étant jeunes, et étant recrutés en consultation basique (vaccination et convenance), il est raisonnable de penser que ce biais a peu d'influence sur la prévalence.

Enfin, un biais de mesure peut exister. Les prélèvements n'ont pas été systématiquement mis en culture sur un milieu non-sélectif. Il n'est pas possible de vérifier si des entérobactéries étaient présentes sur tous nos prélèvements. Cependant, chaque écouvillon a été prélevé avec précaution et présentait de la matière. Il est donc raisonnable de penser que des entérobactéries étaient présentes sur tous nos prélèvements, et que ce biais a peu d'influence.

Ainsi, en prenant en compte l'ensemble de ces biais, il est possible que nos prévalences aient été légèrement sous-estimées par le jeune âge des animaux de nos échantillons.

### **III.A.2. Recherche de facteurs de risque**

Le deuxième but de cette étude était de rechercher d'éventuels facteurs de risque au portage de résistance dans la flore digestive de nos carnivores domestiques. Nous avons mis en évidence dans notre échantillon de chats que ceux ayant eu une infection ou ayant été hospitalisés au cours des douze derniers mois présentent plus d'entérobactéries productrices de BLSE que ceux n'ayant eu ni infection, ni hospitalisation. Dans notre échantillon de chiens, nous avons mis en évidence que ceux ayant été hospitalisés au cours des douze derniers mois ou dont le propriétaire ou une personne de l'entourage a été hospitalisé ou a eu une infection dans les 12 derniers mois présentent plus d'entérobactéries résistantes à des antibiotiques critiques que les autres. Nos échantillons sont trop petits et nous manquons donc de puissance statistique pour généraliser ces résultats. Cela constitue néanmoins une étude pilote. Ces résultats méritent d'être explorés lors d'études plus approfondies qui testeraient chaque exposition dans un échantillon suffisant pour pouvoir avoir des résultats significatifs. Nous n'avons pas pris en compte ici de facteur de confusion, le trop faible nombre d'animaux positifs rendant les calculs impossibles. Il serait intéressant dans de nouvelles études de réussir à prendre en compte ces facteurs de confusion afin de pouvoir déterminer un lien causal.

## **III.B. Enzymes de résistance trouvées et approfondissement de l'étude**

Les résistances trouvées sont des CTX-M-14, CTX-M-15 et des CMY-2.

Les BLSE de type CTX-M se répandent de façon inquiétante depuis 1995 parmi les entérobactéries, notamment chez *Escherichia coli*. Elles sont très différentes des BLSE classiques de type TEM et SHV qui diffusaient majoritairement au sein de clones hospitaliers de *K. pneumoniae* et d'*Enterobacter spp.* Les CTX-M constituent désormais la majorité des BLSE quelle que soit la région du monde, aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire, à tel point qu'on qualifie leur diffusion de pandémique. CTX-M-14 et CTX-M-15 représentent les variants les plus décrits. Ce sont de loin les plus importants, qui présentent une distribution mondiale à la fois dans le réservoir humain, animal et environnemental. Il est intéressant de noter que CTX-M-14 semble prédominer en Espagne, en Chine et en Corée. La diffusion internationale du variant CTX-M-15 semble être due à la dissémination d'un clone d'*E. coli* uropathogène hypervirulent et multirésistant aux antibiotiques nommé ST131, aussi bien en communauté qu'en milieu hospitalier. Les gènes codant pour les CTX-M ont un support plasmidique, c'est pourquoi leur dissémination est si impressionnante et problématique. (Cantón et Coque, 2006 ; Elhani, 2012)

Les céphalosporinases de type CMY-2 sont des céphalosporinases dites de « haut niveau », qui permettent une hyperproduction d'AmpC. Le gène codant pour CMY-2 est situé sur un plasmide et diffuse au sein de nombreuses espèces d'entérobactéries, notamment *Escherichia coli*. Ce gène a été isolé dans de nombreux pays notamment aux États-Unis et en Europe, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. Il a été décrit récemment chez le chien aux Royaume-Unis, aux États-Unis et en Grèce. Sa diffusion est donc internationale, et il a été isolé sur différents types de plasmides : IncA/C, IncI1/ST12 ou IncI1/ST23. (Haenni et al., 2014 ; Winokur et al., 2001)

Les différents gènes de résistance que nous avons trouvés sont portés par des plasmides. Afin d'approfondir cette étude, l'ANSES de Lyon va déterminer quels sont les différents plasmides qui portent ces gènes. Ils effectuent pour cela une PCR permettant de déterminer le type de plasmides présents, puis une technique de southern blot pour montrer la colocalisation du plasmide et du gène de résistance. Sur une souche de notre échantillon de chat, la recherche du gène conférant la résistance BLSE n'a pour l'instant donné aucun résultat. Le génome de cette souche va être séquencé pour poursuivre les instigations.

### **III.C. Présence d'une carbapénémase**

Un résultat important de cette étude est la découverte d'une carbapénémase chez un chien. Il s'agit d'une OXA-48.

Les différentes carbapénémases connues sont KPC, NDM et OXA-48, codées par des gènes situés sur des plasmides conjugatifs. Ces plasmides sont facilement transmissibles entre différentes espèces. Les carbapénèmes sont utilisés uniquement chez l'Homme, en milieu hospitalier. Pourtant, plusieurs cas de souches bactériennes produisant des carbapénémases ont été décrits chez l'animal. Récemment (juin 2013), l'enzyme NDM-1 a été retrouvée chez une souche d'*Escherichia coli* de chien aux États-Unis, en juillet 2013, l'enzyme NDM-1 a été décrite en Allemagne chez une Salmonelle issue d'un oiseau sauvage, et l'enzyme OXA-48 chez des souches d'*Escherichia coli* de chiens.(Madec, 2013 ; Stolle et al., 2013) Notre étude met en évidence une souche d'*Escherichia coli* de chien produisant une OXA-48. Ces exemples illustrent bien une transmission des résistances entre l'Homme et l'animal. Cela pose un problème car il s'agit d'une résistance envers un antibiotique utilisé en dernier recours, uniquement chez l'Homme et dans des structures hospitalières. Le développement de cette résistance pourrait amener à de nombreux échecs thérapeutiques. De plus, cette résistance est portée par des plasmides, dont la diffusion est particulièrement difficile à maîtriser. Cela est d'autant plus vrai qu'il s'agit ici de bactéries commensales, elles ne sont pas associées à une pathologie, la résistance peut alors se diffuser à bas bruit.

# CONCLUSION

L'étude réalisée a permis de mettre en évidence des résistances aux céphalosporines de troisième génération et aux carbapénèmes dans la flore digestive commensale des chiens et des chats. Les prévalences calculées dans nos échantillons sont relativement faibles (pour les résistances aux céphalosporines de troisième génération : 1,3 % chez les chats, et 1,8 % chez les chiens ; pour les résistances aux carbapénèmes : 0,6 % chez les chiens). Les céphalosporines de troisième génération sont des antibiotiques critiques utilisés uniquement en dernier recourt. C'est également le cas des carbapénèmes qui sont de plus réservés au milieu hospitalier en médecine humaine. L'existence de résistances à ces antibiotiques de derniers recourt est préoccupante : leur développement peut amener à des échecs thérapeutiques en médecine vétérinaire et humaine. Nous avons de plus mis en évidence plusieurs expositions potentiellement liées à un plus fort taux de résistance. Dans notre échantillon de chats, ceux ayant eu une infection ou ayant été hospitalisés au cours des douze derniers mois présentent plus d'entérobactéries BLSE que ceux n'ayant eu ni infection, ni hospitalisation. Dans notre échantillon de chiens, ceux ayant été hospitalisés au cours des douze derniers mois ou dont le propriétaire ou une personne de l'entourage a été hospitalisé ou a eu une infection dans les 12 derniers mois présentent plus d'entérobactéries résistantes que les autres. Ces résultats méritent d'être explorés lors d'études plus approfondies qui testeraient chaque exposition dans un échantillon suffisant pour pouvoir avoir des résultats significatifs.

Cette étude illustre bien la difficulté à maîtriser les échanges de gènes de résistance bactérienne entre l'Homme et l'animal, notamment lorsque la dissémination de la résistance repose sur des éléments mobiles, les plasmides, sans infection apparente, sans contexte causal clairement associé, et au travers de la flore commensale. Ces gènes de résistance se propagent au sein d'un réservoir plasmidique commun à l'Homme et à l'animal. Cette dissémination doit être considérée comme une menace importante pour la santé publique. Aussi, la prescription d'antibiotiques doit se faire de façon raisonnée, afin d'en réduire drastiquement la consommation, notamment celle d'antibiotiques critiques. La sensibilisation de toute la profession vétérinaire est importante : les antibiotiques critiques doivent être utilisés uniquement en dernier recourt, et les efforts pour diminuer la prescription d'antibiotique de manière générale doivent être poursuivis. Le vétérinaire doit mettre en avant toutes les alternatives permettant de limiter les antibiotiques. Par exemple, il est possible de s'abstenir d'antibiothérapie lors de chirurgie de convenance en adoptant de bonnes pratiques d'hygiènes. Il est recommandé aussi de favoriser des soins locaux, et d'établir lorsque cela est possible une antibiothérapie loco-régionale et non systémique. Enfin, de nouvelles technologies se développent. Par exemple des études sont actuellement menées sur l'utilisation de la V.A.C. (Vacuum Assisted Closure) dans le cadre du traitement de plaies graves chez le cheval. Il s'agit d'un bandage appliquant une pression négative sur la plaie, qui permettrait de limiter l'antibiothérapie. Le rôle du vétérinaire est également de dialoguer avec son client afin de le sensibiliser et de lui faire comprendre les changements de protocoles thérapeutiques utilisés. En effet, il est primordiale de garder la confiance du client envers le vétérinaire, car le problème de l'automédication existe bien, notamment avec l'impact des échanges mondialisés, en particulier avec des pays pratiquant la vente libre d'antibiotiques. La lutte contre l'antibiorésistance reste un réel défi. Une solidarité internationale est essentielle, avec une mobilisation de tous les acteurs : médecins, vétérinaires, laboratoires et clients.



## ANNEXE

## QUESTIONNAIRE

Nº.....

## **ANIMAL DE COMPAGNIE**

Chien       Chat

Race : ..... Age : .....

Depuis combien de temps (en année) ? .....

Votre animal est-il malade actuellement ?  Non  Oui

Possédez-vous un ou plusieurs autres animaux ?  Non

Chat       Chien       Oiseau       Reptile

Autres petits mammifères     Cheval     Vaches  
 Autres : .....

## **Infection**

Votre animal a-t-il eu une ou plusieurs infections dans les 12 derniers mois ?

Non       Oui

Si oui :

Combien ?     Indéterminé     Moins de 3     Entre 3 et 5     Plus de 5

Localisation de l'infection :

Urinaire       ORL       Respiratoire       Cutanée       Ostéoarticulaire

Abdominal       Méningé       Autre(s) : .....

A-t-il reçu un traitement antibiotique ?  Non  Oui  Ne sais pas

Si oui, lequel ?       Nom : .....  Ne me souviens plus

## **Hospitalisation**

Votre animal a-t-il été hospitalisé dans les 12 derniers mois ?  Non  Oui

Dans quel type de service ?

Médecine       Chirurgie       Unité de soins intensifs / Réanimation

Durée de l'hospitalisation :

Moins de 3 jours     Entre 3 et 8 jours     Plus de 8 jours

Votre animal a-t-il eu une infection lors de cette hospitalisation ?  Non  Oui

A-t-il reçu un traitement antibiotique ?  Non  Oui  Ne sais pas

Si oui, lequel ?  Nom : .....  Ne me souviens plus

## **MAITRE**

---

Vous êtes :       un homme       une femme      Age : .....

Travaillez-vous en milieu hospitalier ?       Non       Oui  
Est ce le cas pour une personne de votre entourage ?       Non       Oui

Pratiquez vous des soins à domicile (infirmier, kinésithérapeute...) ?       Non       Oui

### **Voyage à l'étranger**

---

Avez vous voyagé à l'étranger dans les 12 derniers mois ?       Non       Oui  
Est ce le cas pour une personne de votre entourage ?       Non       Oui

Si oui :

Destination(s) : .....

A quelle période êtes vous parti ?  Printemps       Eté       Automne       Hiver

Durée du voyages (en jours) : .....

Hospitalisation pendant le séjour :       Non       Oui

Si oui, dans quel type de service ?

Médecine       Cancérologie       Onco-hématologie       Néphrologie  
 Unité de soins intensifs / Réanimation       Obstétricité       Chirurgie

Autres : .....

Rapatriement sanitaire d'un établissement de santé :       Non       Oui

### **Antécédents d'hospitalisation (en France)**

---

Avez vous été hospitalisé durant les 12 derniers mois :       Non       Oui  
Est ce le cas pour une personne de votre entourage ?       Non       Oui

Si oui, combien de fois ? .....

Dans quel type de service ?

Médecine       Cancérologie       Onco-hématologie       Néphrologie  
 Unité de soins intensifs / Réanimation       Obstétricité       Chirurgie

Autres : .....

Durée de l'hospitalisation :

Moins de 3 jours       Entre 3 et 8 jours       Plus de 8 jours

Avez-vous eu une infection lors de cette (ces) hospitalisation(s) ?       Non       Oui

Avez-vous reçu un traitement par antibiotiques ?       Non       Oui       Ne sais pas  
Si oui, lequel ?       Nom : .....  Ne se souvient plus

### **Antécédents d'infection (en dehors d'une hospitalisation)**

---

Avez-vous eu une ou plusieurs infections dans les 12 derniers mois ?       Non       Oui  
Est ce le cas pour une personne de votre entourage ?       Non       Oui

Si oui, combien ?       Indéterminé       Moins de 3       Entre 3 et 5       Plus de 5

Quel type d'infection (localisation) :

Urinaire       ORL       Respiratoire       Cutanée       Ostéoarticulaire  
 Abdominal       Méningé       Autre(s) : .....

Avez-vous reçu un traitement par antibiotiques ?       Non       Oui       Ne sais pas  
Si oui, lequel ?       Nom : ..... Ne se souviens plus



# BIBLIOGRAPHIE

- Abraham EP, Chain E (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.*, **10**, p677-678.
- AFSSA (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine *In: www.anSES.fr* [en ligne].
- ANSES (2015). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2014 *In: www.anSES.fr* [en ligne].
- ANSM (2014). L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2013 *In: ansm.sante.fr* [en ligne].
- Archambaud M (2009). Les Antibiotiques *In: [en ligne]*. [<http://www.medecine.ups-tlse.fr/pcem2/bacteriologie/atb%20action%202009.pdf>] (Consultation le 26/11/15).
- Bennett PM (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.*, **153 Suppl 1**, p347-357.
- Bennett PM, Livesey CT, Nathwani D, Reeves DS, Saunders JR, Wise R (2004). An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, p418-431.
- Biomérieux (2010). Fiche technique Gélose chromID™ ESBL (ESBL).
- Biomérieux (2013). Fiche technique Gélose chromID® CARBA SMART (CARB/OXA).
- bioMérieux - Culture Media | product - chromID™ CARBA SMART (n.d.).  
[<http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/99-chromid-carba-smart>] (Consultation le 27/8/16).
- Boerlin P, White DG (2013). Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology, *in: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, p21-40.
- Bradford PA (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, p933-951.
- Bush K, Jacoby GA (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, p969-976.
- Cantón R, Coque TM (2006). The CTX-M β-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol., Antimicrobials/Genomics*, **9**, p466-475.
- CA-SFM (2015). Recommandation 2015 *In: Sfm-Microbiol.* [en ligne]. [[http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFIM\\_EUCAST\\_V1\\_2015.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFIM_EUCAST_V1_2015.pdf)]
- Cattoir V (2008). Les nouvelles Beta-Lactamases à Spectre Etendu (BLSE). *MAPAR*, p204–209.
- Charpentier E, Novak R (2000). Mort bactérienne et antibiotique de la famille des bétalactamines. *médecine/sciences*, **16**, p1125-1127.
- Chassagne C (2012). Caractérisation phénotypique de souches d'entérobactéries produisant une oxacillinase-48 isolées lors d'une épidémie survenue au CHU de Nancy en 2009/2011. (Thèse de doctorat en pharmacie). Université de Lorraine.
- Chopra I, O'Neill AJ, Miller K (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, **6**, p137-145.
- Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, et al. (2004). Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, **23**, p163-167.
- Comte D, Petitpierre S, Bart P-A, Spertini F (2012). Allergie aux bétalactamines. *Rev Med Suisse*, p836-842.

- Contexte, enjeux et dispositif de surveillance (n.d.). [<http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Resistance-aux-anti-infectieux/Contexte-enjeux-et-dispositif-de-surveillance>] (Consultation le 14/2/16).
- Davies J, Davies D (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **74**, p417-433.
- Dedet J-P (2007). De la quinine aux antibiotiques : les grandes étapes de la thérapeutiques antimicrobienne, in: *La Microbiologie de Ses Origines Aux Maladies Émergentes, Dundo*, p183-213.
- Dougherty TJ, Pucci MJ (2011). Antibiotic Discovery and Development. Livre édité par Springer Science & Business Media.
- Dutta C, Pan A (2002). Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J. Biosci.*, **27**, p27-33.
- ECDC (2015). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2014 In: [ecdc.europa.eu](http://ecdc.europa.eu) [en ligne].
- Elhani D (2012). Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accentue. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **70**, p117-140.
- Enriquez B (2010). Les antibiotiques en médecine vétérinaire, Pharmacologie et Toxicologie expérimentales et cliniques. Polycopié de cours de l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Afort.
- Fiche technique écouvillons COPAN (n.d.).  
[[https://webshop.fishersci.com/webfiles/fr/web/FS2013/EU\\_FR\\_13LAB\\_P0967.pdf](https://webshop.fishersci.com/webfiles/fr/web/FS2013/EU_FR_13LAB_P0967.pdf)]
- Ghuyzen JM (1968). Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism.. *Bacteriol. Rev.*, **32**, p425-464.
- Gootz TD (1990). Discovery and development of new antimicrobial agents.. *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**, p13-31.
- Grall N, Andremont A, Armand-Lefèvre L (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ?. *J. Anti-Infect.*, **13**, p87-102.
- Griton (2009). Mécanisme de résistance des BGN aux Bétalactamines In: [en ligne].  
[[http://www.medecine.unilim.fr/formini/descreaso/limoges\\_septembre\\_2009/Resistance\\_Bla\\_ctamines\\_BGN\\_2009\\_DESC.pdf](http://www.medecine.unilim.fr/formini/descreaso/limoges_septembre_2009/Resistance_Bla_ctamines_BGN_2009_DESC.pdf)]
- Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria Review. *J. Antimicrob. Chemother.*, **54**, p321-332.
- Haenni M, Saras E, Métayer V, Médaille C, Madec J-Y (2014). High Prevalence of blaCTX-M-1/IncI1/ST3 and blaCMY-2/IncI1/ST2 Plasmids in Healthy Urban Dogs in France. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, p5358-5362.
- Hall BG, Barlow M (2005). Revised Ambler classification of β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**, p1050-1051.
- Jacoby GA (2006). β-Lactamase Nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, p1123-1129.
- Janvier F, Mérens A, Delaune D, Soler C, Cavallo J-D (2011). Portage digestif d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dans une population d'adultes jeunes asymptomatiques : évolution entre 1999 et 2009. *Pathol. Biol., Microbiologie - Virologie - Infectiologie*, **59**, p97-101.
- Jarrige N, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec J-Y (2015). Bilan 2014 In: [anses.fr](http://www.anses.fr) [en ligne].  
[<https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2014.pdf>]
- Jaurin B, Grundström T (1981). ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, p4897-4901.
- Laboratoire d'analyse le palais des Pyrénées - Détermination de la CMI - Antibiogramme et CMI (n.d.). [<http://www.pole-marzet.fr/laboratoire/cmi.php>] (Consultation le 2/12/15).
- Lacey RW (1975). Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance.. *Bacteriol. Rev.*, **39**, p1-32.
- Le réseau Résapath - Anses (n.d.). [<https://www.anses.fr/fr/content/le-r%C3%A9seau-r%C3%A9sapath>] (Consultation le 16/1/16).

- Limbert M, Isert D, Klesel N, Markus A, Seeger K, Seibert G, et al. (1991). Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin.. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, p14-19.
- Lozniewski A, Rabaud C (2010). Résistance aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux In: *Cclin-Sudestchu-Lyonfr* [en ligne]. [[http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/cclin\\_arlin/cclinSudEst/2010\\_ResistanceAntibiotiques\\_CClinSE.pdf](http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/cclin_arlin/cclinSudEst/2010_ResistanceAntibiotiques_CClinSE.pdf)]
- Madec J-Y (2012a). Antibiorésistance : le passage animal - Homme, mythe ou réalité ?. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment.*, p50-53.
- Madec J-Y (2012b). Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de dernières générations : de l'animal à l'Homme. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment.*, p37-39.
- Madec J-Y (2013). Résistance aux antibiotiques chez l'animal : quel risque pour l'Homme ?. *J. Anti-Infect.*, **15**, p178-186.
- Madec J-Y (2014). Comprendre l'antibiorésistance en décryptant ses mécanismes moléculaires. *Point Vét. Expert Canin*, **45**, p12-13.
- Mandell GL, Petri WA (1996). Médicament anti-microbiens : Pénicillines, céphalosporines et autre antibiotiques de type bétalactame, in: *Les Bases Pharmacologiques de l'Utilisation Des Médicaments*, 9ème Édition, p1069-1097.
- Manian FA (2003). Asymptomatic Nasal Carriage of Mupirocin-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Pet Dog Associated with MRSA Infection in Household Contacts. *Clin. Infect. Dis.*, **36**, p26-28.
- Mesaros N, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R, Tulkens PM (2005). L'efflux des antibiotiques : Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. État de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain Méd.*, **124**, p308-320.
- Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt (2012). Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire In: *agriculture.gouv.fr* [en ligne].
- Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt (2016a). Arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotiques d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue à l'article R. 5141-117-2 In: *Legifrance* [en ligne]. (Consultation le 1/9/16).
- Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt (2016b). Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique In: *Legifrance* [en ligne]. (Consultation le 1/9/16).
- Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé (2011). Plan nationale d'alerte sur les antibiotiques 2011-2016 In: *Https://social-Sante.gouv.fr* [en ligne]. [[http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan\\_antibiotiques\\_2011-2016\\_DEFINITIF.pdf](http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_antibiotiques_2011-2016_DEFINITIF.pdf)]
- Moulin G, Cavalié P, Pellanne I, Chevance A, Laval A, Millemann Y, et al. (2008). A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *J. Antimicrob. Chemother.*, **62**, p617-625.
- Neuman M (1990). Vade-mecum des antibiotiques et agents chimiothérapiques anti-infectieux, 5ème édition. Livre édité par MALOINE.
- Observatoire National de l'Épidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) (2015). Rapport annuel 2013-2014 In: *onerba.org* [en ligne].
- Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, p7378-7382.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, p4943-4960.
- Paterson DL, Bonomo RA (2005). Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.*, **18**, p657-686.

- Prescott JF (2013a). Beta-lactam Antibiotics : Penam Penicillins, *in: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 5ème Édition*, p135-152.
- Prescott JF (2013b). Beta-lactam Antibiotics : Betalactamase Inhibitors, Carbapenems and Monobactams, *in: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 5ème Édition*, p175-187.
- Prescott JF (2013c). Beta-lactam Antibiotics : Cephalosporins, *in: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 5ème Édition*, p153-174.
- Réglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam J-M, Fortineau N, et al. (2008). Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *J. Med. Microbiol.*, **57**, p310-315.
- Rivière JE, Papich MG (2009). Bétalactam antibiotics : pénicillins, céphalosporins, and related drugs, *in: Veterinary Pharmacology & Therapeutics, 9ème Édition*, p865-894.
- Roberts AP, Chandler M, Courvalin P, Guédon G, Mullany P, Pembroke T, et al. (2008). Revised Nomenclature for Transposable Genetic Elements. *Plasmid*, **60**, p167-173.
- Rubin JE (2013). Antimicrobial SUSceptibility Testing Methods and Interpretation of Results, *in: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, p11-20.
- Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, et al. (2013). Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, p2802-2808.
- Threlfall EJ (2000). Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104—a truly international multiresistant clone. *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, p7-10.
- Van Duijkeren E, Wolfhagen MJHM, Box ATA, Heck MEOC, Wannet WJB, Fluit AC (2004). Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, p2235-2237.
- Waxman DJ, Yocom RR, Strominger JL (1980). Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: evidence in support of the substrate analogue hypothesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **289**, p257-271.
- Winokur PL, Vonstein DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, Doern GV (2001). Evidence for Transfer of CMY-2 AmpC β-Lactamase Plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Food Animals and Humans. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, p2716-2722.

# **ÉTUDE DU PORTAGE D'ENTÉROBACTÉRIES RÉSISTANTES AUX CÉPHALOSPORINES DE TROISIÈME GÉNÉRATION ET AUX CARBAPÉNÈMES CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES SAINS DU CHUVA.**

BOISSON Marine, Nicole, Gisèle

Résumé :

Les céphalosporines de troisième génération et les carbapénèmes sont des antibiotiques critiques utilisés en dernier recourt en cas de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques de première intention, et réservés à la médecine humaine pour les carbapénèmes. Il existe des souches bactériennes résistantes à ces antibiotiques, notamment par la production d'enzymes BLSE, CHN et de carbapénèmases. Les gènes codant pour ces mécanismes de résistance sont situés sur des plasmides, ce qui leur confèrent une grande capacité de diffusion. La dissémination de ces résistances au sein de bactéries pathogènes mais aussi au sein de la flore commensale est particulièrement inquiétante car elle crée des échecs thérapeutiques. Cette étude a permis de mettre en évidence des résistances aux céphalosporines de troisième génération et aux carbapénèmes dans la flore digestive commensale des chiens et des chats. Les prévalences calculées dans nos échantillons sont relativement faibles. Les résultats de prévalences pour les résistances aux céphalosporines de troisième génération sont de 1,3 % chez les chats et 1,8 % chez les chiens et pour les résistances aux carbapénèmes 0,6 % chez les chiens. De plus, plusieurs expositions potentiellement liées à un plus fort taux de résistance ont été mis en évidence. Dans notre échantillon de chats, ceux ayant eu une infection ou ayant été hospitalisés au cours des douze derniers mois présentent plus d'entérobactéries BLSE que ceux n'ayant eu ni infection, ni hospitalisation. Dans notre échantillon de chiens, ceux ayant été hospitalisés au cours des douze derniers mois ou dont le propriétaire ou une personne de l'entourage a été hospitalisé ou a eu une infection dans les 12 derniers mois présentent plus d'entérobactéries résistantes que les autres.

**Mots clés : ANTIBIORESISTANCE – ENTEROBACTERIE – PREVALENCE – FACTEUR DE RISQUE – TRANSMISSION – PLASMIDE – FLORE DIGESTIVE – CEPHALOSPORINE – CARBAPENEME – CARNIVORE DOMESTIQUE – CHIEN – CHAT**

**Jury :**

Président : Pr.

Directeur : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur de bactériologie à l'ENVA

Assesseur : Mme ENRIQUEZ, Professeure de pharmacologie à l'ENVA

Invités :

Mme MEDAILLE, directrice adjointe du CHUVA,

M. MADEC, Directeur de recherches et chef de l'unité Antibiorésistance et virulence bactériennes à l'Anses de Lyon,

Mme HAENNI, chef d'unité adjointe à l'Anses de Lyon

# **STUDY OF THE THIRD-GENERATION-CEPHALOSPORIN RESISTANT AND CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE CARRIAGE AMONG THE HEALTHY DOMESTIC CARNIVORES OF THE CHUVA.**

BOISSON Marine, Nicole, Gisèle

Summary :

Third generation cephalosporin and carbapenem are critically important antimicrobials. They serve as a last resort, for infection caused by first-line antibiotic resistant bacteria. The use of carbepem is limited to human medecine. Some strains of bacteria have developed resistance to these antibiotics, caused by the production of ELSB, high-level-cephalosporinase or carbapenemase. The genes coding for these mechanisms of resistance are located on plasmids, what enabling them to spread widely. These genes are disseminated within pathogen bacteria but also within the commensal flora. These resistances are alarming because they lead to therapeutic failures. This study showed third-generation-cephalosporin-resistances and carbapenem-resistances in the commensal digestive flora of dogs and cats. Prevalences calculated in our samples are relatively low. The prevalence results for the third-generation-cephalosporine-resistances are 1,3 % in cats and 1,8 % to dogs and for the carbapenem-resistances 0,6 % in dogs. Furthermore, several exposures potentially bound to a higher rate of resistance were highlighted. In our sample, the cats who have had an infection or who had been hospitalized during the past twelve months present more ESBL *E.coli*. In our sample, the dogs who have been hospitalized during the past twelve months or the dogs whose owner or person in the surroundings had been hospitalized or had had an infection in the past twelve months present more of resistant *E.coli* than the others.

**Keywords : ANTIBIOTIC RESISTANCE – ENTEROBACTERIACEAE – PREVALENCE – RISK FACTOR – TRANSMISSION – PLASMID – INTESTINAL FLORA – CEPHALOSPORIN – CARBAPENEM – DOMESTIC CARNIVORE – DOG – CAT**

**Jury :**

President : Pr.

Director : Mr. BOULOUIS Henri-Jean, Professor of bacteriology in the ENVA

Assessor : Mrs ENRIQUEZ, Professor of pharmacology in the ENVA

Guest :

Mrs MEDAILLE, deputy director of the CHUVA,

Mr MADEC, research director and head of unit in ANSES

Mrs HAENNI, deputy head of unit in ANSES of Lyon